

SANDRA RACHIDI MARÃO

Sobre o Efeito de Hidratação e Volume Excluído no
Enovelamento da Apo-Mioglobina na Presença de
Osmólitos



1910000957





UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" - UNESP

SANDRA RACHIDI MARÃO

**SOBRE O EFEITO DE HIDRATAÇÃO E VOLUME EXCLUSO NO
ENOVELAMENTO DA APO-MIOGLOBINA NA PRESENÇA DE
OSMÓLITOS.**

ORIENTADOR: PROF. DR. MARCIO FRANCISCO COLOMBO



T957/00

Tese apresentada no Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP.

São José do Rio Preto - SP
2000

Aos meus pais, "in memoriam", pela condução tão estimulante no caminho do respeito ao próximo e na procura do saber norteadas pelo amor e pela ética.

Ao companheiro Mauro Divino, que em todos os instantes, com sua dedicação e carinho, me incentivou e deu forças para não desanimar nunca.

MINHA GRATIDÃO

Ao meu orientador, Professor Dr. Márcio Francisco Colombo, que conduziu a elaboração deste trabalho sempre com muita firmeza e empenho.

Ao Professor Dr. João Ruggiero Neto, pela colaboração na execução da parte experimental desta tese e pela discussão e críticas tão úteis por ocasião do exame de qualificação.

Ao Professor Dr. Jorge Chahine, pela disposição com que participou da banca do exame de qualificação trazendo importantes contribuições e sugestões.

Ao Professor Dr. Marcelo Fossey, que acompanhou, desde o início, de forma tão amigável, a execução deste trabalho.

Ao Professor Dr. José Roberto Ruggiero, coordenador deste Programa de Pós-Graduação, que prontamente atendeu às solicitações de participação em Congressos Nacionais e Internacionais, esmerando-se sempre na formação dos estudantes.

Aos demais professores deste departamento que através de seminários e/ou cursos corroboraram para o melhor desempenho de seus alunos.

À CAPES, CNPq e FAPESP pela subvenção de bolsas e projetos desenvolvidos neste departamento.



À Sub-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da UNESP, que forneceu suporte financeiro através de bolsas e passagens para a participação em Cursos e Congressos Nacionais e Internacionais.

À minha irmã Bia, que carinhosamente colaborou, incentivando sempre a realização deste trabalho.

À Dulcinéia, que tão prontamente fez a última revisão em seus mínimos detalhes.

Aos colegas das várias turmas do Curso de Pós-Graduação, que proporcionaram uma convivência harmoniosa no decorrer destes anos.

Aos funcionários Ilva, Paulinho e Barbosa pela presteza no atendimento das solicitações feitas durante a realização desta tese.

Aos funcionários da seção de Pós-Graduação, Nancy, Osmar, Nádia e Genoeva.

E aos amigos que colhi durante estes anos: Marcelo e Cristina, Bernadete e Márcio, Dulce, Mac, Renato, Flávio, Osmar, Ocimar e Fernanda.



Sumário

Assunto

pag.

Capítulo 1 Introdução

1.1 Apresentação e Objetivos	1
1.2 Os Estados Desnaturado e Nativo das Proteínas	2
1.3 Estabilização de Intermediários por Íons e Temperatura	5
1.4 Estudos com a Apomioglobina e outras Proteínas Globulares	8
1.5 A Estabilidade pela Adição de Osmólitos	12
1.6 O Efeito de Água na Estrutura e Função das Proteínas	17

Capítulo 2 Modelos Termodinâmicos

2.1 Introdução	21
2.2 Descrição Termodinâmica do Efeito de Solutos no Potencial Químico de Macromoléculas	21
2.3 Análise e Interpretação do Efeito de Solute na Estabilidade Conformacional de proteínas via Determinação de $\xi_{3,2}$ por Medidas de Densidade de Soluções Água-Macromolécula-Solute.....	25
2.4 Análise do Efeito de Solute na Estabilidade Conformacional de Proteínas Considerando a Contribuição da Água de Hidratação ao Potencial Químico Da Proteína	26
2.5 O Efeito de Ocupação do Volume na Atividade Termodinâmica de Proteínas: Algumas Consequências Bioquímicas (Minton, 1983)	30

Capítulo 3 Materiais e Métodos

3.1 Materiais	33
3.1.1 A Macromolécula	33
Obtenção da ApoMb.....	35
3.1.2 Os Solutos	35
3.2 Os Equipamentos de Medidas	36
3.2.1 De pH	36
3.2.2 Das Concentrações	37
3.2.3 Das Alterações Estruturais da Macromolécula	38



3.3 Titulações	41
3.3.1 Experimentos de Titulação Ácida	41
3.3.2 Experimentos de Titulação com Solutos	42
3.3.3 Experimentos com o Íon Cloreto	42
3.3.4 Experimentos de Reversibilidade	43
3.4 Métodos de Análise e Tratamento de Dados	43

Capítulo 4 Resultados

4.1 Apresentação	48
4.2 Desnaturação ácida da apoMb na ausência e presença de solutos neutros e do íon cloreto.....	49
4.3 Determinação da Diferença do Número de Prótons Ligados aos Estados D e I em Relação ao Estado Nativo	57
4.4 Experimentos de Titulação com sacarose e íon cloreto a pH fixo em 2,46	59
4.5 Dependência da Constante de Equilíbrio Aparente para a Transição entre os Estados D e I com a Concentração do Solute, Prótons e a Atividade de Água	63
4.6 Experimentos com Diferentes Osmólitos a pH 2,46	70
4.7 Desnaturação Térmica do Estado I da apoMb a pH 2,46 e Estabilizado por Solutos	90

Capítulo 5 Discussão e Conclusões

5.1 Introdução	99
5.2 Caracterização dos Estados D, I e N da apoMb no Processo de Desnaturação Ácida na Presença de Diversos Solutos	101
5.3 Sobre o Mecanismo de Estabilização do Estado Parcialmente Enovelado da apoMb a pH ácido e alta Concentração de Solute	104

Apêndice Bases do Funcionamento do Espectropolarímetro	115
---	-----

Bibliografia	118
---------------------------	-----



ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Capítulo 1 Introdução pag.

Figura 1.2.1 Enovelamento Desenovelamento protéico05

Figura 1.4.2 Representação da Mioglobina e Apomioglobina09

Capítulo 2 Modelos Termodinâmicos

Figura 2.2.1 Caracterização da Exclusão Molecular23

Capítulo 3 Materiais e Métodos

Figura 3.1.1 Representação da Molécula de Mb34

Figura 3.2.1 Espectros da Mb, apoMb e PLL41

Tabela 3.1.I Apresentação e Características dos Solutos37

Tabela 3.2.II Comparação de Conteúdos de Hélices α por Métodos Distintos40

Capítulo 4 Resultados

Figura 4.2.1 Espectros de Elipticidade Molar Residual do Processo de
Desnaturação Ácida50

Figura 4.2.2 Curvas de Titulação Ácida em Água Pura e em Cloreto.....51

Figura 4.2.3 Curvas de Titulação Ácida em diversas Conc. de Sacarose.....54

Figura 4.2.4 Curvas de Titulação Ácida em Água, Sacarose e Cloreto55

Figura 4.3.5 Dependência de $\log(K_{obs})$ com o pH em sacarose 3m58

Figura 4.4.6 Dependência da EM em sacarose e cloreto60

Figura 4.4.7 Espectros de CD nos estados D, I e N61

Figura 4.4.8 Relação $\log(K)$ versus $\log([soluto])$ em sacarose e cloreto62

Figura 4.5.9 Medidas em sacarose e sorbitol em dois pH distintos65

Figura 4.6.10 Espectros CD em peg600 a pH 2,4671

Figura 4.6.11-4.6.13 Curvas de θ_{222} versus concentração de soluto.....72 e 73

Figura 4.6.14 Curvas de $\log(KD-I)$ versus $\log(\text{molalidade})$	74
Figura 4.6.15-4.6.17 Gráficos de $\log(K)$ versus $\log(a_w)$	77 e 78
Figura 4.6.18 Correlação entre Δn_w e o Volume Molar	80
Figura 4.6.19 Gráfico de $\ln(a_w 1/2)$ versus V_s/V_w	84
Figura 4.6.20 a e b Relação da energia livre com a concentração Molar	88
Figura 4.6.21 ΔU_{obs} versus ΔU_{calc}	90
Figura 4.6.22 Correlação entre Δn_w e ΔU	91
Figura 4.7.23 $\theta_{222}/\theta_{222}^N$ em função conc. Molal de glicose	93
Figura 4.7.24 $\theta_{222}/\theta_{222}^N$ em função conc. Molal de sacarose.....	93
Figura 4.7.25 a e b $\log(K_t)$ versus $\log(a_w)$ p/ glicose e sacarose	94
Figura 4.7.26 Gráfico de van't Hoff p/ glicose em várias conc	96
Figura 4.7.27 Gráfico de van't Hoff p/ sacarose em várias conc	97
Figura 4.7.28 Variação da entalpia de van't Hoff em função da concentração de glicose e sacarose	98
Tabela 4.5.I Valores de Δn_w , $\log(a_w)$ e Δn_{H^+}	68
Tabela 4.6.II Valores de Δn_w , $\ln(a_w)$ V. Molar, MM	79
Tabela 4.6.III Valores de ΔU teórico e exp. Δn_w , e V. Molar	89

Capítulo 5

Figura 5.3.1 Esquema do Efeito do Soluta no Enovelamento da apoMb.....	109
Figura 5.3.2 Representação Gráfica das Unidades Cooperativas	113

LISTA DE ABREVIações

N – conformação ou estado nativo de uma proteína.

D – conformação ou estado desnaturado de uma proteína.

I – conformação ou estado intermediário de uma proteína.

MG – estado de transição de uma proteína.

Mb – mioglobina.

ApoMb – apomioglobina.

HoloMb – holomioglobina (a mioglobina inteira).

Hb – hemoglobina.

Cyt-c – citocromo-c.

Å – angström.

NaTCA – tricloroacetato de sódio.

NaOH – hidróxido de sódio.

NaCl – cloreto de sódio.

KCl – cloreto de potássio.

HCl – ácido clorídrico.

DC – dicroísmo circular.

θ_I , θ_D , θ_N – elipticidade em 222 nm relativas aos estados intermediário, desnaturado e nativo, respectivamente.

θ_{222} – elipticidade observada em 222 nm.

θ – elipticidade observada em 222 nm para o estado nativo da proteína.

θ_{222}/θ – razão entre a elipticidade observada em qualquer ponto e a elipticidade do estado nativo.

$[\theta]_{222}$ – elipticidade molar residual em 222 nm.

NMR – ressonância magnética nuclear.

R_g – raio de giração de uma molécula.

SAXS – espalhamento de raio-X a baixos ângulos.

s – segundos.

ms – milisegundos.



μ s – microsegundos.

ns – nanosegundos.

PEG – polietileno glicol.

DKP – dicetopiperazina (glicil-glicina cíclica).

a_w – atividade de água.

K_{obs} – constante de equilíbrio observada.

K^{ap} – constante de equilíbrio aparente.

Osmol/kg – osmolalidade por quilograma.

m – molal [unidade de concentração (n° de moles por quilograma de solvente)].

M – molar [unidade de concentração (n° de moles por litro de solução)].

mM – milimolar.

μ M – micromolar.

MM – massa molecular.

D – Dalton.

H^+ - próton.

UV – radiação ultra violeta.

MD – dinâmica molecular.

EDTA –

R-X – radiação X.

nm – nanômetros.

μ l – microlitros.

ΔH_{vH} – entalpia de van't Hoff.

$T_m = T_{1/2}$ – temperatura em que está presente 50% de cada espécie participante da reação observada ($N \rightleftharpoons D$, $D \rightleftharpoons I$ ou $N \rightleftharpoons I$).

Δn_{H^+} - variação do número de prótons.

Δn_w – variação de hidratação.

Δn_{Cl^-} - variação do número de cloretos.

n_w^i e n_w^p - número de moléculas de água ligadas ao estado intermediário e ao estado desnaturado, respectivamente.

n'_i e n''_i - número de moléculas de soluto ligadas ao estado intermediário e ao estado desnaturado, respectivamente.

n' e n'' - número de ligantes ligados aos estados intermediário e desnaturado, respectivamente.

Cl^- - íon cloreto.

$\log(K) = \log(K_{\text{obs}})$ - logaritmo da constante de equilíbrio observada.

$\log(a_w)$ - logaritmo da atividade de água.

$\log[\text{Cl}^-]$ - logaritmo da concentração de cloreto.

$\log(a_s)$ - logaritmo da atividade do soluto.

$\log(K_t)$ - logaritmo da constante de equilíbrio térmico.

$\log(K_c)$ - logaritmo da constante de equilíbrio com variação da concentração de soluto.

$\Delta U^{\text{D-I}}$ - variação do volume excluído.

$U^{\text{I}}, U^{\text{D}}$ - volume excluído das conformações intermediária e desnaturada, respectivamente.

ΔU_{obs} - variação do volume excluído observado.

$\Delta U_{\text{calculado}}$ - variação do volume excluído calculado.

V_s - volume molar do soluto.

$[\text{solute}]$ - concentração do soluto.

$[\text{N}], [\text{D}], [\text{I}]$ - concentração das espécies nativa, desnaturada e intermediária respectivamente.

Palavras não Traduzidas

“**likage**” - conectividade.

“**Coil**” ou “**random coil**” - referente ao estado aleatório de uma proteína.

“**molten globule**” - glóbulo “derretido” em relação ao estado nativo ou conformação intermediária de uma proteína.

“**stress**” osmótico - uma pressão osmótica acentuada.

ABSTRACT

In this work we have studied the effect of adding osmolytes of different chemical groups and sizes on the folding-unfolding reaction of apomyoglobin (apoMb) at acid pH using circular dichroism. In pure water at neutral pH, apoMb is fully folded (N state) and unfolds in two steps by lowering the pH. Between pH 5 and 4 the protein changes conformation from the Native state to an Intermediate, partially folded state. Lowering the pH below 4 the protein further unfolds to the Denatured state D. We show that different sugars, polyols and poly-ethylene-glycols stabilize the folded conformation of the protein against pH denaturation. We have shown that, from pH 2.4 to pH 2.5, the apoMb is fully denatured in pure water, and the addition of those osmolytes induces refolding, and stabilizes the Intermediate state of this protein. The stabilization of the I state by inert solutes is similar to the well reported stabilization produced by high salt concentration. The I state stabilized at saturating solute concentration has the same degree of secondary structure for all nine osmolytes used in this study, and agree with that measured for apoMb at low pH and high NaCl concentration, suggesting that the I state of apoMb represents a stable thermodynamic conformation of the protein. We have also determined the dependence of the equilibrium constant between state D and I, at fixed pH, on solute concentration. These data were analyzed considering the effect of water activity on the equilibrium in order to determine the hydration change associated with the folding reaction. We have found that the hydration change associated with coil to helix transition increases linearly with the partial specific volume of the solutes used to buffer water activity, indicating that the cooperativity of the reaction increases with solute sizes. We have interpreted these data suggesting that solute to protein excluded volume effects are responsible for the observed increase in cooperativity since the conformational space of the coil decreases with solute size and concentration forcing the collapse of the denatured protein. We were able to show that this athermal collapse induced by adding inert solutes to the protein solution reduces the difference between the standard chemical potentials of the denatured and the refolded protein but not change their sign. Therefore, excluded volume effects can not explain the stabilization of the Intermediate state in relation to the Denatured

state of the protein, which requires a change in sign on the Gibbs free energy difference. We propose that the main driving force stabilizing the secondary structure of the I state at any solute concentration is the dependence of the chemical potential of each state of the protein on water activity, which is proportional to the number of water molecules of hydration. In conclusion, the proposed model allows one to explain both the cooperativity of helix formation and the increase on the stability of helix formed structures at low pH and low water activity. The consequent corollary of this model is that the initial step of apoMb folding reaction, i.e., the formation of some important helices, is governed by entropic effects related to the vastness of the conformational space accessible to the unfolded protein, and by the energetic cost of hydrogen bond formation between intra-molecular groups and between these groups with the solvent water.

RESUMO

Neste trabalho estudamos o efeito da adição de osmólitos, de diferentes grupos químicos e de diferentes tamanhos, sobre a reação de enovelamento-desenovelamento da apomioglobina (apoMb) em meio ácido, utilizando dicroísmo circular. Na água pura e a pH neutro, a apoMb está totalmente enovelada (estado N) e desenovela-se em duas etapas quando o pH é diminuído. Para valores de pH entre 5 e 4 a proteína muda da conformação nativa para 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). Mostramos que diversos açúcares, polióis e poli-etileno glicóis estabilizam a conformação enovelada da proteína contra a desnaturação ácida. Para valores de pH entre 2,4 e 2,5, a apoMb está maximamente desnaturada em água pura e a adição dos solutos inertes induz o reenovelamento estabilizando o estado intermediário desta proteína. A estabilização do estado I por solutos é semelhante à estabilização produzidas por altas concentrações de sal como tem sido reportado na literatura. O estado I, estabilizado em soluções saturantes de osmólitos a pH ácido, tem o mesmo conteúdo de estrutura secundária (hélices α) para todos os solutos usados. Estes valores estão concordantes com as medidas feitas em sal a pH baixo, sugerindo que este estado I da apoMb representa uma conformação termodinâmica estável e estruturada da proteína. Determinamos também a dependência da constante de equilíbrio entre os estados D e I, a pH fixo, com a concentração do soluto. Estes dados foram analisados considerando o efeito da atividade de água sobre a constante de equilíbrio, objetivando determinar a variação de hidratação na reação de enovelamento. A variação de hidratação encontrada na transição hélice-coil aumenta linearmente com o volume específico parcial dos solutos utilizados para modificar a atividade da água, indicando uma maior cooperatividade com o tamanho de solutos maiores. Nossa interpretação é que o aumento observado da cooperatividade pode ser devido ao efeito de volume de exclusão, pois o espaço conformacional do coil diminui com o tamanho e concentração do soluto, forçando o colapso da proteína desnaturada. Foi possível mostrar que esta colapso atérmico induzido pela adição de

solutos inertes à solução protéica, reduz a diferença entre os potenciais químico padrão da proteína desnaturada e enovelada, mas não muda o seu sinal. Portanto, efeitos de volume exclusão não podem explicar a estabilização do estado I em relação ao estado D da proteína, o que exige uma mudança de sinal na variação da energia livre. Propusemos que a principal fonte de estabilização da estrutura secundária do estado I, é a dependência do potencial químico de cada estado da proteína com a atividade de água, que é proporcional ao número de moléculas de água de hidratação. Em conclusão, o modelo proposto permite explicar tanto a cooperatividade de formação da hélice como o aumento da estabilidade das hélices formadas a baixo pH e baixa atividade de água. O corolário conseqüente deste modelo é que o passo inicial de enovelamento da apoMb, isto é, a formação de algumas hélices importantes, é governado por efeitos entrópicos relativos a amplitude do espaço conformacional acessível à proteína desenovelada, e pelo custo energético na formação das pontes de hidrogênio tanto entre grupos intramoleculares como desses grupos com a água de solvatação

CAPÍTULO 11 INTRODUÇÃO

CAPÍTULO I INTRODUÇÃO



1.1 Apresentação e Objetivos

A contribuição energética da solvatação para a estabilidade de macromoléculas biológicas e para o controle das reações bioquímicas permanece pouco entendida, apesar de sua importância para a completa compreensão dos mecanismos de enovelamento e reatividade destas moléculas. Esta lacuna está sendo superada através de uma metodologia experimental adequada para o estudo destas reações em diferentes atividades de água, conseguidas pela adição de osmólitos (açúcares, polióis, certos amino ácidos e polietileno glicóis) à solução, como agente modificador o potencial químico da água. Associado a este procedimento foi proposto por Colombo e colaboradores (1992) a utilização das relações de “linkage” químico, para descrever e analisar os parâmetros de equilíbrio termodinâmico com a variação do potencial químico da água, e assim, calcular o número de moléculas de água associadas a estas reações. Esta metodologia foi originalmente usada para determinar a variação de hidratação de hemoglobinas (Hb) durante a transição R-T (estados oxigenado e desoxigenado da Hb) induzida por oxigenação e demonstrar que esta variação de hidratação está associada às mudanças conformacionais da Hb induzidas pela ligação de O_2 (Colombo et al, 1994 e Colombo e Bonilla-Rodrigues, 1996). Posteriormente, este método de “stress” osmótico foi utilizado para mostrar: a) a contribuição da solvatação ao potencial redox para a Hb e mioglobina (Mb) (Colombo, 1996 b); b) a estabilidade do estado intermediário do enovelamento do citocromo-c (Neves, 1996); c) a energética de interação de drogas com DNA (Ruggiero Neto e Colombo, 2000), entre outros. Neste trabalho investigamos o efeito de dez solutos diferentes, quanto à função química e quanto ao tamanho, na reação de enovelamento da apomioglobina (apoMb) a diferentes valores de pH.

A apoMb é uma proteína globular na região de pH neutro, derivada da Mb após a retirada do grupo heme. Com a modificação do pH da solução a apoMb desnatura-



se, tanto na região de pH ácido como na região de pH básico. Na transição do estado nativo (N) para o estado desnaturado (D) a apoMb assume uma conformação intermediária (I), geralmente, como um estado de glóbulo “derretido” (MG-molten globule). O deslocamento do equilíbrio entre estes estados devido à mudanças no pH da solução e/ou pela adição de solutos neutros pode ser acompanhado por medidas de dicroísmo circular (DC).

Neste trabalho, demonstramos que a adição de diferentes solutos, com tamanhos distintos, estabilizam estados mais compactos da apoMb contra a desnaturação ácida e induz o re-enovelamento do estado desnaturado para o estado intermediário a valores baixos de pH.

E o objetivo central deste trabalho foi investigar, através da comparação de modelos termodinâmicos de hidratação e de volume excluído, o mecanismo pelo qual a adição dos diferentes solutos neutros induzem a estabilização da apoMb em seus estados mais compactos.

Segue, para a compreensão das reações de enovelamento/desenovelamento de proteínas, uma revisão das contribuições científicas importantes para o entendimento do processo de desnaturação/renaturação protéica em sua visão geral e específica. De modo mais detalhado aborda-se o equilíbrio entre as conformações nativas (N), intermediárias (I), e desnaturadas (D), sob diferentes condições desnaturantes/estabilizantes para diversas proteínas globulares bem como para a apomióglobina (apoMb) que é a macromolécula alvo deste trabalho. Estão descritas ainda as pesquisas já realizadas e em andamento, neste laboratório, analisadas através do método do choque osmótico. Estes tópicos juntamente com o apoio dos modelos termodinâmicos para a análise da estabilização protéica em soluções multicomponentes, formam o suporte referencial para a discussão e interpretação dos resultados apresentados.

1.2. Os Estados Desnaturado e Nativo das Proteínas



Na primeira década deste século, já era observado o processo de desnaturação protéica devido às acentuadas modificações das propriedades da macromolécula durante aquecimento ou acidificação. Já no início dos anos trinta foi mostrado que algumas daquelas modificações podiam ser revertidas, inclusive com a recuperação das funções biológicas, surgindo então o processo de renaturação protéica. A natureza provável destas reações, como as variações conformacionais envolvendo contração e expansão da cadeia polipeptídica, já era apontada naquela época. Entretanto a cadeia completa de amino ácidos não era ainda conhecida (Richards, 1992).

Nas décadas seguintes, de 40 e 50, o movimento na biologia molecular foi ainda maior, sendo proposto um modelo de estrutura básica da dupla hélice do DNA e o delineamento da biosíntese das cadeias polipeptídicas a partir do dogma central: DNA → RNA → proteína. A determinação da seqüência de amino ácidos da primeira proteína (Sanger, 1952) deixou claro que a estrutura básica covalente das proteínas era uma cadeia peptídica linear, e que a seqüência de resíduos de amino ácidos era única para cada proteína. A partir daí, buscar entender como a seqüência primária determina o enovelamento das proteínas globulares para sua estrutura nativa e funcional, tem sido o trabalho de muitos pesquisadores. Com isto, procura-se compreender o enovelamento protéico do ponto de vista físico-químico, tal que, conhecidas a composição e as propriedades do solvente no qual ela se encontra, seja possível prever como se processa a desnaturação ou renaturação protéica, com a perda ou recuperação da função biológica.

Em 1968, Tanford ressaltou que a conformação nativa de uma proteína está em equilíbrio com outras conformações possíveis e que transições reversíveis de uma conformação para outra aconteciam quando o ambiente fosse alterado. Estes outros estados conformacionais teriam maior liberdade de movimento interno para a cadeia polipeptídica e isso conferiria à conformação nativa uma estabilidade frágil por ser uma estrutura altamente organizada. Notou ainda, que uma ruptura da conformação nativa, em proteínas,



é um processo altamente cooperativo, incluindo etapas em que apenas parte da molécula protéica estaria envolvida (Tanford, 1968).

Anfinsen mostrou que a ribonuclease desnaturada por uréia, com suas “pontes” dissulfeto bloqueadas, volta espontaneamente à sua forma nativa ao ser trazida para uma solução na ausência do desnaturante, restaurando sua estrutura e atividade. Com isto demonstrou que o enovelamento da cadeia protéica para uma estrutura única tridimensional é um processo reversível em determinadas condições experimentais. Estes resultados introduziram o conceito de enovelamento protéico correspondente a uma transição termodinamicamente dirigida de um estado macroscópico desordenado (desnaturado) para um estado altamente ordenado, chamado estado nativo da macromolécula protéica (Anfinsen, 1973).

Este conceito colocou então algumas questões sobre quais seriam as forças e quais seriam os mecanismos que dirigem esta transição. Em relação aos mecanismos de enovelamento, uma questão importante era se a proteína para enovelar-se, procuraria todas as conformações possíveis para encontrar a estrutura de energia mínima (Levinthal, 1968), ou se o enovelamento estaria codificado na sua sequência primária, passando, portanto, por etapas definidas (Ptitsyn, 1993). O modelo esquemático de enovelamento proposto por Ptitsyn com estágios para o enovelamento pressupõe: a) a formação de regiões flutuantes em torno de segmentos nativos progredindo para um estado compacto com padrão quase nativo; e b) uma transição deste estado intermediário para o estado nativo rígido.

O processo de enovelamento/desenovelamento protéico (figura 1.2.1) passa a ser visto e descrito em termos cinéticos, termodinâmicos e estruturais pelo qual um polipeptídeo desnaturado enovela-se para a conformação nativa definida e ativa biologicamente. O fato de muitas proteínas re-enovelarem para seus estados nativos, sob determinadas condições e na ausência de toda a maquinaria celular, permitiu e impulsionou

a pesquisa “*in vitro*” que muito tem corroborado para o entendimento do processo “*in vivo*” (Freedman, 1992).

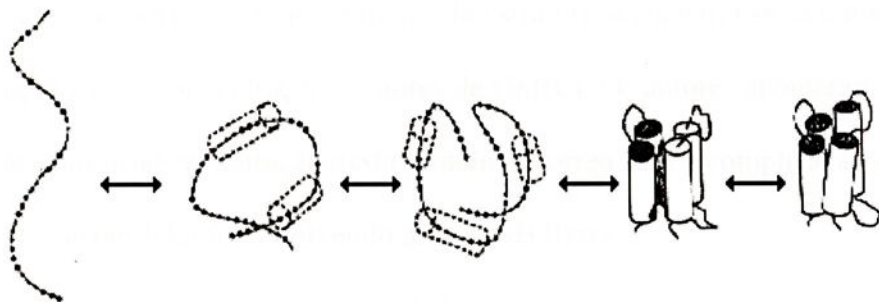


Figura 1.2.1 Enovelamento-desenovelamento protéico, uma transformação do estado totalmente desnaturado (aleatório) ao estado estruturado nativo

1. 3. O Estado Intermediário e sua Estabilidade por Íons e Temperatura

As evidências mais claras da existência de intermediários na desnaturação protéica, entre a estrutura nativa e a estrutura completamente desnaturada (random coil), foram mostradas por Tanford, em que os processos de desnaturação induzidos por pH e temperatura são distintos daqueles obtidos por uréia e cloreto de guanidino (GnHCl). A idéia importante que surgiu então foi que os estados desnaturados não eram todos estruturalmente equivalentes, isto é, coexistiam diferentes formas não completamente desnaturadas com formas totalmente desnaturadas, indicando que a desnaturação podia ocorrer desacoplada do desenovelamento. E ainda que, diferentes agentes desnaturantes podiam induzir a formação de diferentes estados protéicos “parcialmente desenovelados” (Tanford, 1970).

Wong e Tanford, em 1973, mostraram que a desnaturação da anidrase carbônica exibe pelo menos duas transições cooperativas induzidas por uréia ou cloreto de guanidino medidas por experimentos de equilíbrio e cinética. Os dados de equilíbrio

sugeriram uma perda da estrutura nativa observada por uma pequena liberação das cadeias laterais aromáticas no início da desnaturação por GnHCl que foram acompanhadas por dicroísmo circular. Essa etapa ocorreu como um processo separado da exposição dos grupos aromáticos ao solvente, pois a ruptura da estrutura secundária se deu num terceiro estágio da reação e para concentrações maiores de GnHCl . Os autores apontaram ainda que a reação de desnaturação-renaturação desta proteína ocorreu sem a complicação das pontes disulfeto ou de reações laterais envolvendo grupos SH livres.

A estrutura terciária rígida é dependente, em todos os seus detalhes, da sequência de amino ácidos e portanto é específica para cada proteína. Sabe-se que a estrutura terciária rígida é sustentada pelo ajuste firme das cadeias laterais sobre o interior hidrofóbico (“core”) da proteína, por ligações de curto e longo alcances (Levitt e Chothia, 1976).

As propriedades físicas dos intermediários começaram a ser melhor entendidas comparando as diferentes formas de obtê-las. Dolgik e colaboradores (1981) mostraram por medidas de troca de hidrogênio-deutério por ressonância magnética nuclear bidimensional de ^1H (2DNMR) e dicroísmo circular na região dos resíduos aromáticos, que a forma ácida da lactalbumina- α bovina era quase tão compacta quanto sua forma nativa, isto é, com sua estrutura secundária quase nativa. Por outro lado, não apresentava estrutura terciária rígida mas tinha mobilidade intramolecular muito maior que a do estado nativo. Era um estado físico distinto, em que existia uma combinação de propriedades dos estados nativos e dos estados desenovelados, e que foi chamado de estado “molten globule” (MG) por Ohgushi e Wada em 1983.

Para procurar entender os mecanismos da renaturação da estrutura protéica, Goto e colaboradores (1990 a e b) seguiram as transições de re-enovelamento dos estados ácidos-desnaturados do citocromo c e da apoMb para um estado intermediário, (A), mais compacto, induzido por sais, através de medidas da elipticidade em 222 nm. O mecanismo



exato de estabilização ou desestabilização da estrutura protéica é desconhecido. A ligação de ânions aos grupos carregados positivamente é um dos fatores responsáveis pela formação do estado A. Como existe este efeito dos ânions para baixas concentrações de sais, os autores sugerem a ligação de ânions à proteína como fator de estabilização de sua estrutura e não o efeito de ânions sobre a estrutura da água, pois este último requereria uma concentração muito alta de sal. Concluíram, ainda, que a ligação eletrostática de ânions aos sítios carregados positivamente é a principal causa das transições conformacionais induzidas na macromolécula.

Ptitsyn, 1992, resume suas idéias lançadas na década de 70, em que o estado MG era especificado como:

“uma estrutura compacta intermediária que ainda é diferente da estrutura protéica nativa única e cuja formação é determinada principalmente por interações não específicas dos resíduos de amino ácidos com o seu ambiente (água e o interior hidrofóbico), isto é, por interações hidrofóbicas”.

Esta hipótese implicava que:

“a estrutura compacta intermediária fosse formada pela reunião de regiões embrionárias pré-existentes na cadeia possuindo estrutura secundária e que arranjos mútuos das regiões com estas estruturas satisfizessem o critério simples de procurar o máximo de resíduos laterais hidrofóbicos em contacto com a água e próximos de seus arranjos estabilizados por interações de longo alcance entre os resíduos vizinhos no espaço. na estrutura compacta final” (Ptitsyn, 1973).

Atualmente, é consenso a existência de intermediários, ou MG, como estados transientes parcialmente ordenados durante o enovelamento e que podem ser caracterizados por suas propriedades cinéticas e termodinâmicas ou por métodos espectroscópicos.

Num estudo de revisão sobre os estados intermediários do enovelamento protéico, Privalov em 1996, ressaltou estar clara a idéia do enovelamento de proteínas globulares associadas à compactação da cadeia polipeptídica, mas ficava a questão se o



colapso destas cadeias seria necessário ou se daria num processo por passos, facilitando o enovelamento. A discussão era que a condensação levava a arranjos próximos do estado nativo, mostrando que no processo de enovelamento o importante não é o colapso direto da cadeia polipeptídica num glóbulo, mas sim a condensação desta cadeia para a estrutura quase nativa. Os estados intermediários seriam estados transientes e extremamente instáveis, podendo possuir algumas poucas interações específicas de longo alcance e que já não seriam cooperativas neste estágio final de enovelamento (Privalov, 1996).

1.4. Estudos com a Apomioglobina (apoMb) e outras Proteínas Globulares Pequenas

O estudo da estabilização do estado de “molten globule”, (MG), da apoMb por Goto e colaboradores (1990a e b) mostrou que o ponto médio da transição conformacional na presença de sais se dava em valores de pH mais baixos a medida que a concentração do sal aumentava. E ainda, que o conteúdo de hélices α no estado MG estabilizado por tricloroacetato de sódio (NaTCA) era maior do que para o cloreto de sódio (NaCl). Outros estudos, deste mesmo grupo de pesquisadores, mostraram cooperatividades distintas para o MG estabilizado por NaTCA e NaCl, quando induzidas por cloreto de guanidino. Estes resultados demonstraram que NaTCA e NaCl estabilizam estados de MG estruturalmente distintos e que o MG estabilizado por NaTCA tem segmentos helicoidais adicionais. Eles mostraram ainda que o estado MG da apoMb estaria localizado entre um estado altamente ordenado e outro relativamente desordenado, dependendo das condições experimentais empregadas. Finalizando, os autores sugerem que conforme essas condições, algumas proteínas desenovelam segundo um modelo de desnaturação gradual entre os estados finais totalmente enovelados, (N), e totalmente desenovelados, (D). Este mecanismo é distinto do modelo de dois estados, no qual a transição $N \leftrightarrow D$ é considerada segundo um processo “tudo ou nada” (cooperatividade infinita) e requer a formulação de



teorias de enovelamento protéico mais gerais que possam vir a acomodar a existência de vários estados de MG (Goto e Fink, 1990; Nishii *et al*, 1995).

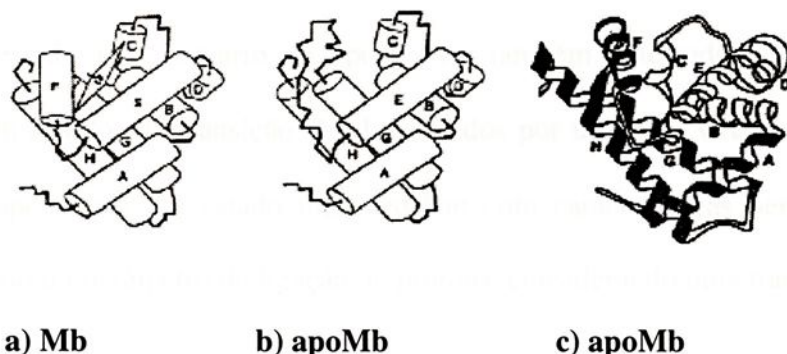


Figura 1.4.2 Representações das estruturas da Mb (ou holoMb) e da apoMb. A figura **a** mostra a localização do grupo heme e as oito hélices estão indicadas pelas letras A – H e figura **b** aponta a hélice F desenovelada, assumindo que a retirada do grupo heme poderia ser assim pensada (Fontana *et al*, 1997). A figura **c** simula a estrutura da apoMb a partir da Mb (Hughson *et al*, 1990).

A caracterização estrutural de intermediários parcialmente enovelados da apoMb e inclusive sua estabilidade tem sido muito pesquisada e algumas destas descobertas foram publicadas por Baldwin e colaboradores na década de noventa. Um primeiro intermediário parcialmente enovelado, analisado por 2DNMR de ^1H , mostrou regiões em que os prótons estão protegidos de troca nas hélices A, G e H. Com base nestes resultados e na estrutura tridimensional da mioglobina (Mb) nativa os autores apresentaram um modelo estrutural de intermediário parcialmente enovelado que mantém um subdomínio compacto enquanto o restante da molécula protéica poderia estar essencialmente desenovelada (Hughson *et al*, 1990).

Num estudo subsequente, (Hughson *et al*, 1991), os intermediários da apoMb foram confirmados por ensaios com mutações introduzidas em sítios das hélices A-H e G-H. Foi observada a desestabilização da apoMb nativa com relação ao intermediário I e em contraste, a estabilidade de I em relação a mutação. Estes resultados indicaram que a conformação I não foi estabilizada por interações quase nativas das hélices A-H e G-H. Do mesmo grupo, Loh e colaboradores (1995) encontraram um segundo intermediário MG, I_2 ,

da apoMb no processo de enovelamento em que estudavam a estabilidade de sua estrutura por DC e NMR. Este novo intermediário apresentou a estrutura quase nativa das hélices A, G e H mais estáveis e com a incorporação da hélice B ao MG.

O estado intermediário da apoMb foi também detectado por Barrick e Baldwin, 1993, em estudos da transição $D \rightleftharpoons I$ induzidos por uréia a 0°C em meio ácido. Estes resultados apontaram um estado intermediário com características bem definidas permitindo o cálculo do parâmetro de ligação de prótons, considerando uma transição entre os dois estado finais D e I.

Goto e Fink (1994) classificaram as proteínas globulares monoméricas, entre elas a apoMb, com relação aos diferentes tipos de comportamento conformacional em: aquelas que iniciam a desnaturação na ausência de sais e com valores de pH entre 3 e 4, passando por um estado A (MG) a pH mais baixo; outras, que mesmo em titulação por HCl formam diretamente o estado A (MG) em pH aproximadamente igual a 3 e; um outro tipo, cuja desnaturação não ocorre nem mesmo a $pH = 1$.

Estudos recentes sobre a estrutura de estados intermediários do reenovelamento da apoMb, realizados por 2DNMR e por DC stopped-flow, são concordantes com um equilíbrio prévio entre o estado D e o estado MG. A formação de um intermediário precoce na cinética de enovelamento da apoMb mostrou que ela se enovela cooperativamente num tempo menor que 5 ms e as primeiras ligações das estruturas secundárias se dá entre as hélices A, G e H seguida da hélice B num tempo maior e igual a 1 s, e depois as hélices C e E e a alça DC consumiam um tempo de 2,5 s (Jennings e Wright, 1993).

A apoMb forma um estado enovelado, parcialmente compacto e estável sob condições ácidas que é o intermediário MG (Griko e Privalov, 1994) e que está levemente estendido em relação à sua forma nativa cujos raios de giração são de $23 (\pm 2) \text{ \AA}$ e $19 (\pm 1) \text{ \AA}$, respectivamente (Gast *et al*, 1994) e com as hélices A, G e H estáveis (Hughson *et al*,



1990). Entretanto uma questão permaneceu: quão compacto este intermediário está comparado ao estado nativo? Esta questão levou Eliezer e colaboradores (1995) a proporem a verificação direta da variação do raio de giração (R_g) enquanto uma proteína se enovela, com equipamentos de alta resolução temporal utilizando medidas de espalhamento de Raio-X à baixos ângulos com radiação síncroton. Determinaram o raio de giração com resolução temporal de ms à segundos e com este processo de maior acuidade nas medidas, foram encontradas resultados diferentes em 1 Å (para o R_g) com relação aos apresentados anteriormente.

Estruturas compactas do MG no desenovelamento da apoMb, induzidas por temperatura, foram verificadas por espalhamento de raio-X a baixos ângulos (SAXS) e por dicroísmo circular no UV próximo e distante Gast e colaboradores (1994). Foram discutidos os dados com referência aos estados quase nativos e altamente desenovelados, e foi caracterizado o estado intermediário da apoMb. Entretanto, menos compacto quando comparado aos estados de MG do cyt-c e da lactalbumina α . As medidas de SAXS, mostraram que a conformação MG da apoMb é constituída de dois domínios estruturais, um mais enovelado que o outro. Este resultado está em concordância com a existência do sub-domínio formado pelas hélices A, G e H e de uma outra parte essencialmente desenovelada como observada por DC e NMR descritos pelo grupo de Baldwin.

Dobson e colaboradores (1994) conseguiram importantes informações complementares pela associação de diferentes técnicas, incluindo a espectroscopia por ressonância magnética nuclear e espectrometria de massa combinadas com experimentos de fluorescência e dicroísmo circular para a lizosima. Esta é uma proteína globular pequena e serviu para mostrar que o refazer da estrutura secundária se inicia logo após o processo de desnaturação em pH = 2. Houve evidências de que uma quantidade significativa de água já era excluída para formar uma estrutura relativamente compacta e que poderia desencadear a formação das ligações de hidrogênio das estruturas secundárias.



Como essas interações estabilizam os segmentos estruturais localizados, etapas mais lentas do enovelamento passam a ocorrer dependendo da especificidade das cadeias laterais em se tornarem mais firmemente unidas. Somente nesses últimos estágios vai existir diminuição da entropia conformacional que é compensada pelas forças não covalentes favoráveis dentro do estado nativo ordenado (Dobson *et al*, 1994).

Por métodos de observação rápida do enovelamento, Ballew e colaboradores (1996) seguiram o colapso inicial da apoMb numa escala de tempo de 15 ns a 0,5 ms. O equipamento foi montado com uma cela especial em que o feixe ultra violeta dirige a fluorescência, um diodo a laser de baixa potência monitora as variações de temperatura, cujo aquecimento é feito por um feixe infra vermelho. A nova técnica acompanha a dinâmica do processo de enovelamento da proteína desde os passos mais precoces até o estado compacto, numa varredura única, em tampão aquoso padrão, que se completa em 20 μ s. A forma compacta alcançada neste tempo envolve as hélices A(GH) e grande movimentação do esqueleto polipeptídico no solvente.

1.5. A Estabilidade Protéica pela Adição de Osmólitos.

Os organismos vivos, que em geral sofrem choques ambientais tais como: calor, desidratação ou variações extremas das condições da solução como o aumento da concentração de sais, devem mesmo assim manter a atividade biológica. Parece que, nestes organismos o principal significado da proteção contra o estresse, é a produção de dezenas ou centenas de milimoles de certos compostos de baixo peso molecular dentro das células, que são conhecidos como osmólitos (açúcares, polióis, amino ácidos, etc.). Estudos de proteção contra a perda da atividade associada à ocorrência natural de osmólitos foi caracterizada através da atividade e estabilidade enzimática na presença de até 1 molar de osmólito protetor quando o sistema estava sujeito ao estresse térmico ou na presença de uréia. (Yancey *et al*, 1982).



A ocorrência natural de osmólitos com habilidade para proteger as proteínas contra a desnaturação, sem perturbar suas funções metabólicas, parece promover uma vantagem importante e seletiva na adaptação dos organismos às modificações do meio. Tal vantagem seletiva reduziria, enormemente, a necessidade de modificações genéticas dos organismos em resposta ao estresse ambiental. Estes estudos parecem suportar a premissa de que os osmólitos estabilizam as proteínas contra o calor e os agentes desnaturantes, sugerindo que uma maior e mais detalhada investigação seja realizada para estabelecer o alcance e as características destes fenômenos (Santoro et al, 1992).

As reações envolvendo as proteínas e os componentes dos solventes, investigados nas décadas de 70 e 80, eram colocadas em termos da ligação direta deste componente à proteína ou de uma ação indireta da estrutura e propriedades do solvente sobre a proteína.

Back e colaboradores (1979) estudaram o aumento da estabilidade térmica de proteínas na presença de açúcares e polióis por calorimetria. Os fatores estabilizadores observados que podem ser alterados pela presença destes solutos são: as ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas e hidrofóbicas, e ainda cross-linking, complexação com metais, ligações de íons e cofatores. Eles mostraram que havia um “derretimento” da estrutura cooperativa das “pontes” de hidrogênio em que, sucessivamente, a água competia tanto como doadora como receptora de H^+ com o esqueleto e grupos das cadeias laterais da proteína. Os grupos hidroxilas dos açúcares e polióis poderiam competir, mas não de maneira mais eficiente que a água, pois o efeito estabilizante do glicerol era menor comparado ao do sorbitol para uma mesma concentração de grupos hidroxilas. A presença destes solutos em solução abaixa o valor da constante dielétrica e as interações poderiam ser mais fortes nestes ambientes, porém esta contribuição deveria ter um efeito muito pequeno. O fato dos efeitos estabilizadores da sacarose e glicerol sobre a lisozima terem sido quase os mesmos a pH 7 e a pH 3, sugeriram que qualquer contribuição das interações



eletrostáticas para a estabilização protéica deveriam ser mínimas. Como mostrado ainda por estes autores, as interações hidrofóbicas entre pares de grupos hidrofóbicos eram mais fortes em soluções de sacarose ou glicerol do que em água pura, sugerindo ser este o mecanismo pelo qual os açúcares e polióis estabilizariam as proteínas em relação à desnaturação por calor. Mas, para generalizar, ficaria faltando responder a questão seguinte: em que extensão os açúcares e polióis fortaleceriam as interações hidrofóbicas? Os efeitos destes solutos sobre a estrutura da água vistos por espectroscopia e termodinâmica mostraram que a interação com a água iria depender da estrutura molecular deles.

Estudos termodinâmicos e cinéticos do efeito estabilizador da sacarose sobre a desnaturação térmica da quimotripsina- α e da ribonuclease A foram feitos como uma função da concentração deste soluto. Foram medidas feitas por densitometria e analisadas pela teoria termodinâmica de multicomponentes que, na presença de sacarose, indicaram alterações nas interações proteína-solvente. Os autores apontaram ainda que: a) a sacarose não induziu mudança conformacional, mostrando apenas pequena variação do espectro DC da RNase A; b) este soluto era preferencialmente excluído do domínio protéico elevando a energia livre do sistema, significando que o estado desnaturado da proteína era menos favorável na presença da sacarose; c) o mecanismo apontado era que a exclusão da sacarose do domínio protéico estava relacionado com a força coesiva no sistema solvente (sacarose + água), pois as observações experimentais estavam relacionadas com o efeito deste soluto sobre a tensão superficial da água (Lee e Timasheff, 1981).

No estudo da estabilização protéica por outros açúcares (lactose e glicose), sobre diversas proteínas (RNase A, lisozima, quimotripsinogênio, lactoalbuminas β , albumina de soro bovino e ovoalbumina), utilizando densitometria de alta resolução, foi mostrado que as proteínas eram preferencialmente hidratadas, que a variação de energia



livre desfavorável aumentava com o aumento da área de superfície protéica sugerindo sua estabilização por associação (agregação) entre as proteínas. A correlação do parâmetro de interação preferencial com o efeito dos açúcares sobre a tensão superficial da água levou os pesquisadores à conclusão de que a perturbação da energia livre (na superfície) desempenhava um papel predominante na interação preferencial destes solutos com as proteínas. Outros fatores de contribuição foram o volume excluído dos açúcares e a natureza química da superfície protéica. (Arakawa e Timasheff, 1982).

O efeito do solvente mais polietileno glicol, (PEG), sobre as proteínas foi também estudado por medidas de densidade e analisado pela teoria de multicomponentes. Os resultados mostraram que as proteínas eram preferencialmente hidratadas nas condições do experimento, isto é, o PEG era excluído do domínio protéico. A introdução da proteína desestabilizou termodinamicamente o sistema solvente (água + PEG) e a magnitude desta instabilidade cresceu com o aumento da concentração do PEG. Estas observações levaram à conclusão de que num sistema PEG-água, a presença da proteína acarretava interações termodinâmicas desfavoráveis que promovia a separação de fases (Lee e Lee, 1987).

Arakawa e colaboradores (1990) estudaram a reação de estabilização para as proteínas lactoalbumina- β , albumina de soro bovino e lisozima em diferentes concentrações do sal $MgCl_2$, e diversos intervalos de pH, por medidas de densitometria a 20°C. Os resultados foram analisados em termos do balanço entre a ligação do sal a proteína e/ou sua exclusão preferencial dos domínios protéicos, devido ao aumento da tensão superficial da água pela adição do sal. Os valores de energia livre de transferência da proteína em água para a solução salina, e no precipitado, calculados mostraram dependência da concentração de sal. Isto indicou, segundo os autores, que a natureza das interações entre a proteína e os componentes do solvente é a mesma em solução e no precipitado, isto é, no estado sólido, o que implica em haver mudanças na estrutura protéica durante a precipitação. Concluíram então que quando a ligação iônica é fraca, a

contribuição predominante na interação proteína-sal é a exclusão preferencial (Arakawa et al, 1990).

Liu e Bolen, 1995, mediram a energia livre de transferência de amino ácidos individuais em soluções contendo sacarose e sarcosina e correlacionaram estas dados com a variação de energia livre de desnaturação da RNase A, em água e em co-soluções destes osmólitos. Neste estudo as autores apontaram como principal fator a opor-se à desnaturação protéica 3m co-solventes é a exposição fortemente desfavorável do esqueleto polipeptídico à solução contendo osmólitos.

Num estudo comparativo das variações da solvatação preferencial durante a desnaturação térmica da lisozima, na presença de diferentes solutos orgânicos, medida por microcalorimetria de varredura, Krovgrin e Potekhin, 1997, encontraram que para 5 dos 6 sistemas estudados (água + metanol, etanol, propanol, acetona e p-dioxano, dados da literatura e água + dimetil sulfóxido, dados dos autores), a entrada de moléculas do co-solvente na camada de solvatação da proteína durante a é responsável pela variação do parâmetro de solvatação preferencial. Nenhum parâmetro de solvatação preferencial da lisozima em solução com o dimetil sulfóxido foi observada, indicando que grupos carregáveis expostos na desnaturação não contribuem, significativamente, para a interação preferencial da superfície protéica com o co-soluto.

A indução de intermediários do citocromo-c, desnaturado por ácido, pela adição de açúcares de diferentes tamanhos ao meio, foi estudada por Davis-Searles e colaboradores (1998), por medidas de dicroísmo circular. Estes autores caracterizaram a estrutura e estabilidade do estado intermediário induzido pela presença dos açúcares, e concluíram que o efeito estabilizador é consistente com o aumento da repulsão estérica entre a proteína e os componentes da solução, porém, por um mecanismo distinto dos sais.

Kamiyama et al, 1999, estudaram a indução de intermediário do citocromo-c na presença de osmólitos (polióis) a pH 2, por medidas de dicroísmo circular, volume



molar específico e calorimetria de varredura diferencial. Os intermediários obtidos mostraram dependência da concentração e tamanho do comprimento da cadeia do poliol utilizado. Os resultados foram interpretados sugerindo que os polióis podem estabilizar o estado intermediário desta proteína valorizando as interações hidrofóbicas sobre a repulsão eletrostática entre resíduos carregados. O mecanismo de estabilização deste estado intermediário foi discutido levando em consideração as interações preferenciais do soluto com a proteína e pressão osmótica do meio comparada àquela obtida por sal.

1.6. O Efeito do “Stress” Osmótico na Estrutura e Função de Proteínas.

A contribuição energética da hidratação macromolecular ao potencial químico das proteínas pode ser considerada qualitativamente levando-se em conta que a diminuição da atividade de água desloca o equilíbrio conformacional para estruturas menos hidratadas. Quantitativamente, estas contribuições podem ser aferidas como proposto por Colombo et al, 1992 e Kornblat, 1990, considerando o equilíbrio entre duas conformações com hidratações diferentes e cuja diferença de hidratação entre elas é dada via equações de “linkage” químico por:

$$\frac{d \ln(K)}{d \ln(a_w)} = \Delta n_w \quad (1.6.1)$$

sendo K a constante de equilíbrio, a_w a atividade de água e Δn_w o número diferencial de moléculas de água envolvidas na reação. Esta relação é utilizada no estudo da contribuição energética da água para a estabilização diferencial de conformações protéicas diferentes. Dado que a água é o solvente, isto é, sempre se encontra em excesso na solução, e a única forma de mudar sua atividade é pela adição de solutos a solução. Se estes solutos forem adequadamente escolhidos, de maneira a não interagirem diretamente, via ligação, com a macromolécula em estudo, sua utilização é a de um agente tamponante da atividade de

água na solução, permitindo observar as mudanças do equilíbrio químico devido às contribuições de hidratação macromolecular, através da equação 1.6.1. Este método proposto em 1992, por Colombo e colaboradores ficou conhecido na literatura como método do Stress Osmótico (osmotic stress). De lá para cá, o método foi utilizado para a investigação da contribuição da hidratação em diversas reações bioquímicas. Dentre estas, pode-se citar: a regulação alostérica de hemoglobinas humana e bovina (Colombo et al, 1992; Colombo e Bonilla-Rodrigues, 1996; Seixas, 1998; Seixas e Colombo, 1999), e proteínas à molécula de DNA (Colombo e Ruggiero Neto, 2000), a regulação enzimática da hexoquinase (Parsegian et al, 1994) e da RNase (Caetano, 1996), a estabilização de estados intermediários do citocromo-c (Neves, 1996) e agora, o enovelamento-desenovelamento da apomio globina.

Alguns exemplos mostrando o papel da água na regulação de macromoléculas biológicas foram consideradas por Colombo (1996a) numa revisão de seus trabalhos, que sistematizou a descrição da contribuição da hidratação protéica para o equilíbrio conformacional de hemoglobinas e as consequências sobre a função e regulação destas proteínas. Discutiu também alguns resultados do efeito de água em reações sobre a estabilidade conformacional de proteínas e DNA, e na atividade enzimática. Através de medidas do efeito da variação da atividade de água, promovida pela adição de solutos à solução, sobre o equilíbrio destas reações e das análises utilizando a teoria de ligação de ligantes à macromolécula e das equações de Gibbs-Duhem, Colombo e colaboradores determinaram o número aparente de moléculas de água envolvidas nestas reações (Colombo e Sanches, 1990; Colombo et al, 1992, 1994; Parsegian et al, 1994; Colombo e Bonilla-Rodrigues, 1996).

Neves, 1996, estudou a estabilização/desestabilização de estados intermediários do citocromo-c (cyt-c), por absorção óptica na presença de sorbitol como agente tamponante da água. Durante desnaturação ácida da macromolécula na presença do



soluto foram observados que os estados conformacionais mais compactos da proteína foram devidos à diminuição da atividade de água, que deslocou o equilíbrio conformacional para as formas menos hidratadas (mais compactas) da proteína.

As medidas dos potenciais de oxi-redução da hemoglobina (Hb) e mioglobina (Mb), por titulação potenciométrica e em diversas concentrações de sacarose como tamponante da atividade de água, mostraram um aumento do potencial de oxi-redução, para a Hb, com a diminuição da atividade de água. Este resultado está concordante com a diminuição da afinidade da Hb por O_2 com a diminuição da atividade de água e indicando a menor hidratação da proteína no estado reduzido, a conformação deoxi-Hb (Colombo, 1996b).

No estudo do efeito de água sobre a atividade da enzima ribonuclease-A (RNase-A), através das medidas da constante de Michaelis (K_m) e da constante catalítica (k_{cat}) na clivagem de RNA e na hidrólise do 2',3'CMP, permitiu propor mecanismos de ação da RNase-A sobre estes substratos e dar início a quantificação do papel da solvatação desta enzima, particularmente, na caracterização da etapa de formação de seu estado ativado. (Caetano, 1996).

Ainda na pesquisa das funções da Hb, e mais especificamente, dos parâmetros de oxigenação, Caôn Filho, 1997, determinou por método espectropolarimétrico curvas precisas e contínuas da oxigenação desta proteína em diferentes atividades de água. Ele utilizou como soluto tamponante da atividade de água, a sacarose, encontrando que o número diferencial de moléculas de água que se ligava à Hb entre os estados oxigenados e deoxigenados, estavam em muito boa concordância com outros métodos utilizados anteriormente pelo grupo de Colombo e colaboradores (Colombo et al, 1992; Colombo e Bonilla, 1996).

Seixas, 1998, demonstrou existir um intermediário estável da deoxi-Hb humana em que, na ausência de ânions, liga somente 25 moléculas de água, devido à



oxigenação, contrastando com as 70 moléculas de água que se ligavam à Hb com a oxigenação na presença de ânions. Esta variação de hidratação dependente da concentração de íons em solução sugeriu uma conformação estável, diferente dos estados relaxado, R, e tenso, T, desta proteína. Esta nova proposição permitirá explicar, por exemplo, o efeito de ânions sobre o efeito Bohr (número de prótons envolvidos) na oxigenação da Hb humana (Colombo e Seixas, 1999).

Colombo e Ruggiero Neto (2000) mostraram os efeitos de solutos neutros em estudos de intercalação da actinomicina-D (act-D) à molécula de DNA. Neste trabalho observaram que a variação da hidratação na formação do complexo depende da concentração e do tamanho do soluto utilizado. Paralelamente, os resultados indicaram que o número de pares de base ocupados pela act-D na molécula de DNA também cresce com o tamanho e concentração do soluto. Estes dados foram analisados propondo-se um mecanismo de regulação alostérico do DNA via deformação à distância em sua estrutura secundária.

Nesta tese, vamos demonstrar que a cooperatividade do enovelamento da apoMb induzido pela adição de solutos, também depende do tamanho destes solutos. O mesmo ocorre com as variações de hidratação medidas na transição do estado desnaturado para o estado intermediário ($D \rightleftharpoons I$). Procuraremos demonstrar que estes efeitos são consequência da combinação de interações de volume excluído proteína desnaturada-soluto e do favorecimento da desolvatação protéica pela diminuição da atividade de água associada à adição de solutos à solução.



CAPÍTULO II MODELOS TERMODINÂMICOS



2.1. Introdução

Neste trabalho pretende-se analisar a origem do efeito da adição de solutos inertes, osmólitos, sobre o equilíbrio de reação de enovelamento-desenovelamento de uma proteína globular, a apomio globina. Uma série de estudos publicados, alguns deles mostrados no capítulo anterior, tem apontado que na presença de osmólitos, as proteínas em solução são protegidas contra a desnaturação e que a adição destes solutos induzem o re-enovelamento de diversas proteínas desnaturadas em pH ácido. Estes efeitos tem sido interpretados segundo duas abordagens do problema: uma, termodinâmica que leva tanto à uma definição de fenômeno de exclusão preferencial do soluto da superfície protéica do problema (Eisenberg e Cossaca, 1964 e Timasheff, 1969), quanto ao efeito da atividade de água na energética de solvatação de macromoléculas em solução e sua contribuição para o equilíbrio de reação (Colombo et al, 1992-2000). Uma outra abordagem do problema é utilizar métodos de mecânica estatística para calcular coeficientes de atividade de macromoléculas em co-soluções água / osmólitos (Minton, 1983 e 2000; Wills e Winzor, 1993). A seguir descrevemos estas abordagens e as interpretações possíveis do efeito de solutos na estabilização de estados compactos de proteínas.

2.2 Descrição termodinâmica do efeito de solutos no potencial químico de macromoléculas.

Vamos considerar uma solução ternária, contendo 1 mol de uma macromolécula, e n_1 e n_3 moles de água e soluto por mol da macromolécula, respectivamente. A pressão e temperatura constantes, os potenciais químicos μ_1 , μ_2 , μ_3 destes componentes estão relacionados pela equação de Gibbs-Duhem

$$n_1 d\mu_1 + d\mu_2 + n_3 d\mu_3 = 0 \quad (2.2.1)$$



e a variação do potencial químico da macromolécula com a variação da concentração do soluto, expressa através da mudança de seu potencial químico é dada por

$$-\frac{d\mu_2}{d\mu_3} = n_3 + n_1 \frac{d\mu_1}{d\mu_3} = \xi_{3,2} \quad (2.2.2)$$

Esta equação expressa como o potencial químico da macromolécula muda quando a atividade do soluto é modificada. O lado direito desta equação é conhecido como o coeficiente de interação preferencial do soluto com a macromolécula, $\xi_{3,2}$. A interpretação de $\xi_{3,2}$ é imediata. Considere que a concentração do soluto em solução é aumentada. Com isto $d\mu_3$ aumenta, $d\mu_3 > 0$, e $d\mu_1 < 0$, e o segundo termo do l.d.e. é negativo. Portanto, dependendo da magnitude de n_3 , $\xi_{3,2}$ pode ser positivo ou negativo. Quando positivo, o potencial químico da proteína diminui com o aumento da concentração do soluto, o que é interpretado como ligação preferencial ou incorporação do soluto à camada de solvatação da macromolécula. Quando $\xi_{3,2}$ é negativo, o termo dependente da concentração de moléculas de água ($n_1 \cdot d\mu_1/d\mu_3$) domina sobre n_3 caracterizando um caso de exclusão preferencial do soluto da camada de solvatação e eventualmente das imediações da macromolécula. Este fenômeno de exclusão pode ser visualizado na figura 2.2.1, e pode ser comprovado por experimentos de diálise de co-soluções de proteínas, água e açúcares contra uma solução de água – açúcar, que demonstram que, após o equilíbrio ser estabelecido, há um déficit na concentração do açúcar no compartimento contendo a macromolécula. Esta situação é equivalente à uma ligação negativa do açúcar à proteína. A interpretação dada à este fenômeno é que a interação entre o soluto da solução e a superfície protéica é de caracter repulsivo, o que cria uma região no entorno da proteína rica em água e pobre em soluto.

A descrição do efeito da inclusão ou exclusão preferencial do soluto da superfície protéica sobre o equilíbrio de uma reação macromolecular com a equação 2.2.2



é direto. Consideremos, por exemplo, o equilíbrio entre dois estados conformacionais de uma proteína, N e D:

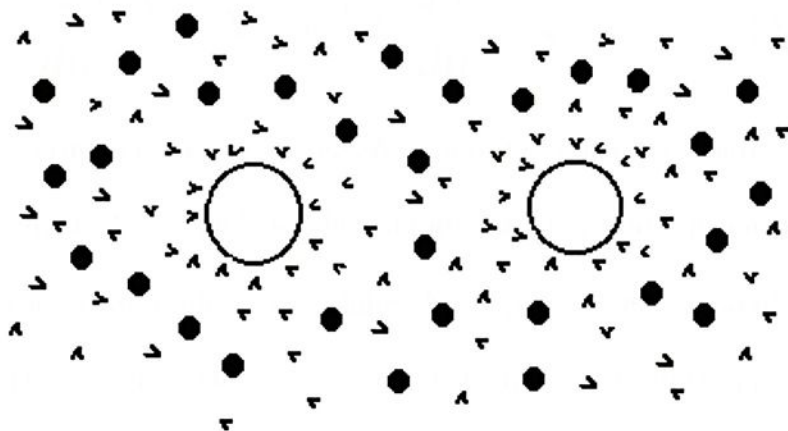


Figura 2.2.1 Caracterização do fenômeno da exclusão das moléculas de soluto (•) das imediações da macromolécula, promovendo o entorno da proteína rico em água (✓).



com potenciais químicos μ^N e μ^D . Se considerarmos ocorrer exclusão preferencial, os valores de n_1 e n_3 , presentes na equação 2.2.1, correspondem, respectivamente, ao número de águas e solutos associados à proteína em cada estado, na transição de N para D, há uma variação de hidratação $\Delta n_1 = \Delta n_w = n_w^D - n_w^N$ e uma variação no número de solutos associados $\Delta n_3 = \Delta n_s = n_s^D - n_s^N$, que acompanham a variação do potencial químico da proteína, $\Delta \mu_2 = \Delta \mu_p$. No equilíbrio $\Delta \mu_p = 0$, temos que:

$$(\mu_p^D - \mu_p^N) = (\mu_p^{0D} - \mu_p^{0N}) + RT \ln([D]/[N]) = 0$$

onde os índices 0 representam o potencial químico padrão e $[D]/[N] = K$, a constante de equilíbrio da reação entre D e N. Portanto: $\Delta \mu_p^0 = -RT \ln(K)$ que substituído em 2.2.1 fornece:

$$-\frac{d\Delta\mu_p^o}{d\mu_s} = \Delta n_s + \Delta n_w \frac{d\mu_w}{d\mu_s} = \xi_{s,p} \quad (2.3.a)$$

ou em termos da constante de equilíbrio

$$\frac{RTd \ln K}{d\mu_s} = \Delta n_s + \Delta n_w \frac{d\mu_w}{d\mu_s} = \xi_{s,p} \quad (2.3.b)$$

A primeira destas expressões mostra como a partir de medidas termodinâmicas diretas de $\xi_{3,2}$ pode-se obter informação de como o potencial químico da proteína se modifica com a adição de solutos. Na seção 2.3 será mostrado como $\xi_{s,p}$ é obtido de medidas de densidade de soluções. Este tipo de medidas não dá nenhuma informação sobre o equilíbrio químico, i.é, sobre a fração de populações da macromolécula em uma e outra conformação. Medidas extra termodinâmicas, como espectroscópicas, são necessárias para acompanhar o efeito da adição de solutos sobre a constante de equilíbrio da reação. Neste caso, a segunda equação deve ser utilizada.

Em qualquer um dos casos, se o lado esquerdo for negativo, o termo de hidratação predomina, $d\Delta\mu_p^o/d\mu_s$ é positivo e $d \ln K/d\mu_s$ é negativo. Isto implica na desestabilização da solução no primeiro caso, No segundo, implica na diminuição da constante $K=D/N$, i.é, em deslocar o equilíbrio do estado que liga mais águas, D, para o menos hidratado, N. Note que apesar de as medidas da constante de equilíbrio serem extra-termodinâmicas elas nos fornecem uma interpretação molecular imediata. O mesmo não ocorre quando $\xi_{3,2}$ é determinado por um método termodinâmico, apesar de o mecanismo que impõe $\Delta\mu_p^o$ ser o mesmo que aquele que leva à diminuição da constante de equilíbrio K.

2.3 Análise e interpretação do efeito de soluto na estabilidade conformacional de proteínas via determinação de $\xi_{3,2}$ por medidas de densidade de soluções água – macromolécula – soluto (Timasheff).

O parâmetro de interação preferencial pode ser determinado experimentalmente por medidas de densidade do solvente, e das soluções com proteína em concentração variável, mantido os potenciais químicos de água e soluto constantes. A medida da densidade da solução água (1) + proteína (2) em diversas concentrações permite determinar o volume específico parcial aparente da proteína, ϕ_2 , através da relação:

$$\lim_{c_2 \rightarrow 0} \left(\frac{d\rho}{dc_2} \right)_{T, \mu_1} = (1 - \phi_2 \rho_0)_{T, \mu_1} \quad (2.3.1)$$

onde c_2 é a concentração em peso do componente 2 (a proteína), ρ é a densidade da solução, T é a temperatura absoluta, μ_2 é o potencial químico do solvente (componente 1), e ρ_0 é a densidade da fase da solução em que a solução protéica entra em equilíbrio de diálise. Se o solvente é suplementado com um soluto não eletrólito dializável (componente 3) a correspondente densidade produzirá um volume específico parcial aparente definido pela equação:

$$(1 - \phi_2 \rho_0)_{T, \mu_1, \mu_3} = (1 - \bar{v}_2 \rho_0) + \xi_{3,2}^0 (1 - \bar{v}_3 \rho_0)$$

onde v_2 é o verdadeiro volume específico parcial, definido como $(\partial V / \partial c_2)_{T, P, m_3}$, a temperatura, pressão e molalidade m_3 do soluto constantes. Nesta equação $\xi_{3,2}$ é o parâmetro de interação preferencial, que aparece na equação 2.1. $\xi_{3,2}$ pode ainda ser expresso em termos das taxas de variação da molalidade da proteína (m_2) em relação à do soluto (m_3) e suas massas molares, M_2 e M_3

$$\xi_{3,2}^0 = \left(\frac{M_3}{M_2} \right) \left(\frac{\partial m_3}{\partial m_2} \right)_{T, \mu_1, \mu_2} \quad (2.3.2)$$



onde $\xi_{3,2}^0$ é o valor limite $\xi_{3,2}$ quando $c_2 \rightarrow 0$.

Timasheff e colaboradores mediram intensivamente valores de $\xi_{3,2}$, para diversas proteínas com diferentes osmólitos, demonstrando experimentalmente que diversos osmólitos, como aqueles utilizados neste trabalho, são preferencialmente excluídos da superfície macromolecular. Timasheff (1998) interpreta que os parâmetros Δn_s e Δn_w que ocorrem nas equações 2.3.a e 2.3.b não reflete nenhuma propriedade físico-química do sistema. Isto está em contra-posição à interpretação alternativa que Δn_s e Δn_w refletem quantidades estequiométricas de ligação de soluto e água à proteína, respectivamente. (Tanford, 1969; Colombo, 1994). Esta outra interpretação será analisada a seguir.

2.4 Análise do efeito de soluto na estabilidade conformacional de proteínas considerando a contribuição da água de hidratação ao potencial químico da proteína.

A energia livre de hidratação de uma macromolécula necessariamente contribui para seu potencial químico. Portanto, se esta macromolécula assumir diferentes conformações em solução, que são visitadas ao longo de uma reação, o equilíbrio de reação deve depender do potencial químico da água em proporção à variação de hidratação associada às conformações final e inicial da reação (Colombo *et al.*, 1992). Esta dependência da constante de equilíbrio com o potencial químico da (μ_w) pode ser obtida a partir da equação 2.2.3.b, que foi derivada da equação fundamental de Gibbs-Duhem (eq. 2.2.1), supondo uma solução protéica de água + soluto. Para tanto, vamos considerar a proteína em uma solução com osmólitos que sejam completamente excluídos da superfície protéica. Nestas circunstâncias a solução não é mais homogênea do ponto de vista termodinâmico, haja visto que a solução no entorno da proteína é distinta da região do



volume da solução quanto às concentrações de água e soluto. Assim, na ocorrência de exclusão preferencial do soluto o entorno de um mol de proteína é constituído de n_1 e n_3 moléculas de água e soluto, respectivamente, enquanto no volume da solução a concentração de água e de soluto é, respectivamente, N_1 e N_2 . Esta diferença de concentrações entre o entorno da macromolécula e o volume da solução caracteriza a existência de duas fases termodinâmicas distintas e em equilíbrio regido pela eq. de Gibbs-Duhén aplicado à cada fase. Para a fase macromolecular vale a eq. 2.2.1, enquanto que na fase do volume da solução esta equação é escrita por:

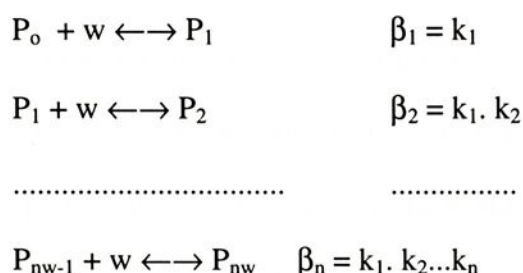
$$N_1 d\mu_1 + N_3 d\mu_3 = 0 \quad (2.4.1)$$

Substituindo $d\mu_3$ desta equação na equação 2.3.b, e lembrando que $d\mu_1 = RT \ln(a_w)$ temos:

$$\frac{d \ln K}{d \ln(a_w)} = -\Delta n_s \frac{N_w}{N_s} + \Delta n_w \quad (2.4.2)$$

Este mesmo resultado foi encontrado por Tanford, ao estender as equações de “linkage” químico originalmente propostas por Wyman para incluir a contribuição da água para o equilíbrio químico em reações bio-moleculares. Colombo e colaboradores (1992, 1994, 1996), propuseram utilizar a adição de osmólitos à solução como forma de controlar a atividade de água da solução, e assim determinar o número de moléculas de água que participam de reações bioquímicas. Para tanto consideraram inicialmente o caso de exclusão total do soluto, $\Delta n_s = 0$. Nestas condições, a taxa de variação da constante de equilíbrio com a atividade de água, a_w , expressa pela equação acima é igual a Δn_w , a diferença entre o número de águas ligadas aos reagentes (conformação inicial) em relação aos produtos (conformação final). Esta equação é válida mesmo para o caso em que a exclusão do soluto não seja completa, como mostrado anteriormente (Colombo, et.al., 1994, Colombo e Bonilla, 1996).

Enquanto a equação de linkage 2.4.2 permite determinar a contribuição da água de hidratação para o equilíbrio entre duas conformações, é de interesse descrever explicitamente a contribuição energética da ligação de n_w moléculas de água de hidratação ao potencial químico de uma macromolécula. Colombo mostrou que isto pode ser feito considerando a teoria de ligação de ligantes à espécies macromoleculares, anteriormente, proposta por Schellman. Considere que um dado estado conformacional de uma proteína seja hidratado por passos, i.e.,



onde i representa o número de sítios de hidratação ocupados, k_i é a constante de ligação da i -ésima molécula de água à proteína, β_i a constante de ligação sequencial no i -ésimo passo de ligação, P_o é a proteína totalmente desidratada e P_{nw} é a proteína com seus n_w sítios de hidratação saturados. A razão entre as conformações P_{nw} e P_o , dada por:

$$\ln\left(\frac{P_N}{P_o}\right) = \ln(\sum \beta_i a_w^N)$$

Como o potencial químico da proteína hidratada é dado por

$$\mu_p = \mu_p^o + RT \ln P_N$$

tem-se que:

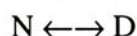
$$\mu_p = \mu_p^o + RT \ln(P_o) - RT \ln(\sum \beta_i a_w^N)$$

Supondo que os sítios de hidratação são idênticos, i.e. que a água se liga com a mesma afinidade k_w à todos os sítios, e independentes o logaritmo na equação acima iguala-se à $\ln(\Sigma) = n_w \cdot \ln(a_w) + n_w \cdot \ln(k_w)$, onde n_w é o número total de sítios de hidratação

da proteína. Substituindo na equação acima e reconhecendo que $[\ln(P_o) - n_w \cdot \ln(k_w)] \equiv \ln(P_{nw})$ quando a atividade de água tende à 1, temos que o potencial químico da proteína totalmente hidratada é dado por:

$$\mu_p = \mu_p^o + RT \ln(P_o) - RT \cdot n_w \cdot \ln(a_w) \quad (2.4.3)$$

que demonstra que o potencial químico da proteína à concentração P aumenta com a diminuição da atividade de água. Este resultado reflete o comportamento observado em medidas de densidade de proteínas na presença de solutos que demonstram que $\Delta\mu_p$ aumenta com o aumento da concentração daqueles solutos preferencialmente excluídos pela proteína. Isto ocorre mesmo na ausência de mudanças de conformação protéica e, é um efeito proporcional à hidratação da proteína. Portanto, se considerarmos duas conformações protéicas em equilíbrio, com diferentes números de hidratação, a diminuição de a_w deslocará o equilíbrio na direção do menos hidratado. Esquemáticamente, se considerarmos o equilíbrio entre os estados N e D, com $n_{w,N}$ e $n_{w,D}$ águas ligadas, respectivamente, teremos:



$$(\mu_D - \mu_N) = 0 = \Delta G^o + RT \ln([D]/[N]) - (n_{w,D}^D - n_{w,N}^N)RT \ln(a_w) \quad (2.4.4)$$

cujas derivadas em relação à $\ln(a_w)$ retorna a equação de linkage 2.4.2 para $\Delta n_s = 0$.

Em conclusão, o efeito da adição de solutos preferencialmente excluídos da superfície protéica pode ser facilmente interpretado em termos da energia de solvatação da macromolécula em solução, e os parâmetros de Δn_s e Δn_w que aparecem na eq. 2.4.2 refletem a estequiometria de ligação tanto do soluto (se esta ocorrer) quanto de água. Nesta interpretação, o parâmetro de interação preferencial, $\xi_{s,w}$, determinado diretamente das medidas de densidade parcial molar de proteínas em solução contendo solutos, reflete diretamente a interação direta água-proteína e soluto-proteína, que pode ser determinada pela medida da variação da constante de equilíbrio de qualquer reação com a concentração de um osmólito adequado.

2.5 O Efeito de Ocupação do Volume na Atividade Termodinâmica de Proteínas: Algumas Consequências Bioquímicas (Minton, 1983).

O segundo tipo de abordagem utilizado para interpretar-se o efeito da adição de solutos sobre o equilíbrio de uma reação considera o efeito de exclusão de volume disponível à proteína em solução devido à presença do soluto. O efeito desta diminuição do volume disponível à macromolécula em solução sobre o seu potencial químico, tem sido tratado em termos da fuga da idealidade da solução. Enquanto para uma solução ideal:

$$\mu_P = \mu^O + RT \ln(P)$$

onde P é a concentração da proteína, em uma solução não ideal:

$$\mu_P = \mu^O + RT \ln(\gamma.P)$$

onde γ é coeficiente de atividade responsável pela fuga do comportamento ideal da solução.

Portanto, se considerarmos o equilíbrio entre duas espécies conformacionais N e D, a diferença entre o potencial químico destas espécies é dada por:

$$\Delta G^o = \mu_D^o - \mu_N^o = RT \ln(K) + RT \ln\left(\frac{\gamma_D}{\gamma_N}\right) \quad (2.5.1)$$

onde $K=[D]/[N]$ é a constante de equilíbrio aparente da reação, e γ_i os coeficientes de atividade de D e N. Minton (1983) e Winzor e Wills (1993) propuseram calcular γ com métodos de mecânica estatística desenvolvidos na teoria de soluções de MacMillan Mayer. Nesta teoria o desvio do comportamento ideal, para as espécies em solução, é atribuído às interações entre moléculas proteína-soluto, proteína-proteína e soluto-soluto. De maneira geral, a parte não ideal do potencial químico, $\ln(\gamma_i)$, é escrito como uma expansão do virial nas concentrações das várias espécies em solução, como segue:

$$\ln \gamma_i = \sum_j B_{ij}(T, P).c_j + \sum_j \sum_k B_{ijk}(T, P)c_j c_k + \dots \quad (2.5.2)$$

onde as somas são feitas para todas as espécies em solução; os coeficientes B_{ij} , B_{ijk} , ... são referentes aos coeficientes de interação entre 2, 3, ou mais espécies componentes, respectivamente. MacMillan e Mayer mostraram que os coeficientes de interação podem ser calculados como função da energia potencial efetiva de interação (ou potencial da força média) para qualquer 2 ou mais moléculas componentes da solução num banho solvente. Se U_{ij} , a energia potencial efetiva de interação entre as moléculas, é dependente somente da distância r_{ij} que separa os centros das duas moléculas, então:

$$B_{ij} = 4\pi N_A \int_0^\infty (1 - e^{-U_{ij}(r_{ij})/kT}) r_{ij}^2 dr_{ij} \quad (2.5.3)$$

O potencial considerado para descrever os efeitos de volume excluído proteína-osmólito, são potenciais de esfera rígida, onde a única interação significativa entre as moléculas de proteína e solutos pequenos são do tipo volume excluído, isto é

$$U_{23}(r) = \begin{cases} \infty, & \text{para } r < (R_2 + R_3) \\ 0, & \text{para } r > (R_2 + R_3) \end{cases} \quad (2.5.4)$$

onde R_2 e R_3 são os raios da macromolécula e do soluto respectivamente (Minton, 1983; Wills e Winzor, 1993). B_{23} calculado através da integral acima pode ser descrito por

$$B_{23} = 4/3\pi N(R_2 + R_3)^3 \quad (2.5.5)$$

que é interpretado como o covolume molar da macromolécula-solvente. Termos de ordem superior em B são normalmente desprezados no cálculo de $\ln(\gamma)$, de forma que:

$$\ln(\gamma) = 4/3\pi N(R_2 + R_3)^3 \quad (2.5.6)$$

para cada espécie protéica. Considerando o equilíbrio entre duas conformações N e D, com raios médios R_N e R_D em uma solução com soluto de raio r_s , esta teoria prevê que a dependência da constante de equilíbrio da reação com a concentração molar C_s do soluto adicionado é dado por:

$$\ln(K) = \ln(K_o) + \frac{4\pi}{3}[(R_d + r_s)^3 - (R_N + r_s)^3] \cdot C_s \quad (2.5.7)$$

Este tipo de análise não leva em consideração, portanto, a contribuição devido à energia de solvatação da macromolécula e o efeito da variação da atividade da água com a adição do soluto. Nisto ela é bastante distinta da abordagem termodinâmica baseada na equação de Gibbs-Duhem, que considera explicitamente as mudanças indissociáveis dos potenciais químicos da água e do soluto. Certamente, este tratamento só é válido para os casos em que efeitos de volume excluído forem muito maiores que aqueles originários da interação direta da proteína com a água e/ou com o osmólito.



CAPÍTULO III MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. A Macromolécula

As proteínas globulares são adequadas para o estudo de enovelamento protéico por permitirem a observação da formação da estrutura nativa única de uma proteína, a partir de sua cadeia polipeptídica desnaturada. Esforços consideráveis, experimentais e teóricos, têm sido feitos na tentativa de estabelecer a natureza dos intermediários que devem existir nas etapas do enovelamento (Levitt e Chothia, 1976). A idéia de que segmentos da estrutura secundária, localizados próximos uns dos outros na sequência primária, interagem para estruturar sub-conjuntos que se associam durante as etapas de enovelamento da mioglobina (Mb), para formar a estrutura nativa, foi apontado por Ptitsyn em 1974 (Ptitsyn, 1995).

A mioglobina é uma proteína de estocagem de oxigênio (O_2) nas células dos tecidos musculares dos vertebrados; é uma molécula globular monomérica pequena, constituída por 153 resíduos de amino ácidos e o grupo heme, um complexo ferro porfirínico, preso ao seu interior. A estrutura secundária é composta de oito hélices α , denominadas pelas letras maiúsculas de A a H (figura 3.1.1), conectadas por segmentos não helicoidais de polipeptídeos, resultando numa macromolécula elipsoidal de aproximadamente $44 \times 35 \times 25$ Å. Sua massa molecular é de, aproximadamente, 17.800 Daltons e é constituída por 1200 átomos, excluídos os átomos de hidrogênio (Kendrew et al, 1960). As hélices de comprimentos diversos (variando de 7 a 26 resíduos) englobam 121 resíduos. O complexo heme está ligado às hélices E e F no bolso hidrofóbico fazendo ainda contatos com as hélices B, C, G e H e com as alças DC e FG. O átomo de ferro no centro do grupo heme faz quatro ligações com átomos de nitrogênio da porfirina; uma quinta ligação é feita covalentemente com a histidina proximal, HisF8, da proteína. Quando esta macromolécula está na forma ligada, a sexta ligação do átomo de ferro é



completada com o ligante (que pode ser: H_2O , O_2 , CO , NO , CO_2) através de uma “ponte” de hidrogênio com a HisE7, a histidina distal. A ligação de ligante, por exemplo o O_2 , desloca o átomo de ferro central para fora, numa posição perpendicular ao plano do grupo heme. Outras variações estruturais que podem ocorrer devido à proteína estar ou não ligada, são movimentações em seus segmentos e rearranjos nas suas cadeias laterais (Mathews e van Holde, 1990; Voet e Voet, 1995).



Figura 3.1.1 Representação da molécula de Mioglobina suas oito hélices e o grupo heme (fonte PDB cod:2MM₁).

Ainda hoje continuam os estudos com esta proteína, na sua forma holo ou apo e, por métodos cada vez mais sofisticados, busca-se entender o processo de enovelamento de proteínas. A estrutura da apoMb não está ainda determinada por métodos cristalográficos de R-X e tem sido considerada como tendo estrutura semelhante à da Mb. Os resultados de uma grande variedade de estudos espectroscópicos indicam que a apoMb nativa mantém muito de sua estrutura secundária comparada à estrutura em cristal da Mb (Fontana et al, 1997).

Em nossos experimentos utilizamos a apomioglobina (apoMb) obtida pela remoção do grupo heme (descrito adiante). As variações estruturais induzidas na proteína

pela retirada do grupo prostético podem ser recuperadas com a sua reincorporação em pH fisiológico e portanto a apoproteína pode ser considerada como precursora da sua forma nativa. As propriedades estruturais e termodinâmicas da apoproteína sob condições nativas compõem uma descrição acessível de prováveis intermediários do processo de enovelamento (Hirst e Brooks III, 1994).

A remoção do grupo heme diminui sua estabilidade, mas sua estrutura permanece ainda compacta, com um interior hidrofóbico com extensa estrutura helicoidal, mantendo conformação final única (Griko *et al.*, 1988). Com relação à influência do número de resíduos nas hélices sobre o espectro DC de proteínas, Hirst e Brooks III (1994) sugerem que somente os resíduos pertencentes às hélices devem contribuir e portanto serem levados em conta.

Obtenção da apoMb: a partir da mioglobina de coração de cavalo, obtida da USB Corporation, seguimos o método de extração do grupo heme pela metil-etil cetona (Merck) em meio ácido (Teale, 1959). Uma solução de Mb, (~1mM), em água ou tampão diluído, é trazida a pH ~ 2,4 por adição de alíquotas de HCl 0,1 M. Adiciona-se igual volume de metil- etil cetona e agita-se vigorosamente. Deixa-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. Todas as etapas acima descritas foram feitas em banho de gelo, para manter a temperatura de ~ 4°C (Ascoli *et al.*, 1981). A fase contendo a apoproteína é então filtrada numa coluna Sephadex G-25, da Pharmacia, previamente equilibrada com solução 50 mM de KCl. Após correr o volume morto, coleta-se a fração contendo a apoproteína que estará livre de resíduos cetônicos e impurezas e num pH de aproximadamente 5 (Hughson *et al.*, 1991). A solução de apoMb obtida deve ter uma cor amarelada e transparente; para ser estocada é conveniente elevar seu pH para 7.0 (Teale, 1959).

3.1.2. Os Solutos



Foram utilizados açúcares, polialcoóis e polietileno glicóis de diversas massas moleculares como solutos e a escolha obedeceu aos seguintes critérios: são solutos inertes no que se refere a ligação com a proteína, são de grupos funcionais distintos e têm massas moleculares (MM) que abrangem um intervalo bastante amplo.

As soluções contendo solutos foram preparadas nas concentrações descritas na Tabela 3.I, em água bidestilada e desionizada, filtradas e estocadas sob refrigeração até o uso. Os polióis são caracterizados pela presença de diversas hidroxilas em suas moléculas. Os polietileno glicóis (PEG) são polímeros de fórmula geral: $\text{H}(\text{COCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$, onde $n \geq 4$. Estes compostos são líquidos viscosos e claros ou sólido branco que se dissolvem em água formando soluções transparentes. O PEG400 tem n variando entre 8,2 e 9,1 e com MM média entre 380 e 420 Da. O PEG600 tem n que varia entre 12,5 e 13,9 com MM média entre 570 e 630 Da (The Merck Index, 1996).

As soluções de KCl, NaCl, NaOH e HCl foram preparadas em água pura a partir de soluções padrão como o caso do HCl 1N, da Merck, ou do NaOH, da Reagent, padronizada neste laboratório, ou ainda, por dissolução de uma certa massa em volume adequado, no caso dos sais, sendo que essas concentrações eram sempre verificadas no osmômetro.

3.2. Os Equipamentos de Medidas

3.2.1. De pH

As medidas de pH foram feitas num analisador de pH Corning 350, ou num Micronal B-375, com eletrodo de vidro e calomelano para íons H^+ , devidamente calibrado com soluções padronizadas para diversos valores. Estes eletrodos, devido à sua alta especificidade ao íon, têm características muito estáveis para medidas do pH inclusive em solventes orgânicos e sistemas não aquosos (Willard *et al*, 1974).



TABELA 3-I. Apresentação dos solutos utilizados com relação à forma de preparação, suas densidades medidas e tabeladas, suas massas moleculares e os laboratórios fornecedores. Os dados tabelados foram tirados de CRCPress, 1978, e The Index Merck, 1996).

	Soluto Neutro	Concentra- ção estoque	Densidade Medida (g/cm3)	Densidade Do CRC ou Index Merck	Massa Molecular em Da	Origem dos produtos
A Ç Ú C A R E S	Sacarose	55 %	1,2561	1,2654(56 %)	342,3	Mer ck
	C12H22O11	65 %	1,2965	1,3162(64 %)		
	Glicose	45 %	1,1804	1,1945(44 %)	198,16	Sigma
	C6H12O6				150,13	
	Ribose	34 %	1,0645			Sigma
	C5H10O5					
P O L I Ó I S	Arabitol	40 %	1,1428		152,15	Sigma
	C5H12O5					
	Manitol	20 %	1,0884	1,0548(15 %)	182,17	Sigma
	C6H14O6					
	Sorbitol	40 %	1,1321	1,2879(70 %)	182,17	Calbioche- mical
	C6H14O6					
P E G	PEG400	40 %	1,065	1,128(80 %)	~400	Sigma
	PEG600	50 %	1,068	1,128(80 %)	~600	Sigma
	PEG1000	67 %	1,058	-	~1000	Sigma
	PEG2000	50 %	1,072	-	~2000	Sigma

3.2.2. Das Concentrações



Um espectrofotômetro CARY UV-Visível Varian, modelo 3E, foi utilizado para a determinação da concentração das preparações de apoMb e para detectar a possível presença de Mb. Os picos de absorção característicos da apoMb, em 280 nm e do grupo heme em 410 nm, com os coeficientes de absorção respectivos, $\epsilon_{280}=14,3.10^{-4} \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e $\epsilon_{410}=1,59.10^{-5} \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, (Goto e Fink, 1994; Pace *et al*, 1990) aplicados à lei de Beer-Lambert nos fornece a concentração das duas formas. A razão das absorbâncias nas duas regiões (A_{410}/A_{280}) deve ser $\leq 0,1$, indicando a existência mínima de heme residual e considerada boa condição de trabalho (Ascoli *et al*, 1981).

Um osmômetro automático OSMETTE da Precision Systems, INC., foi usado para a verificação das concentrações em Osmol/Kg das amostras medidas pelo número de partículas em solução que este equipamento fornece. A calibração do osmometro é verificada periodicamente utilizando o seguinte procedimento: verificar o nível do líquido do banho; aquecer durante 15 a 20 minutos até que sua temperatura esteja equilibrada; usar apropriadamente as soluções padronizadas de 500 mOsm seguida da de 100 mOsm, obtidas da Precision Systems, INC.

3.2.3. Das Alterações Estruturais na Macromolécula. Medidas de Dicroísmo Circular (DC).

Em grande parte, as moléculas sintetizadas pelos organismos vivos são assimétricas e as medidas de dicroísmo circular são sensíveis às variações conformacionais destas macromoléculas. O DC mede a diferença na absorção, por moléculas assimétricas, entre as suas rotações da luz circularmente polarizada (Johnson, 1996). As variações nos espectros de proteínas que sofrem mudanças conformacionais em sua estrutura secundária são devidas aos efeitos elétricos e magnéticos em sua origem. Estes espectros são sensíveis aos efeitos de cargas sobre os estados eletrônicos padrão e excitado, influenciando as



mudanças na distribuição de cargas localizadas, na constante dielétrica, nas interações tipo ponte de hidrogênio e na ressonância acoplada às diferentes partes da molécula (Tinoco et al, 1995). As reações de desnaturação induzidas por ácido e as reações de reenovelamento promovidas pelas crescentes concentrações de solutos foram acompanhadas em um espectropolarímetro JASCO-710, calibrado para as intensidades, com solução aquosa de 10-sulfonato D-canforato de amônia preparado a 0,6% peso/volume, em celas de 1 mm de espessura, e com cristal de neodímio para a calibração do comprimento de onda (Manual da JASCO).

Muita discussão existe em torno da melhor análise dos espectros DC de proteínas e de outros polímeros, no sentido de determinar os percentuais das estruturas de hélices α , cadeias β e de random coil. Muitos pesquisadores ressaltam sobre a boa precisão nas medições dos conteúdos de hélices α , mas também a pequena certeza na determinação das quantidades das outras estruturas (Beychok, 1966; Greenfield e Fasman, 1969; Hirst e Brooks III, 1994; Eftink, 1995).

Para calcular o conteúdo de hélices α é necessário assumir que todas as partes da macromolécula que não pertencem às hélices têm características rotatórias de um polipeptídeo aleatório. Os espectros de DC na região do UV para a mioglobina e um copolímero helicoidal (com hélices à direita) estão relacionados de maneira clara quanto ao conteúdo de hélices α para a elipticidade em 222 nm, e para a Mb é aproximadamente, 67% (Beychok, 1966).

Como mostrado por Fasman em estudos de DC da poli-L-lisina: **a)** as medidas de DC de um homopolímero são uma boa aproximação para os espectros de DC de segmentos curtos de hélices α de proteínas; **b)** que a forma aleatória deste polímero é um modelo razoável para segmentos irregulares de uma proteína, mesmo não estando esta totalmente desnaturada e contendo alguma estrutura rígida repetitiva; **c)** a região de 208 a



240 nm é a melhor região de estudos, por parecer menos sensível a variações das cadeias laterais não cromofóricas e dos solventes (Greenfield e Fasman, 1969).

Uma estimativa feita por DC para este tipo de estrutura contidos na Mb é comparada aos valores obtidos de estudos cristalográficos por raios-X e por dinâmica molecular, (MD), estão resumidos na Tabela 3.II.

Para estimar os conteúdos das estruturas helicoidais e aleatórias, neste trabalho, foi feito estudo comparativo dos espectros de hélices α em 222 nm e das estruturas aleatórias em 217 nm das seguintes macromoléculas: mioglobina nativa e desnaturada, apomioglobina nativa e desnaturada e da poli-L-lisina em sua conformação helicoidal e aleatória. Os dados estão apresentados na figura 3.2.1.

Tabela 3.II- Comparação de conformações helicoidais obtidas para a Mb por diferentes técnicas. (DC e R-X, por Greenfield e Fasman, 1969^a; Nishii et al, 1994^b; dinâmica molecular, por Hirst e BrooksIII, 1994^c).

método	Hélice α	Estrutura β	Est. aleatória
DC lit. ^a	67%	0-13%	20-30%
Nishii ^b Mb	66%	-	22- 23%
apoMb	55%	-	
nossos Mb	70%	-	23-24%
apoMb	56%	-	
R-X ^a	65-72%	0	23-32%
MD ^c	72%	-	-

Segundo Johnson e colaboradores (1990) os espectros DC podem ser bem aplicados às proteínas que tenham sua estrutura secundária e estabilidade conhecidas, mas alguns cuidados devem ser tomados para melhorar a precisão das medidas de DC: a) a calibração rotineira do espectropolarímetro; b) a concentração da biomolécula em questão

não deve ultrapassar uma densidade óptica de 0,3 além de estar adequada ao caminho óptico da cela a ser usada; c) a concentração do tampão, em geral não deve exceder 20mM (Exemplos: tampão fosfato, máximo de 10 mM; EDTA não pode ser usado além de 0,1mM).

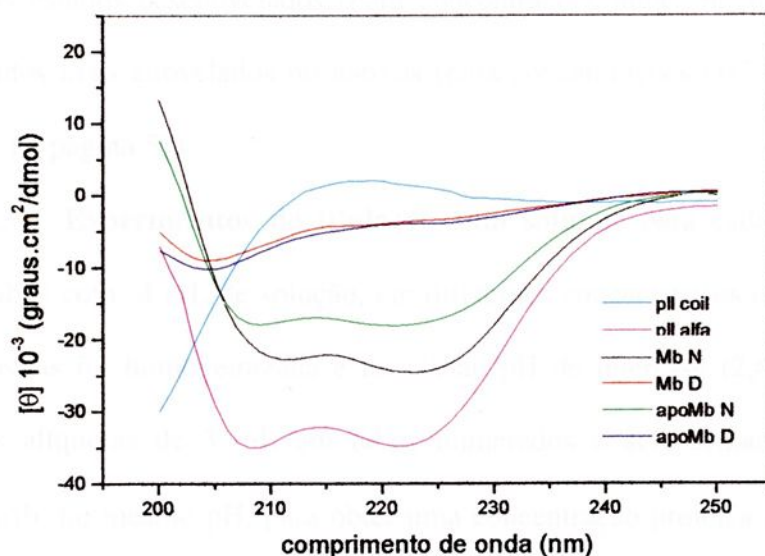


Figura 3.2.1 Espectros de DC da mioglobina e da apoMb nas formas N e D, e da poli-L-lisina na forma aleatória e helicoidal.

3. 3. Titulações

As diversas titulações utilizadas nos experimentos realizados para os estudos da desnaturação e do reenovelamento da apoMb na presença de solutos ou ânions estão descritos abaixo.

3. 3. 1. Experimentos de titulação ácida: diversas amostras com volumes mantidos constantes e com as mesmas concentrações de proteína, mas com diferentes concentrações de sacarose, foram titulados com microvolumes de ácido clorídrico 0,1M. Os valores de pH foram anotados e os espectros DC registrados num PC para posterior análise de dados. As leituras no DC eram realizadas com alíquotas de ~ 300 μL de solução, em celas de 1 mm de espessura, que eram posteriormente devolvidas à solução antes da

próxima adição de ácido. O intervalo de variação de pH foi de 7 a 1 e a concentração da proteína igual a 5 μM . Para todas as concentrações do soluto foi subtraída a absorção devida ao soluto na ausência de proteína, nos diferentes valores de pH.

Das curvas obtidas destes dados, foi escolhido o $\text{pH} = 2,46$ para a realização de outro tipo de experimento, descrito mais à frente. Este pH foi o que apresentou maior variação entre os estados desenovelados (para concentrações nulas ou muito baixas de soluto) e os estados mais enovelados ou nativos (para concentrações elevadas de soluto) (ver figura 4.2.3. na página 52).

3.3.2. Experimentos de titulação com solutos: para cada soluto foram preparados 16 tubos com 4 mL de solução, em diferentes concentrações de soluto. Cada uma destas amostras foi homogeneizada e levada ao pH de interesse (2,46), para então serem separadas alíquotas de 3 mL em tubos numerados e acrescentar a eles iguais volumes de apoMb, no mesmo pH, para obter uma concentração protéica final de 5 μM . Novamente foi feita a homogeneização das soluções e retiradas alíquotas de 300 μL para a leitura no DC, após o que cada tubo era levado para as medidas no osmômetro. A leitura das amostras “controle” no DC foram feitas para cada concentração daquele volume restante (~1,0 mL) da separação das amostras antes de acrescentar a proteína.

3. 3 .3. Experimentos com o íon Cloreto, (Cl^-): Foram feitas diversas titulações ácidas da apoMb em ambiente rico em cloreto, numa concentração de 0,5 M de cloreto de potássio. As titulações com cloreto a pH 2,46 foram feitas da mesma maneira descrita para os solutos (na seção 3.3.2).

3. 3. 4. Experimentos com controle de temperatura: para as diversas concentrações de glicose e sacarose a $\text{pH} = 2,46$ foram realizadas medidas com a temperatura variando entre 10° e 30° C, utilizando-se um banho Neslab RTE 221 com



sensibilidade de 0,1°C. A cela de medida no DC foi adequadamente mantida à temperatura do banho.

3. 3. 5. Experimentos de Reversibilidade: com a finalidade de mostrar que as reações acima estudadas são reversíveis, foi realizado o caminho inverso para as titulações ácidas e para as titulações com solutos, bem como nos estudos com variação de temperatura.

3. 4 Métodos de Análise e Tratamento dos Dados

Um método usual para estimar a cooperatividade de uma transição é medir a inclinação da curva desta transição em seu ponto médio. Esta inclinação é proporcional à variação da quantidade termodinâmica associada com a variável que provocou tal transição, seja a diferença no grau de ionização para as transições induzidas por pH, seja a diferença de número de moléculas do agente desnaturante associadas à macromolécula entre um estado e outro da transição (Pace et al, 1990).

A constante de equilíbrio para a transição entre os dois estados é obtida de: $K_{obs} = f_D / (1 - f_D)$, onde f_D é a fração de macromoléculas no estado desnaturado. Considerando que: $f_N + f_D = 1$, onde f_N é a fração de macromoléculas no estado compacto da apoMb, e que a propriedade física que mediu a variação conformacional da proteína acompanhadas pela elipticidade seja dada por: $\theta_x = f_D \cdot \theta_D + f_N \cdot \theta_N$, onde θ_x é a medida da elipticidade em um ponto qualquer da transição, θ_D e θ_N são as elipticidades medidas nos estados desnaturado e nativo, respectivamente; o valor da constante de equilíbrio, K_{obs} , é calculado da maneira descrita abaixo, partindo das relações descritas acima (Schmid, 1990):

$$f_D = 1 - f_N \quad \text{e} \quad f_N = \frac{(\theta_x - f_D \theta_D)}{\theta_N} \quad (3.4.1)$$



$$f_D = 1 - \frac{(\theta_X - f_D \theta_D)}{\theta_N} \Rightarrow f_D \theta_N = \theta_N - \theta_X + f_D \theta_D$$

que rearranjando dá:
$$f_D = \frac{(\theta_N - \theta_X)}{(\theta_N - \theta_D)} \quad (3.4.2)$$

Como:
$$K_{obs} = \frac{f_D}{(1 - f_D)} = \frac{f_D}{f_N}$$

Teremos:

$$K_{obs} = \frac{\frac{\theta_N - \theta_X}{\theta_N - \theta_D}}{\frac{\theta_X - \theta_D f_D}{\theta_N}} = \frac{\theta_N - \theta_X}{\theta_N - \theta_D} * \frac{\theta_N}{\theta_X - \theta_D f_D} \quad (3.4.3)$$

que com arranjos e substituições fica:

$$K_{(N \rightarrow D)} = \frac{(\theta_N - \theta_X)}{(\theta_X - \theta_D)} \quad \text{ou} \quad (3.4.4)$$

$$K_{(D \rightarrow N)} = \frac{(\theta_X - \theta_D)}{(\theta_N - \theta_X)} \quad (3.4.5)$$

Num sistema cooperativo, quando corrigido para os efeitos estatísticos, a constante de dissociação aparente para uma ou mais etapas sucessivas diminui quando a saturação progride. É comum na prática, usar métodos semi-empíricos e interpretar o significado físico dos parâmetros assim obtidos. Esta aproximação está baseada na afirmação de que a ligação durante o intervalo de saturação pode ser descrita pelas equações dadas por um sistema de cooperatividade infinita. O caso extremo de cooperatividade infinita de ligação é representada por uma reação tudo ou nada.



onde K^n é a constante de dissociação aparente para sítios interagentes. Para este caso o parâmetro v é dado por:

$$v = \frac{[M_n]}{([M_o] + [M_n])} = \frac{\frac{(n[L]^n)}{K^n}}{(1 + \frac{[L]^n}{K^n})} \quad (3.4.7)$$

que dividida por [L] fica:

$$v[L] = \frac{\frac{n[L]^{n-1}}{K^n}}{(1 + \frac{[L]^n}{K^n})} \quad (3.4.8)$$

e a fração de saturação $y = v/n$ é:

$$y = \frac{\frac{[L]^n}{K^n}}{(1 + \frac{[L]^n}{K^n})} \quad (3.4.9)$$

Todas estas equações estão baseadas na afirmação de que a ligação é infinitamente cooperativa para todos os n ligantes. Na prática, cooperatividade infinita não é observada e os dados de interações cooperativas são descritos para uma parte do intervalo de saturação, de 25 a 75%. Estas relações semi-empíricas são:

$$v = \frac{(\frac{n[L]^{ah}}{K^{ah}})}{(1 + \frac{[L]^{ah}}{K^{ah}})} \quad (3.4.10)$$

$$\frac{v}{[L]} = \frac{(\frac{l[L]^{ah-1}}{K^{ah}})}{(1 + \frac{[L]^{ah}}{K^{ah}})} \quad (3.4.11)$$

$$y = \frac{(\frac{[L]^{ah}}{K^{ah}})}{(1 + \frac{[L]^{ah}}{K^{ah}})} \quad (3.4.12)$$

sendo $1 \leq \alpha_H \leq n$. O parâmetro α_H , conhecido como a constante de Hill, representa um índice da cooperatividade. Quando $\alpha_H = n$, o sistema se comporta como, perfeitamente, cooperativo; quando $\alpha_H = 1$, indica não cooperatividade. Da equação de y , o parâmetro α_H é dado por:

$$\alpha_H = \frac{d\{\ln[\frac{u}{(1+y)}]\}}{d(\ln[L])} \quad (3.4.13)$$

que é uma definição conveniente da constante de Hill (Cantor e Schimmell, 1980; van Holde, 1985).

A medida da cooperatividade na transição $D \leftrightarrow N$ é dada pelo número diferencial de moléculas do desnaturante “ligadas” aos estados inicial e final da proteína no processo estudado e é dado por:

$$\Delta n_w = \frac{\partial \ln(K_{obs})}{\partial \ln(a_w)}, \quad (3.4.14)$$

como mostrado anteriormente.

As concentrações das diferentes misturas de água e soluto foram calculadas da seguinte maneira:

$$m = [molal]_{final} = \left\{ \frac{(\omega_3 \rho_3 V_3 / MM_3)}{[(1 - \omega_3) \rho_3 V_3 + V_w]} \right\} 1000 \quad (3.4.15)$$

sendo: m , a concentração molal final do soluto em cada tubo; ω_s , a concentração do soluto na solução estoque, em peso por volume, (g/mL); ρ_s , a densidade da solução estoque de soluto preparada; V_s , o volume de solução de soluto em cada tubo; V_w , o volume de água acrescido a cada tubo; MM_s , a massa molecular do soluto, e o fator 1000 é devido a concentração molal ser dada por kilograma, pode-se escrever para a atividade de água a_w :

$$\ln(a_w) \cong -\frac{m}{55,5} = -\frac{osmolal}{55,5} \quad (3.4.16)$$

Calculados K_{obs} e $\ln(a_w)$, constrói-se o gráfico de $\ln(K_{\text{obs}})$ em função de $\ln(a_w)$ para cada soluto para determinar o número diferencial de moléculas de água envolvidas no processo pela inclinação da curva, dada por:

$$\frac{d \ln(K_{\text{obs}})}{d \ln(a_w)} = -\Delta n_w \quad (3.4.17)$$



4.1 INTRODUÇÃO

Este capítulo apresenta os resultados da pesquisa realizada.

Os resultados são apresentados em forma de texto e gráficos.

Os resultados são apresentados em forma de texto e gráficos.

Os resultados são apresentados em forma de texto e gráficos.

Os resultados são apresentados em forma de texto e gráficos.

Os resultados são apresentados em forma de texto e gráficos.

Os resultados são apresentados em forma de texto e gráficos.

Os resultados são apresentados em forma de texto e gráficos.

Os resultados são apresentados em forma de texto e gráficos.

Os resultados são apresentados em forma de texto e gráficos.

CAPÍTULO IV RESULTADOS

Os resultados são apresentados em forma de texto e gráficos.

Os resultados são apresentados em forma de texto e gráficos.

Os resultados são apresentados em forma de texto e gráficos.

Os resultados são apresentados em forma de texto e gráficos.

Os resultados são apresentados em forma de texto e gráficos.

Os resultados são apresentados em forma de texto e gráficos.

Os resultados são apresentados em forma de texto e gráficos.

Os resultados são apresentados em forma de texto e gráficos.

Os resultados são apresentados em forma de texto e gráficos.

Os resultados são apresentados em forma de texto e gráficos.

Os resultados são apresentados em forma de texto e gráficos.

Os resultados são apresentados em forma de texto e gráficos.

Os resultados são apresentados em forma de texto e gráficos.

4.1 APRESENTAÇÃO

Neste capítulo estão apresentados os resultados obtidos por dicroísmo circular, para caracterizar o equilíbrio de enovelamento/desenovelamento da apoMb em função do pH, da temperatura, da concentração de cloreto de potássio e de solutos inertes adicionados ao meio. O efeito da concentração do sal e dos solutos inertes (sacarose, glicose, ribose, sorbitol, arabitol, polietileno glicol 400, 600, 1000 e 2000) sobre o grau de enovelamento da apoMb a diferentes valores de pH e temperatura, foi acompanhado por medidas da elipticidade da proteína em 222 nm. O efeito da adição de solutos sobre a estabilidade térmica da apoMb a pH 2,46 foi investigado na presença de diferentes concentrações de glicose e sacarose.

Os resultados experimentais estão descritos da seguinte forma:

4.2. Dados obtidos dos experimentos sobre o efeito do pH na estrutura secundária da apoMb, medidos na ausência e presença de solutos, ou seja, em água pura, KCl e sacarose. Estes experimentos constituem a referência para o estudo da ação de solutos neutros e iônicos sobre o equilíbrio do enovelamento/desenovelamento da apoMb.

4.3. Os resultados apresentados discorrem sobre o efeito da ligação de prótons aos estados desnaturados e intermediários da apoMb, medidos na presença de sacarose 3 molal.

4.4. O efeito da concentração de sacarose e do íon cloreto sobre o grau de enovelamento da apoMb a pH 2,46 é descrito, evidenciando que estes solutos re-enovelam a proteína por mecanismos distintos, porém levam a um mesmo estado intermediário, I, estruturado e estável.

4.5. Resultados de medidas com a apoMb focalizando a correlação entre a constante de equilíbrio na transição entre os estados D e I com as crescentes concentrações



de sacarose e sorbitol e com as atividades de prótons e de água para valores de pH entre 2,4 e 2,8.

4.6. Resultados demonstrando o efeito das diferentes concentrações de diversos solutos sobre o grau de enovelamento da apoMb, medidos a pH 2,46 estão apresentados nesta seção. Esta base de dados é utilizada para discutir os possíveis mecanismos de estabilização do estado parcialmente enovelado da proteína por adição de osmólito. Os mecanismos considerados são fundamentados: 1- no conceito de exclusão preferencial do soluto; 2- na contribuição do termo de volume excluído para o coeficiente de atividade da proteína; e 3- na contribuição da hidratação protéica ao potencial químico da proteína através da atividade de água.

4.7. Resultados do efeito das concentrações de glicose e sacarose a pH 2,46 sobre a estabilidade térmica da proteína foram determinados, para estimar a variação da entalpia de desnaturação e sua dependência com a variação da concentração e tamanho do soluto.

4.2 Desnaturação ácida da apoMb na ausência e presença de solutos neutros e do íon cloreto.

As modificações na estrutura secundária da apoMb, devidas à diminuição do pH, da região de pH neutro para a região de pH ácido, foram acompanhadas por DC. Estes espectros consecutivos da transição do estado nativo para o estado desnaturado estão apresentados na figura 4.2.1. Os espectros a pH 7 e 2 correspondem aos espectros típicos dos estados nativo e desnaturado da apoMb, respectivamente. Para valores intermediários de pH, os espectros são uma composição de frações de estados N e D e de um estado intermediário a ser definido

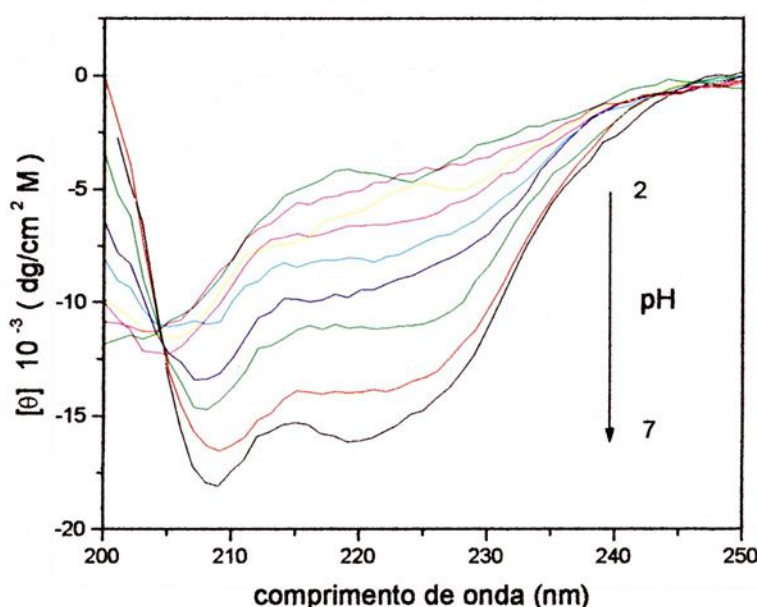


Figura 4.2.1. Espectros da elipticidade molar residual obtidos durante desnaturação ácida da apoMb na presença de glicose 3 molal. Volume de 20 mL da solução numa concentração protéica de 5 μ M foram titulados com alíquotas de HCl 0,1 M, usado para baixar o pH.

Os valores da elipticidade molar em 222 nm (θ_{222}) medidos nos espectros mostrados na figura 4.1.1, em diferentes valores de pH, são mostrados na figura 4.1.2. Curvas deste tipo são utilizadas para acompanhar a reação de desnaturação ácida da apoMb. Nesta figura está mostrado também a dependência de θ_{222} com o pH, medidos na presença de 0.5 M de cloreto de potássio.

A curva de desnaturação da apoMb em água deionizada, representada por círculos na figura 4.2, é característica da desnaturação ácida desta proteína e mostra que a quantidade máxima de estrutura secundária da apoMb ocorre entre os valores de pH 7 e 5.5, região característica da conformação compacta nativa (N) desta proteína. Com a diminuição do pH abaixo de 5.5 observa-se o desenovelamento protéico em duas etapas, envolvendo o estado intermediário, I.

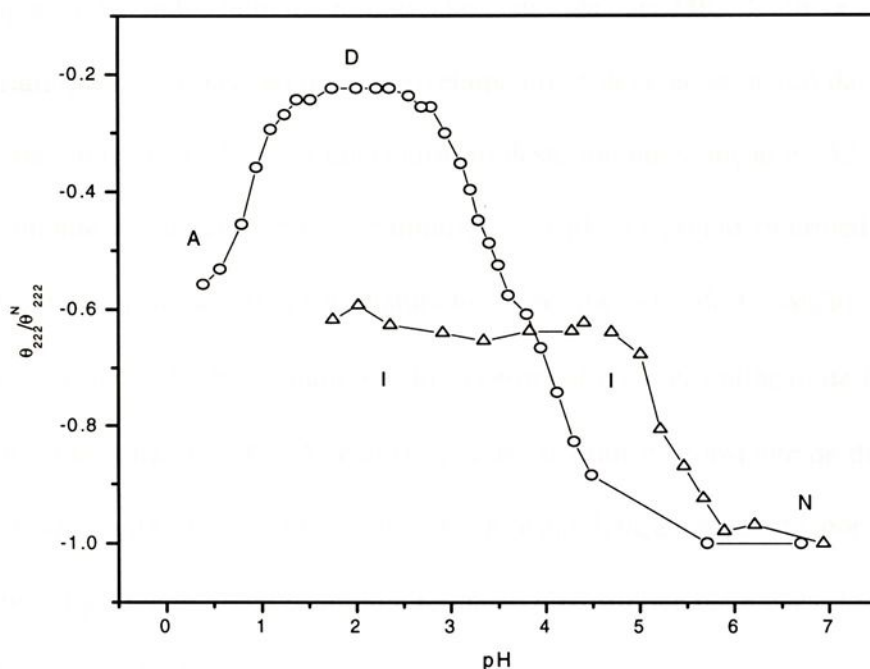


Figura 4.2.2. Razão entre os valores da elipticidade em 222 (θ_{222}) nm medidas para um determinado valor do pH e o valor da elipticidade em 222 nm para o estado nativo (θ_{222}^N) em função do pH para a titulação ácida da apoMb (5 μ M) em água pura (○) e em cloreto de potássio 0,5 M (Δ), onde se destacam os estados nativo (N), intermediário (I), desnaturado (D) assim como o estado re-enovelado (A).

A primeira etapa deste processo corresponde à transição entre os estados N e I e ocorre aproximadamente entre os valores de pH 5,5 e 4,0. A segunda etapa de desnaturação correspondente à transição I para D, para os valores de pH entre 4,0 e 3,0. Qualitativamente, a formação do estado I pode ser notada pelo aparecimento de um ombro na curva de titulação para valores de pH entre 3,5 e 4,0. Deste ponto até o pH próximo a 3,0 ocorre a desestabilização do estado intermediário com a formação do estado desnaturado, D. O valor constante da elipticidade entre os valores de pH de 3,0 e 1,5 indicam que, nesta faixa de pH, a proteína encontra-se em seu estado de estrutura maximamente desenovelada. Até o valor de pH 1,5 o processo de desnaturação da apoMb é induzido pela ligação diferencial de prótons (Barrick e Baldwin, 1993).

Este gráfico também mostra o aumento da elipticidade para valores de pH menores que 1,5, indicando o re-enovelamento da apoMb. Goto e Fink, 1990, demonstraram que esta transição de re-enovelamento se deve ao aumento da concentração de íons Cl^- na solução. A pH 1,5 a concentração deste íon em solução é ~32 mM, oriunda do ácido titulante, e aumenta com a diminuição do pH. O estado intermediário é então estabilizado em relação ao estado desnaturado. Note que 50% da transição do estado D para A ocorre a $\text{pH} \cong 1$. Nas condições do experimento, a concentração de íons Cl^- neste pH é de aproximadamente 100 mM e corresponde ao valor da constante de dissociação do ânion do estado A da apoMb. O mecanismo de estabilização proposto por Goto e Fink (1990) é que a ligação do ânion diminui a repulsão eletrostática responsável pelo completo desenovelamento da proteína.

Para melhor caracterizar o mecanismo de estabilização do estado intermediário por ânions, medimos a curva de desnaturação ácida da apoMb em solução 0,5 M de KCl. Estes dados estão mostrados na curva formada por triângulos no gráfico da figura 4.2.2. O efeito do ânion na estabilidade relativa entre as espécies N e I, e entre as espécies I e D, é tal que a adição do ânion promove, em relação à curva de desnaturação medida na sua ausência (curva em círculos na figura 4.2.2), uma diminuição da elipticidade da proteína em valores de pH acima de ~ 3,8 e o aumento de sua elipticidade em valores de pH inferiores a este valor. Portanto, a interação da proteína com Cl^- aumenta a estabilidade do estado intermediário tanto em relação ao estado nativo quanto em relação ao estado desnaturado. Assim, o aumento da concentração de KCl na solução facilita o desenovelamento parcial do estado N a valores de pH acima de ~3,8 e facilita o re-enovelamento do estado D a valores de pH menores que 3,8. Estes resultados confirmam estudos anteriores do efeito da adição de KCl na estabilidade da apoMb publicados na literatura (Goto et al, 1990a e b).



O efeito da adição de solutos neutros sobre as características de estabilidade à desnaturação ácida da apoMb foi determinado por medidas da elipticidade molar da apoMb em função do pH em diversas concentrações de sacarose. Os gráficos das curvas de desnaturação ácida de apoMb, isto é, da elipticidade molar em 222 nm em função do pH, determinados em soluções de 0,0; 1,0; 1,8; 2,0 e 3,0 molal de sacarose são mostradas na figura 4.2.3. Estas curvas apresentam na ordenada a razão da elipticidade para um dado valor de pH pelo valor da elipticidade no estado nativo em função do pH. Estes gráficos demonstram que o aumento da concentração de sacarose na solução produz, a qualquer valor de pH, o aumento da elipticidade protéica em relação à elipticidade da proteína em solução sem sacarose. Este efeito da sacarose, de aumentar a estabilidade dos estados mais enovelados da apoMb em todo o intervalo de pH investigado, é distinto do efeito observado na presença KCl. Na presença deste sal, o que se observa é que o estado parcialmente enovelado (I) é estabilizado em relação aos estados mais enovelado (N) e mais desenovelado (D). Estas comparações, podem ser visualizadas na figura 4.1.4, onde as curvas de desnaturação ácida da apoMb, medidas na ausência de KCl e sacarose, em 0.5 M KCl, e em 3 molal sacarose, estão mostrados. Note que, para valores de pH entre 7,0 e 4,5, o grau de enovelamento da proteína em água é maior que o observado em solução com KCl, e menor que o observado em solução com sacarose.



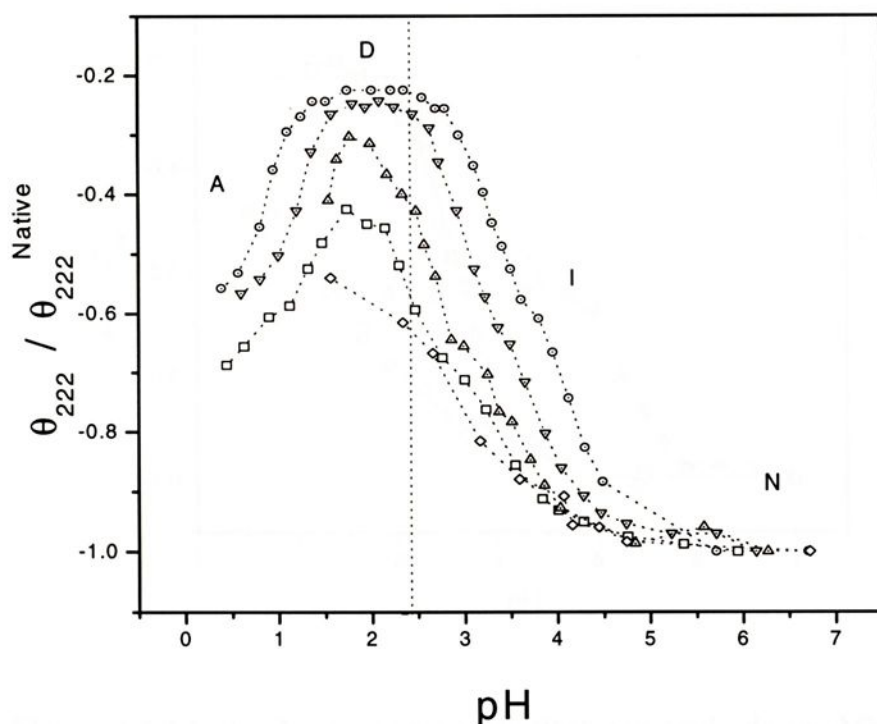


Figura 4.2.3. Curvas de titulação ácida da apoMb (5 μ M) em diferentes concentrações de sacarose [0 (o), 1 (∇), 1.8 (Δ), 2 ($\square$) e 3 ($\diamond$) molal], mostradas através da razão entre θ_{222} num determinado ponto e θ_{222}^N do estado N versus pH. Entre os valores de pH 7,0 e 5,5 observa-se o estado nativo e em pH < 4 diferentes graus de desnaturação indicando a presença de estados intermediários para valores crescentes da concentração do soluto.

Os dados mostrados na figura 4.2.4 permitem concluir, portanto, que a adição de sacarose acentua a estabilidade do estado N enquanto a presença de KCl diminui a estabilidade deste estado. As curvas de desnaturação apresentadas nesta figura mostram que ambos, KCl e sacarose, contribuem para a desestabilização do estado desnaturado via o aumento da estabilidade do estado intermediário, indicando que ambos os solutos levam a proteína a adotar estruturas similares quanto à quantidade de hélices α a pHs baixos. Na saturação, tanto KCl quanto sacarose, desestabilizam completamente o estado totalmente desnaturado a qualquer valor de pH na região de pH baixo.

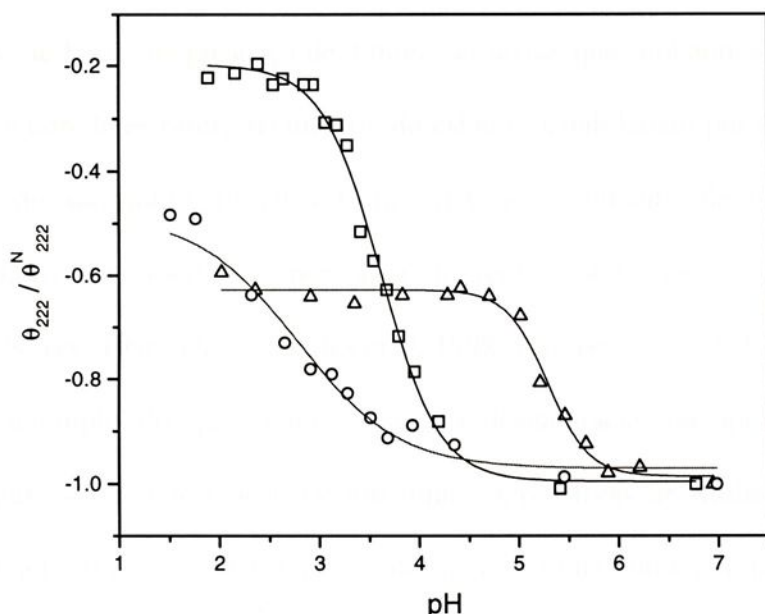


Figura 4.2.4 Isolando-se as curvas de titulação ácida da apoMb (5 μ M) em água pura (□), em sacarose 3 molal (○) e em 0,5 molar de KCl (Δ); observa-se, entre os valores 7,0 e 4,5 do pH, o estado N é altamente desestabilizado pela ação do cloreto e estabilizado pela presença de sacarose comparados à água pura. Para valores de pH abaixo de 4 o estado I apresenta-se estabilizado pelo cloreto e o estado N, ainda pouco desestabilizado pela sacarose com relação à água.

O aumento da estabilidade conformacional de estados parcialmente enovelados de proteínas, pela adição de sais como KCl, NaTCA, (Goto e Fink, 1990; Nishii et al, 1995) e de osmólitos (sacarose, sorbitol, polietileno glicóis, amino-ácidos, etc), tem sido observado para várias proteínas (Back et al, 1979; Lee e Timasheff, 1981; Arakawa e Timasheff, 1982; Lee e Lee, 1987; Liu e Bolen, 1995). Por exemplo, as condições iônicas, quanto aos tipos de sais e concentrações necessárias para estabilizar o estado intermediário I da apoMb em pH ácido estão bem estabelecidas. Isto tem permitido, entre outras, estabelecer as características estruturais deste estado tanto por dicroísmo circular (Barrick e Baldwin, 1993; Goto et al, 1994) quanto por NMR (Englander et al, 1993). Estes estudos têm demonstrado que o estado I, com relação ao estado N da apoMb, apresenta um conteúdo de aproximadamente 75% de hélices α e a quase ausência de

contatos terciários. A comparação entre os espectros de dicroísmo circular medidos na presença de 0,5 M de KCl e na presença de 3 molal sacarose, que será apresentada adiante, mostra que o conteúdo de estrutura secundária do estado I estabilizado por ânions ou pelo osmólito a pH ácido, são muito similares. Características semelhantes de estabilização de estados intermediários de citocromo-c por sais e diferentes solutos neutros a pH ~ 2 têm sido observadas (Neves, 1996; Davis-Searles et al, 1998; Kamiyama, et al, 1999).

A exemplo do que acontece com a desnaturação da apoMb em água, observa-se na figura 4.2.3 a formação de um ombro nas curvas de titulação, indicando quantitativamente a presença do estado intermediário, que com o aumento da concentração de sacarose é mais pronunciada. Outra indicação do estado intermediário aparece para valores de pH abaixo de 1,5, em que ocorre a transição de re-enovelamento do estado D para um estado intermediário que aqui é devido ao aumento da concentração de Cl^- em solução. É necessário ressaltar que os estados A e I são considerados conformações semelhantes, pois ambos apresentam o mesmo conteúdo de estrutura secundária medidas por DC (Goto e Fink, 1994). Uma inspeção mais detalhada dos gráficos de elipticidade da apoMb versus pH, para valores de pH menores que 1.5, mostrados na figura 4.2.3, mostra que a transição do estado D para o estado A (ou I), induzida só pela ligação de Cl^- na ausência de sacarose, é facilitada na presença de sacarose, pois: 1) a curva da transição D $\Leftrightarrow$ A desloca-se para valores de pH maiores; 2) a um dado pH fixo nesta região, o aumento da concentração de sacarose induz o aumento da elipticidade da proteína. Portanto, o aumento das concentrações de Cl^- e de sacarose contribuem sinergisticamente na estabilização do estado intermediário, o estado A (ou estado I).

Os resultados até aqui apresentados demonstram claramente que a sacarose dificulta a desnaturação da apoMb. O aumento da concentração deste soluto estabiliza tanto o estado enovelado (N) quanto o estado parcialmente enovelado (I) e esta estabilização parece seguir uma hierarquia segundo a compactação protéica, pois a



sacarose aumenta a estabilidade do estado nativo em relação ao estado intermediário e do estado intermediário em relação ao estado desnaturado. Contrariamente, o Cl^- atua desestabilizando o estado nativo (N) a favor do estado intermediário (I).

4.3. Determinação da diferença de número de prótons ligados aos estados Desnaturado e Intermediário em relação ao estado Nativo.

Um parâmetro que pode ser obtido ainda das curvas da figura 4.2.3 é o número de prótons que se ligam no processo de desnaturação da apoMb na ausência ou presença da sacarose, através da equação de “linkage” de Wyman (1964) para ligação de ligantes e posteriormente expandido por Tanford (1969) para incluir o efeito de componentes de baixo peso molecular em altas concentrações no equilíbrio das reações com macromoléculas. Para o ligante H^+ tem-se:

$$\frac{\partial \log(K)}{\partial(\text{pH})} = -\Delta n_{\text{H}^+} \quad (4.3.1)$$

onde K é a constante de equilíbrio entre os estados final e inicial da reação, e $\Delta n_{\text{H}^+} = n_{\text{H}^+}^{\text{final}} - n_{\text{H}^+}^{\text{inicial}}$, é a diferença entre o número de prótons ligados ao estado final e inicial da transição.

O inserto da figura 4.3.5 mostra o gráfico da elipticidade molar em 222 nm medida para apoMb, em solução 3,0 molal de sacarose, em função do pH. Conforme discutido acima, nestas condições a apoMb coexiste em duas conformações em equilíbrio, a nativa e a intermediária.

A figura 4.3.5 mostra o gráfico do logaritmo da constante de equilíbrio entre os estados I e N, isto é, $K=[\text{I}]/[\text{N}]$, calculadas a partir dos resultados mostrados no inserto, em função do pH. A inclinação desta curva fornece $\Delta n_{\text{H}^+} = 1,10 \pm 0,08$ moles de H^+ /mol de apoMb. Este valor indica que o estado intermediário é estabilizado pela ligação de

aproximadamente 1 H^+ a mais em relação ao número de prótons associados à proteína no estado nativo.

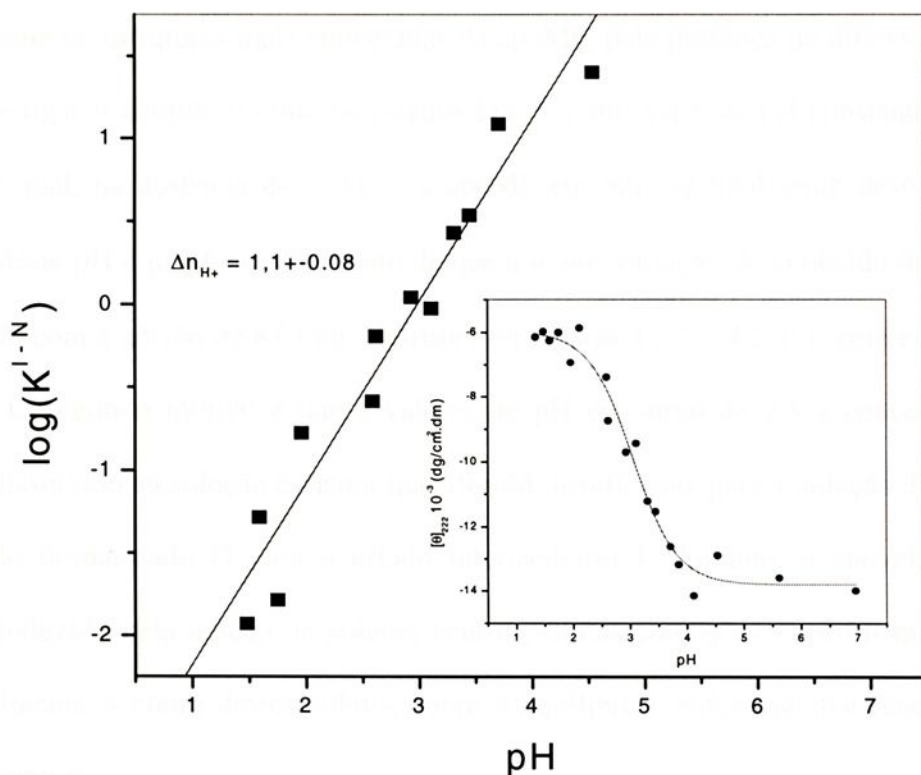


Figura 4.3.5. Dependência da constante de equilíbrio observada $\log(K_{\text{obs}})$, onde: $K_{\text{obs}} = [N]/[I]$ com o pH em sacarose 3,0 molal, cuja inclinação, representada pelo ajuste linear, indica que $-1,10 \pm 0,08$ moles de H^+ se dissociam por mol de apoMb (5 μM) na transição do estado $I \rightleftharpoons N$. O inserto desta figura traz a relação da elipticidade θ_{222} em função do pH, para esta solução de sacarose.

Este valor está de acordo com o valor determinado por Barrick e Baldwin (1993) em experimentos de desnaturação ácida da apoMb em diversas concentrações de uréia e a 0°C . Esta concordância reforça a sugestão de que o estado intermediário estabilizado por sacarose, em pH ácido e desnaturante, é equivalente ao estado intermediário de desnaturação ácida da apoMb observado em outras condições experimentais. A comparação de dados obtidos em condições tão distintas chama a atenção para resultados tão semelhantes, sugerindo que a passagem pelo estado intermediário está

obedecendo a uma sequência de conformações estruturais na reação enovelamento-desenovelamento.

Deste ponto em diante, a estratégia adotada para o estudo do efeito estabilizante de estruturas mais enoveladas da apoMb, pela presença de diferentes solutos será investigar o equilíbrio entre os estados D e I, a um valor de pH constante e igual a 2,46, no qual, na ausência de solutos, a apoMb encontra-se totalmente desnaturada. A escolha deste pH é justificada pelo fato de que a maior variação do conteúdo de hélices α da apoMb com a adição de KCl ou sacarose (ver figuras 4.2.2 e 4.2.3) ocorre em torno do pH 2,5. O segundo motivo é que à valores de pH em torno de 2,5 a concentração de cloreto dissolvido na solução é menor que 10 mM, insuficiente para a indução da transição do estado desnaturado D para o estado intermediário I. Portanto, o enovelamento da apoMb induzido pela adição de solutos neutros, nestas condições experimentais, reflete essencialmente o efeito destes solutos sobre o equilíbrio conformacional (energética de enovelamento).

4.4. Experimentos de titulação com sacarose e íon cloreto a pH fixo em 2,46.

A figura 4.4.6 mostra o gráfico da dependência da elipticidade molar da apoMb em 222 nm, medidos em soluções a pH = 2,46 como função das concentrações de sacarose e KCl em tampão citrato de sódio 10 mM. Estas curvas demonstram que o KCl é muito mais efetivo que a sacarose, em promover o reenovelamento da apoMb para o estado intermediário, uma vez que a concentração de sacarose necessária para induzir 50% de reenovelamento é bastante maior que a concentração requerida com KCl, e valem 2,36 molal de sacarose e 0,07 molar de Cl^- . Entretanto, os valores máximos da elipticidade molar em 222 nm obtidos pela adição de Cl^- ou de sacarose convergem para um mesmo valor ($[\theta]_{222} \cong 13800 \cdot 10^{-3} \text{ graus.cm}^2/\text{dmol}$). Isto sugere que o conteúdo de hélices α do estado

intermediário estabilizado pelo ânion ou pela adição do agente osmólito é o mesmo. A similaridade entre as conformações do estado intermediário da apoMb a pH = 2,46 estabilizado pela ação de KCl ou pela ação de sacarose é reforçada pela comparação entre os espectros de dicroísmo circular da apoMb nestas duas condições.

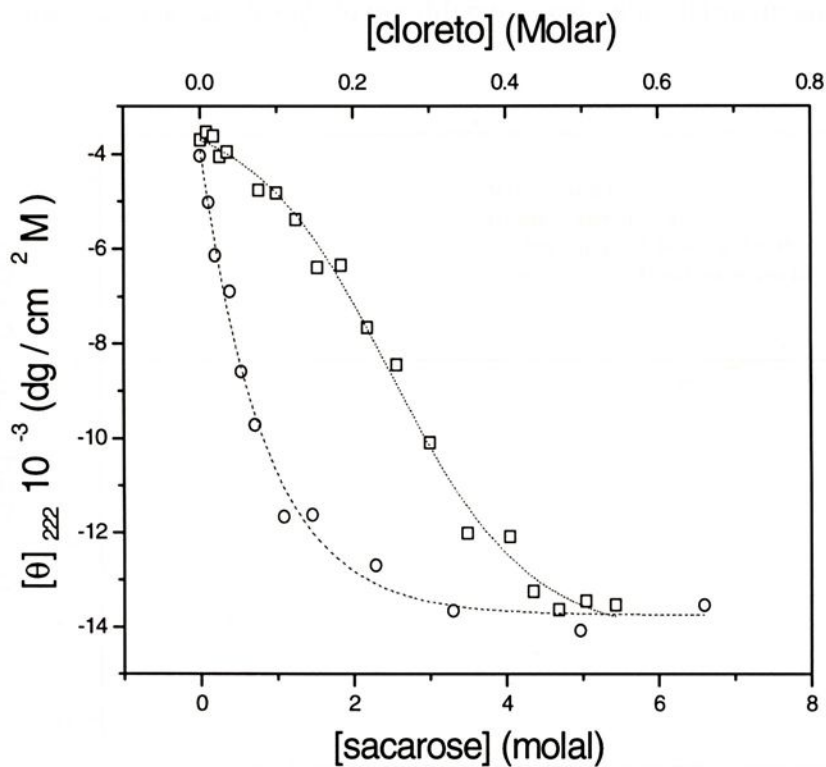


Figura 4.4.6. Dependência da elipticidade molar residual da apoMb (5 μM) medida em 222 nm a pH 2,46 em função da concentração molal da sacarose (□) escala inferior, e da concentração molar de Cl⁻ (o) escala superior. Note que a escala de concentração de sacarose é 10 vezes maior do que a escala da concentração de KCl.

A figura 4.4.7 mostra os espectros de DC para a apoMb na região de 200 a 250 nm medidos em tampão citrato de sódio 10 mM a pH 6,85 (N), em tampão a pH 2,46 (D), em solução de sacarose 5 molal a pH 2,46 (I) e em solução de cloreto de potássio 0,5 M a pH 2,46 (I). Os espectros do estado Nativo e do estado desnaturado foram medidos na ausência de solutos e à pH 6,85 e 2,46, respectivamente, são apresentados como termo de

comparação. Os espectros registrados a pH 2,46, na presença de KCl e de sacarose são praticamente iguais. Nota-se, portanto, que ambos os solutos estabilizam um estado conformacional intermediário com quantidades de hélices α semelhantes, embora os mecanismos de ação desta estabilização pareçam ser bastante distintos. Estes resultados sugerem que este estado I é um estado estruturado único e termodinamicamente estável da apoMb, uma vez que ele pode ser alcançado por diferentes caminhos termodinâmicos.

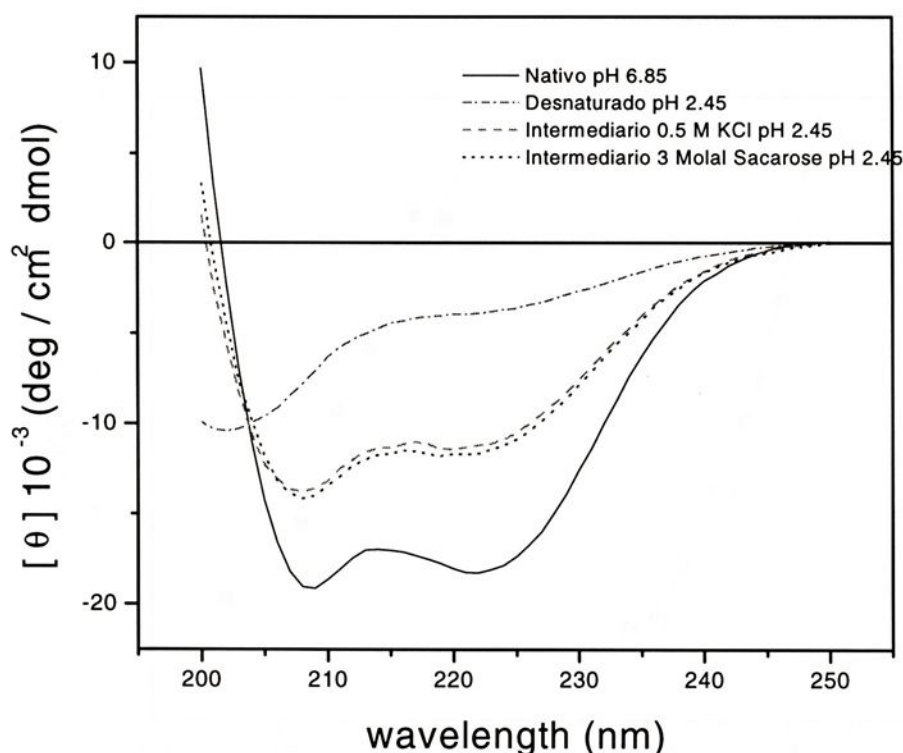


Figura 4.4.7. Espectros de DC expressos em elipticidade molar residual para a apoMb a uma concentração de 5 μM , em condições nativas em tampão citrato de sódio 10 mM a pH 6.85 (—); os estados intermediários em soluções a pH 2,46 de sacarose 5 molal (....), de cloreto de potássio 0,5 molar (.....); e o estado desnaturado em tampão citrato de sódio 10 mM, também a pH 2,46 (— . —).

A distinção entre o mecanismo de estabilização do estado intermediário da apoMb por KCl e o mecanismo de estabilização deste estado por sacarose pode ser investigada supondo-se, inicialmente, que estes solutos ligam-se preferencialmente ao estado intermediário da proteína, deslocando o equilíbrio conformacional do estado D para

o estado I. Esta possibilidade pode ser analisada através do gráfico do logaritmo da constante de equilíbrio conformacional, $K=[I]/[D]$, em função do logaritmo da concentração destes solutos e via equação de “linkage” de Wyman resulta em:

$$\frac{d \log(K^{D-I})}{d \log(a_s)} = \Delta n_s = (n_s^I - n_s^D)$$

(4.4.1)

onde a_s é a atividade do soluto, n_s^I e n_s^D representam os números de solutos ligados ao estado I e D, respectivamente.

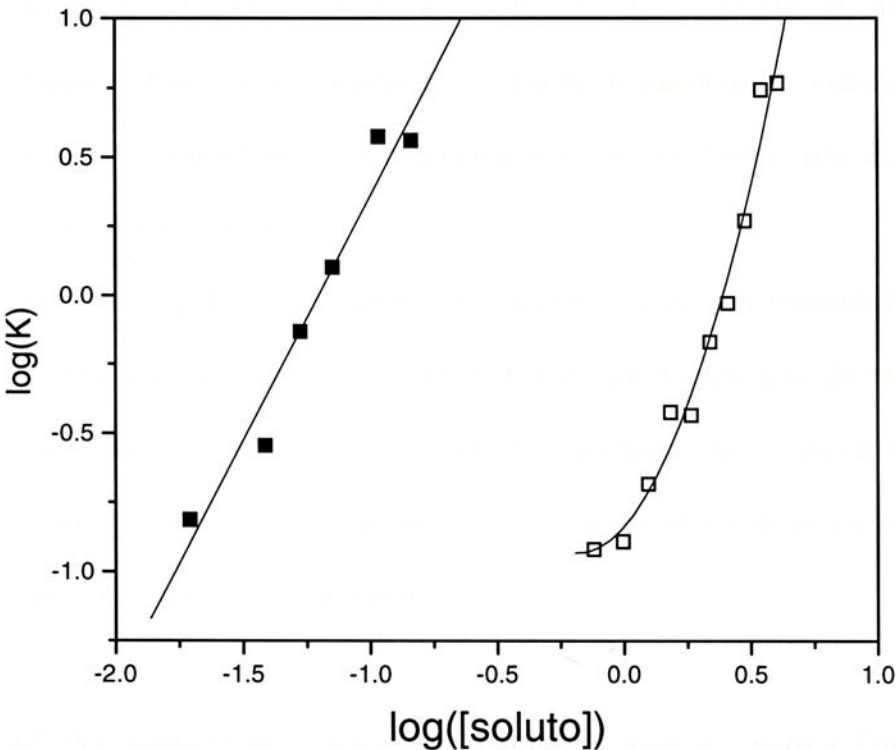


Figura 4.4.8 Das curvas de titulação da apoMb por cloreto de potássio e sacarose, a pH 2,46 (figura 4.3.6), foi determinada a constante de equilíbrio K para a determinação das curvas do log(K) como função do log([soluto]), que fornece, da inclinação da curva para o cloreto por ajuste linear, que 1,7 moles de Cl- (■) se ligam por mol de apoMb.

Na figura 4.4.8 são apresentados os gráficos de logK versus log([Cl⁻]) e logK versus log([sac]), onde K foi calculado dos dados apresentados na figura 4.4.6. Observa-se que log(K^{D-I}) varia linearmente com log([Cl⁻]), com uma inclinação dada por

$\Delta n_{Cl^-} = 1.7$ moles de Cl^- que se associam por mol de apoMb. A linearidade entre $\log(K)$ e $\log([Cl^-])$ tem sido interpretada como decorrente da ligação preferencial de Cl^- ao estado I da proteína, que pode ser definida por uma reação por passos:



Em que $n = f(k_i, Cl^-)$, com $n^I_{Cl^-}$ e $n^D_{Cl^-}$ funções das constantes de afinidade deste íon com a proteína. Caso a concentração de Cl^- seja muito maior que as constantes de dissociação, n^I e n^D não dependem desta concentração e são constantes. Isto explica a linearidade de $\log(K)$ com $\log([Cl^-])$.

Entretanto $\log(K)$ é não linear para sacarose e esta não linearidade pode indicar que: 1) se a estabilização do estado I ocorre por ligação preferencial do soluto ao estado I, então a afinidade do soluto pelos sítios em I é muito baixa, ou 2) o mecanismo de estabilização é outro que não o de ligação do soluto. A possível distinção entre este e outros mecanismos estão apresentados a seguir.

4.5 Dependência da Constante de Equilíbrio Aparente para a Transição entre os Estados D e I com a Concentração do soluto, Prótons e a Atividade de Água.

Com o objetivo de elucidar sobre a estabilização do estado I, por adição de solutos inertes ao meio, estudou-se a dependência da constante de equilíbrio aparente para a transição entre os estados D e I variando-se a concentração e o tamanho do soluto e também a concentração de prótons. Os gráficos mostrados na figura 4.5.9 mostram que o equilíbrio entre as diversas conformações assumidas pela apoMb em solução é deslocado tanto pela mudança de pH quanto pela adição de sacarose ou sorbitol. Os detalhes da ação

destes agentes sobre a estrutura da apoMb são obtidos medindo o equilíbrio entre as espécies D e I em função da concentração de sacarose e de sorbitol em dois valores de pH fixos. Assim, as medidas de elipticidade da apoMb, registrados em 222 nm para a concentração de sacarose nos valores de pH 2,46 e 2,61 e para a concentração de sorbitol nos pH 2,46 e 2,75, permitiram calcular a constante de equilíbrio aparente observada (K_{obs}) para a desnaturação-renaturação protéica, supondo um modelo de transição entre dois estados, o estado desnaturado e o estado intermediário. Esta suposição se justifica pelas seguintes observações: 1) o estado nativo é maximamente instável no intervalo de pH que varia de 2,0 a 3,0; 2) neste intervalo de pH e na ausência de solutos, o estado desnaturado encontra-se maximamente estabilizado; e 3) neste intervalo de pH a concentração de íons cloreto devido a adição de HCl à solução é sempre menor que 10 mM, concentração esta insuficiente para induzir a formação do estado A (Goto e Fink 1990). Portanto, a adição destes solutos neutros desloca o equilíbrio entre os estados desnaturado (D) e intermediário (I). A constante de equilíbrio aparente K_{obs} , determinada nas condições descritas acima, refere-se, portanto, ao equilíbrio entre os estados D e I.

Uma análise das curvas dos gráficos a e b da figura 4.5.9 sobre a dependência do logaritmo de K_{obs} em função do logaritmo da concentração de sacarose e de sorbitol para os dois valores de pH medidos pode ser feita através da equação de “linkage” de Wyman:

$$\frac{d \log(K^{D-I})}{d \log(a_s)} = \Delta n_s = (n'_s - n^D_s) \quad (4.5.1)$$

para fornecer a diferença entre o número de ligantes ligados ao estado I e o número de ligantes ligados ao estado D, quando se considera o reenovelamento da proteína devido à ligação preferencial do soluto a uma destas espécies conformacionais.

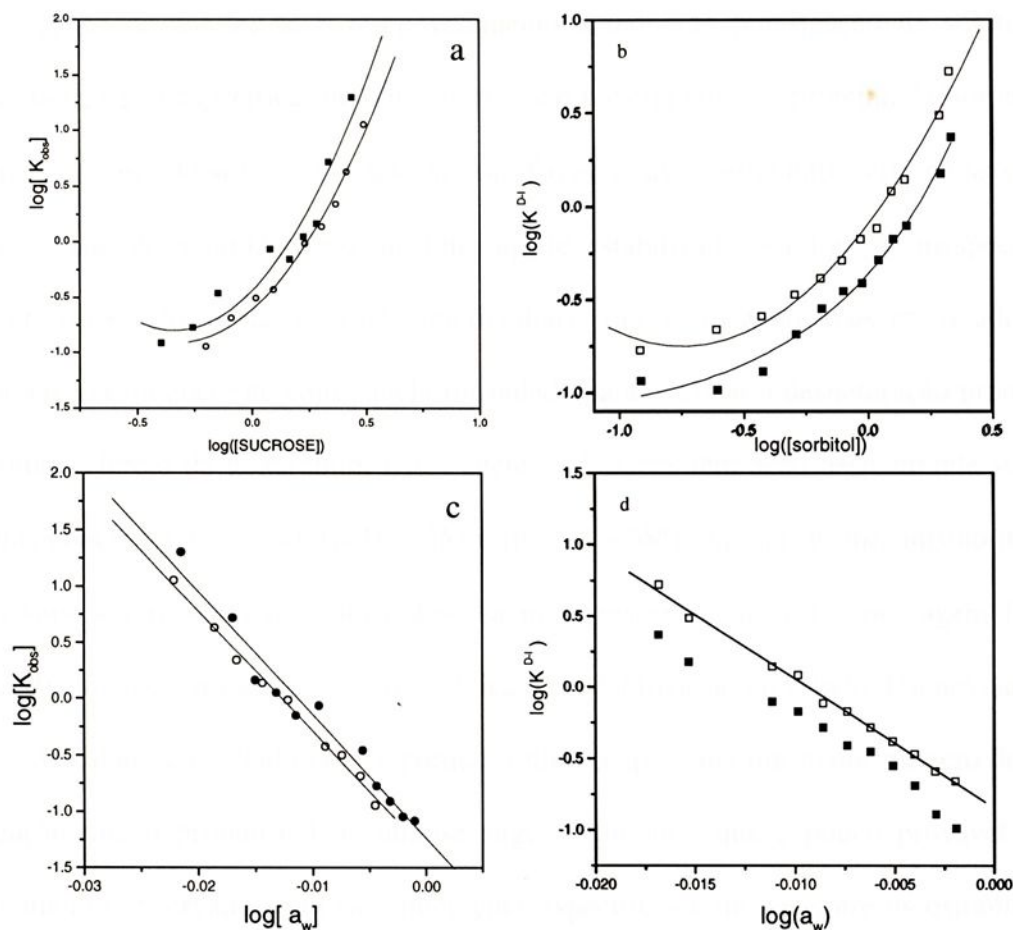


Figura 4.5.9. Medidas feitas em sacarose a pH 2,46 (■) e 2,61 (◇) (a e c) e em sorbitol a pH 2,46 (□) e 2,75 (■) (b e d) para estudar a dependência da constante de equilíbrio aparente na transição da apoMb entre os estados D e I acompanhadas por DC. As curvas a e b mostram a variação de $\log(K_{obs})$ versus $\log([soluto])$ para ambos os solutos e as curvas c e d apresentam a variação de $\log(K_{obs}) \times \log(a_w)$. A relação linear destas indicam que para os valores de pH utilizados, a mesma inclinação ou o mesmo número de moléculas de água envolvidas no processo.

As curvas destes gráficos, caracterizando o aumento da inclinação com o aumento da concentração dos solutos, sugerem que: 1) ambos, sacarose ou sorbitol ligam-se preferencialmente ao estado I da apoMb, e 2) a diferença entre o número de solutos ligados ao estado I a mais que ao estado D cresce indefinidamente com o aumento da concentração destes solutos. Este aumento indiscriminado no número de solutos ligados implicaria em uma energia de interação proteína-soluto bastante baixa, tanto para sacarose

quanto para sorbitol. Ademais, o fato de o enovelamento da apoMb ocorrer para altas concentrações de soluto, se o re-enovelamento é induzido por ligação de soluto, esta ligação deve ser inespecífica; de outra forma não haveria como a proteína “adsorver” um número crescente de solutos ligados. Se este fosse o caso, entretanto, seria de se esperar que o estado desnaturado fosse de fato aquele estabilizado por ligação inespecífica e crescente do soluto, e não o estado intermediário que é o estado mais enovelado. Esta interpretação está coerente com aquela formulada para explicar a desnaturação promovida por uréia e cloreto de guanidínio. Estes agentes clássicos têm ação desnaturante somente em altas concentrações ($[GdnHCl] > 2M$ e $[uréia] > 6M$). Apesar do mecanismo de ação destes sais serem ainda desconhecidos, há um consenso que estes interagem fraca e inespecificamente com a cadeia polipeptídica e a estabilização do estado desenovelado em relação ao estado enovelado ocorre porque o último apresenta um maior número de sítios de ligação que o primeiro. Esta análise sugere, portanto, que é pouco provável que o enovelamento observado se deva a interações específicas e diretas entre os osmólitos e a apoMb.

A análise alternativa à interação direta soluto/proteína foi considerar o efeito da adição do soluto nas propriedades coligativas do solvente. Dentre estas, o efeito da adição do soluto sobre a atividade de água (Colombo et al, 1992). Com o desenovelamento da proteína, a superfície protéica está exposta ao solvente e consequentemente hidratada. Portanto a água é um ligante nesta reação e as mudanças na atividade de água devem alterar o equilíbrio conformacional da macromolécula através da energia de solvatação. Esta possibilidade pode também ser analisada pela equação de “linkage” de Wyman:

$$\frac{d \log K_{obs}}{d \log(a_w)} = \Delta n_w \quad (4.5.2)$$



em que, a contribuição da ligação de água à proteína é dada quantitativamente por Δn_w , o número de moléculas de água ligadas ao estado mais compacto na transição para o estado menos compacto da proteína.

Os gráficos c e d da figura 4.5.9 mostram a dependência do logaritmo de K_{obs} em função do logaritmo da atividade de água para a sacarose e para o sorbitol, respectivamente. Como os sítios de hidratação expostos ao solvente devem estar sempre ocupados (hidratados), Δn_w deve ser constante e independente da atividade do solvente. Portanto, $\log(K_{obs})$ deve variar linearmente com $\log(a_w)$. Esta relação linear é observada nos gráficos mostrados nas figuras 4.5.9 c e d. Nota-se ainda que a variação na hidratação, calculadas pela inclinação destas curvas, é maior para a sacarose que para o sorbitol e não depende do pH, dentro desta faixa de valores utilizados.

Outro aspecto a ser ressaltado na figura 4.5.9 é a inter-relação entre o efeito da atividade de água e do pH sobre o equilíbrio dos estados D e I para a apoMb. Nota-se que com o aumento do pH de 2,46 para 2,61 o valor da atividade de água em que 50% da transição ocorre é menor. Portanto, quanto menor o pH da solução maior é o trabalho osmótico necessário para atingir 50% da transição. A origem deste efeito está em que o trabalho necessário para transferir um próton ligado à proteína de volta à solução é tanto maior quanto menor o pH da solução.

Este balanço entre os dois trabalhos químicos pode ser quantificado, considerando explicitamente a dependência da constante de equilíbrio K_{obs} com o pH e com a atividade de água, isto é, que $K_{obs} = K_{obs}(pH, a_w)$.

Considerando-se o diferencial:

$$d \log(K_{obs}) = \left. \frac{\partial \log(K_{obs})}{\partial pH} \right|_{a_w} dpH + \left. \frac{\partial \log(K_{obs})}{\partial \log(a_w)} \right|_{pH} d \log(a_w)$$

reconhecendo as equações de “linkage”:

$$\frac{\partial \log(K)}{\partial pH} = -\Delta n_H \quad \text{e} \quad \frac{\partial \log(K)}{\partial \log(a_w)} = \Delta n_w \tag{4.5.3}$$

tem-se:

$$d \log(K_{obs}) = -\Delta n_H . dpH + \Delta n_w . d \log(a_w)$$

A um dado valor fixo de K_{obs} , por exemplo a 50% da transição a equação acima, após rearranjo, pode ser escrita:

$$\frac{d \log[a_w(50\%)]}{dpH} = + \frac{\Delta n_H}{\Delta n_w} \tag{4.5.4}$$

pois, $\Delta n_w < 0$ e $\Delta n_H < 0$ implicam em

$$\frac{\partial \log(a_w)}{\partial pH} > 0$$

e portanto o aumento do pH ($dpH > 0$) levam a $\partial \log(a_w) > 0$ e assim numa transição com $a_w^{1/2}$ maior.

Tabela 4.5.I A tabela mostra os valores calculados dos resultados da figura 4.4.9. Estão apresentados os valores de Δn_w , $\log(a_w)$ a 50% e Δn_{H+} calculados pela equação 4.5.1, para os diferentes solutos e valores de pH utilizados.

soluto	pH	Δn_w	$\log(a_w)$ (50%)	Δn_{H+}
sacarose	2,46	109 ± 7	-0,013	$1,43 \pm 0,08$
sacarose	2,61	106 ± 4	-0,011	
sorbitol	2,46	75 ± 10	-0,0124	
sorbitol	2,75	80 ± 8	-0,0081	
				$1,15 \pm 0,15$

Esta equação demonstra que a taxa de variação no valor de $\log(a_w)$, onde 50% da transição ocorre devido à mudança no valor do pH da solução, é diretamente proporcional a razão entre a diferença do número de prótons associados aos estados D e

I ($-\Delta n_{H^+}$) e a diferença do número de moléculas de água (Δn_w) associados aos estados D e I.

O ajuste linear dos gráficos mostrados na figuras 4.5.9 c e d fornecem tanto o valor de Δn_w quanto de $\log(a_w)$ a 50%, para cada soluto e cada valor de pH. Este valores estão mostrados na tabela 4.5.I, onde também se observa os valores estimados para Δn_H a partir da equação 4.5.1. Estes resultados mostram que na transição do estado totalmente desenovelado da proteína para o estado parcialmente enovelado I, induzida pela diminuição da atividade de água, a apoMb libera entre 1 e 1,5 H^+ para a solução. Com o pequeno número de valores de pH, nos quais Δn_w foi medido, é difícil dizer se estes números encontrados são distintos ou não. Entretanto, estas medidas de Δn_{H^+} na transição $D \rightleftharpoons I$ estão compatíveis com aquela medida por Barrick e Baldwin (1993).

Nota-se também que, a variação de hidratação medida com a diminuição de a_w para a sacarose é maior que aquela medida para o sorbitol. Apesar disto os espectros de dicroísmo circular do estado I estabilizado com concentrações saturantes de sacarose são iguais àqueles estabilizados por concentrações saturantes de sorbitol. Para ambos os solutos a fração de hélices α formada é a mesma, sugerindo que o estado intermediário é o mesmo, independente do soluto utilizado para sua estabilização e que Δn_{H^+} pode ser igual para estes solutos. Anteriormente notamos que o espectro de DC do estado intermediário estabilizado por sacarose também não difere do estado I estabilizado em alta concentração de KCl. Portanto, diferentes condições experimentais, propiciando diferentes tipos de interações soluto/solvente/proteína, parecem estabilizar um mesmo estado intermediário da apoMb. Neste caso, o estado intermediário I da apoMb é certamente um estado termodinamicamente estável (representa um mínimo energético), com características conformacionais bem definidas do ponto de vista das interações que o estabilizam. Esta

conclusão é mais uma evidência que o re-enovelamento da proteína por estes solutos não ocorre devido a interações diretas proteína-soluto.

4.6. Experimentos com diferentes osmólitos a pH 2,46.

Solutos de grupos químicos funcionais diferentes tal como os açúcares ribose, glicose e sacarose, os polialcoóis sorbitol e arabitól, e ainda polietileno glicóis de diferentes massas moleculares foram usados para induzir a transição do estado desnaturado (D) para o estado parcialmente enovelado (I) a pH 2,46. Em comum, todos estes solutos são preferencialmente excluídos do domínio protéico como indicam medidas de densidade específica da proteína em solução como função da concentração destes solutos publicados na literatura [Timasheff e colaboradores (1981, 1982, 1990, 1992, 1993, 1995, 1998)]. Apesar destas evidências de exclusão, a realização de experimentos com solutos distintos quanto à composição química e tamanho teve como objetivo discriminar entre diferentes mecanismos de ação do soluto na indução do re-enovelamento protéico para valores de pH nos quais, na ausência destes, a apoMb se encontra desnaturada. Um mecanismo, de ação direta do soluto, na estabilização do estado intermediário através da ligação preferencial deste ao estado I. Outro, de ação indireta, via diminuição da atividade de água com o aumento da concentração do soluto. A comparação inicial entre os efeitos da sacarose e sorbitol, discutidos anteriormente, favorece a segunda interpretação, ou seja, o efeito devido à variação da atividade de água. Neste ponto, a comparação de efeitos diretos e indiretos é estendida para outros solutos. Um terceiro mecanismo de enovelamento, também indireto, é considerado analisando efeitos de volume excluído proteína-soluto sobre o potencial químico da proteína (Minton, 1983, 2000; Wills e Winzor, 1993).

Os espectros de DC característicos da transição entre os estados D e I, da apoMb a pH 2,46, induzidos pela adição de PEG600 estão mostrados na figura 4.5.10. O máximo re-enovelamento da apoMb alcançado com a adição de PEG600, tem um espectro



de DC igual aos espectros mais enovelados da proteína, neste pH, estabilizados por KCl, sacarose e sorbitol já mostrados. A mesma elipticidade molar residual máxima em 222 nm foi encontrada para concentrações saturantes dos demais solutos utilizados: glicose, ribose, arabitol, PEG400, PEG1000 e PEG2000. Estes resultados sugerem que o estado I estabilizado por qualquer destes solutos tem pelo menos a mesma quantidade de estrutura secundária. O ponto isodicroico em ~ 204 nm permite ressaltar a maior probabilidade de existência de dois estados presentes em solução durante o processo.

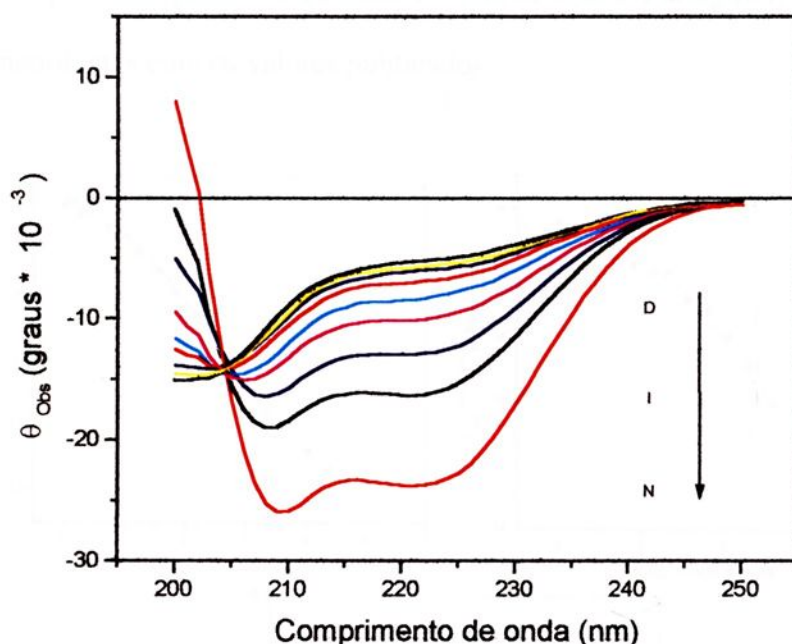


Figura 4.6.10. Espectros obtidos em DC para a apoMb (5 μ M) em solução a pH 2,46 durante a titulação por PEG600. A seta na figura indica a transição de estados desnaturados (em água) para estados intermediários (em concentrações maiores de soluto). O espectro a pH 6,8 do estado nativo foi incluído para comparação.

As curvas de elipticidade observada para a apoMb em 222 nm em função da concentração molal de soluto, estão apresentadas nas figuras 4.6.11 até 4.6.13 para os diferentes grupos de osmólitos: os açúcares sacarose, glicose e ribose, na figura 4.6.11; os polióis sorbitol e arabitol, na figura 4.6.12; e os polietilenos glicóis 400, 600, 1000 e 2000, na figura 4.6.13.

O aspecto sigmoidal destas curvas indica que, como observado com a sacarose (figura 4.4.6), o efeito do aumento da concentração destes solutos promove a compactação protéica com algum grau de cooperatividade. O cálculo de K_{obs} da transição $D \rightleftharpoons I$ a partir das curvas que não indicaram, claramente, a máxima estabilização do estado final foi realizado, utilizando valores característicos da elipticidade molar destes estados publicados na literatura (Griko e Privalov, 1988; Goto e Fink, 1990; Barrick e Baldwin, 1993; Fink et al, 1994; Nishii et al, 1994 e 1995; Gast et al, 1994). Os valores da elipticidade molar da apoMb completamente desnaturada e do estado intermediário aqui determinados, para os açúcares e os PEG 600, 1000 e 2000, atingiram valores estáveis e bastante concordantes com os valores publicados.

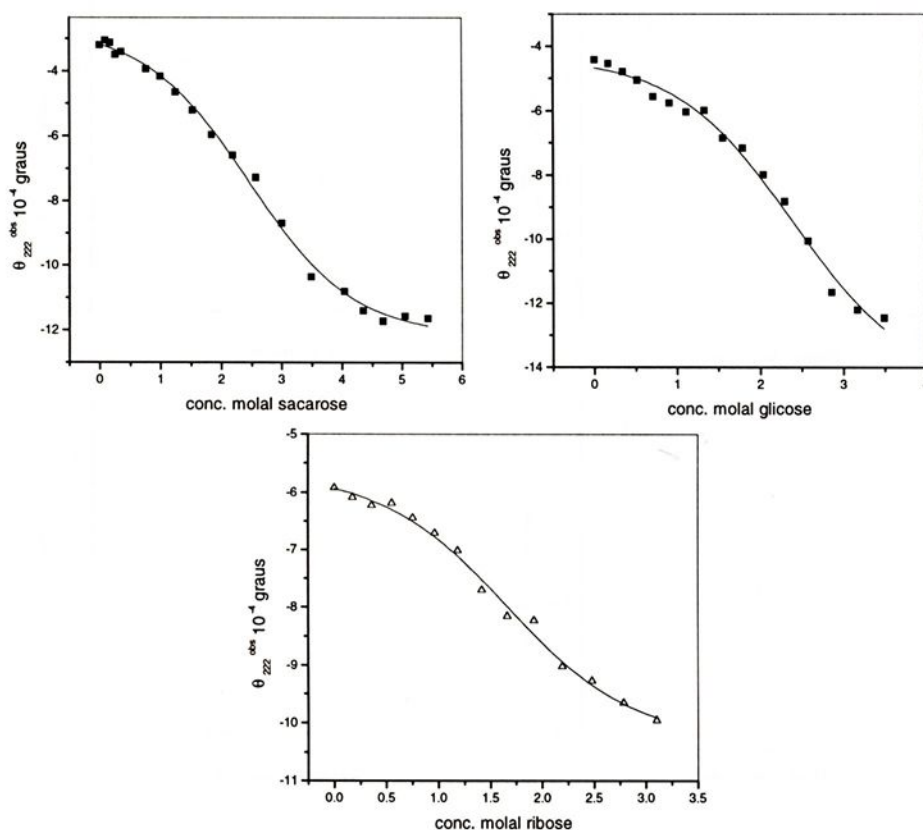


Figura 4.6.11 Curvas de (θ_{222}) , em função da concentração molal dos solutos sacarose, glicose e ribose, na titulação da apoMb (5 μM) a pH fixo em 2,46 medida por DC.

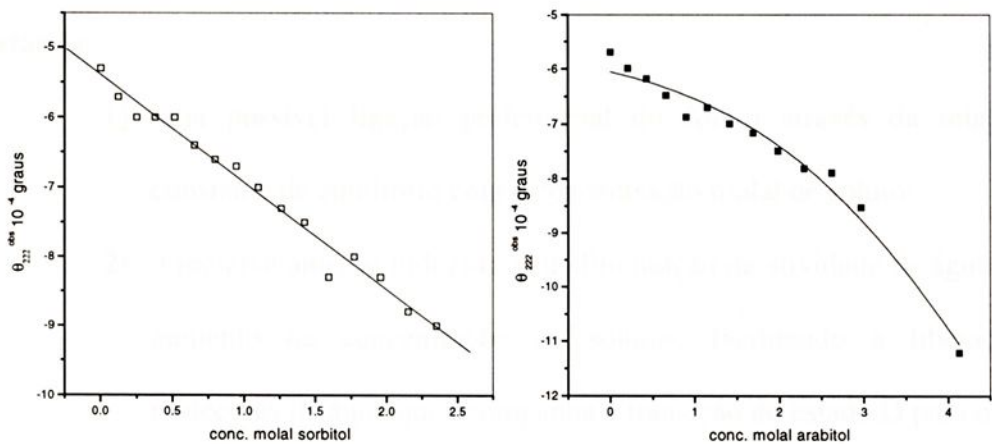


Figura 4.6.12 As curvas representam as elipticidades observadas (θ_{222}) para a apoMb (5 μ M) versus as concentrações do sorbitol e arabitol a pH fixo em 2,46 durante as titulações por estes solutos.

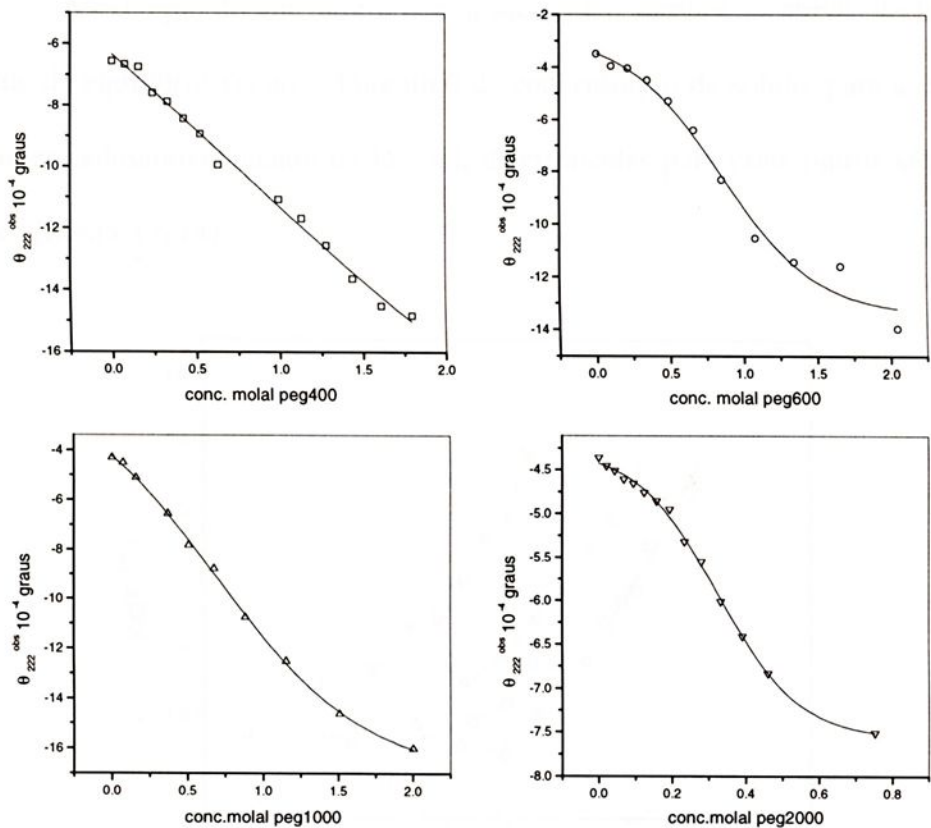


Figura 4.6.13 Resultado das titulações da apoMb (5 μ M) em pH 2,46 por polietilenos glicóis de diferentes pesos moleculares (PEG400, PEG600, PEG1000 e PEG 2000), medidas da elipticidade em 222 nm. As curvas apresentam a variação de θ_{222} versus a concentração molar dos solutos .

Como anteriormente, os dados nestas figuras foram analisados considerando:

- 1) uma possível ligação preferencial do soluto através da relação da constante de equilíbrio com a concentração molal de soluto;
- 2) o reenovelamento induzido pela diminuição da atividade de água com o aumento da concentração de solutos, facilitando a liberação de moléculas de água que acompanha a transição do estado D para o estado I. Esta análise é mostrada através dos gráficos do logaritmo da constante de equilíbrio com o logaritmo da atividade de água, $\log(K) \times \log(a_w)$, mostrados nas figuras 4.6.15 a 4.6.17.

A exemplo do que ocorre com a sacarose e sorbitol, as curvas do logaritmo da constante de equilíbrio versus o logaritmo da concentração de soluto, para a reação de re-enovelamento/desenovelamento de $D \rightleftharpoons I$, determinadas para estes outros solutos são não lineares (figura 4.6.14).

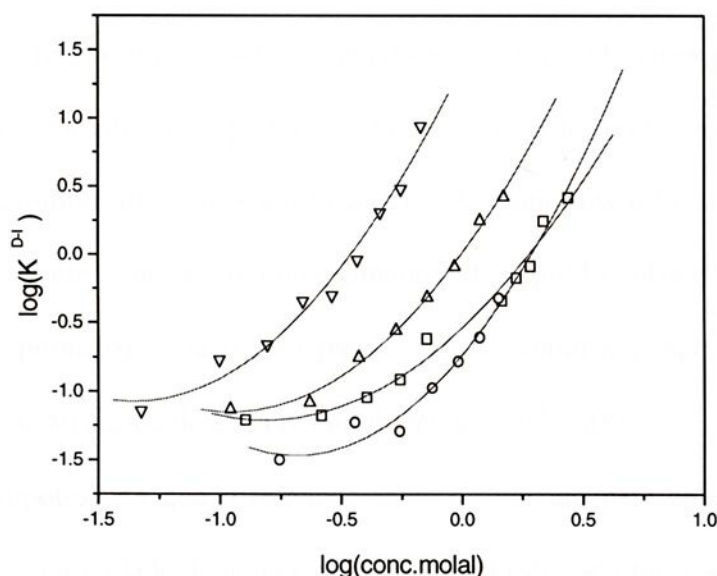


Figura 4.6.14 Apresentação das curvas do logaritmo da constante de equilíbrio, $\log(K^{D-I})$ versus os logaritmo da concentração molal de alguns dos solutos utilizados nas titulações da apoMb (5 μM) a pH 2,46. São eles: PEG1000 (∇), PEG400 (Δ), ribose ($\square$) e sacarose ($\circ$).

Como antecipado, a não linearidade dos gráficos do $\log(K)$ versus $\log([\text{solute}])$ poderia indicar que, se o reenovelamento é induzido pela ligação dos solutos, esta ligação seria muito fraca, inespecífica e preferencial ao estado I. A inespecificidade da ligação observada com todos estes solutos é incompatível, entretanto, com a estabilização preferencial de estados mais compactos em relação aos estados menos estruturados. Desde que uma ligação seja inespecífica espera-se que quanto maior a área da proteína exposta, maior o número de solutos ligados, o que estabilizaria preferencialmente o estado desnaturado e não o estado intermediário, como foi observado. Portanto, é muito pouco provável que o reenovelamento, da apoMb a pH baixo e induzido por solutos neutros, ocorra via interações diretas proteína-soluto.

Outra maneira de analisar a estabilização de estados mais compactos da apoMb, na presença de osmólitos, é indireta e parte do estudo das propriedades termodinâmicas de soluções ternárias de proteína e soluto em meio aquoso. Um número bastante significativo de estudos de densidade (Timasheff e colaboradores, 1981-1995) e de espalhamento de luz (Gast et al, 1994; Nishii et al 1995) de proteína em soluções ternárias, com açúcares, polióis, polietileno glicóis e sais, para diferentes proteínas, levou a conclusão que estes solutos são preferencialmente excluídos pela macromolécula; ou ainda, que as macromoléculas em solução aquosa de osmólitos estão preferencialmente hidratadas. Isto sugere que o re-enovelamento da apoMb observado decorre do deslocamento estequiométrico da reação para o estado conformacional menos hidratado com a diminuição da atividade de água (Colombo et al, 1992-2000).

A hipótese de que o re-enovelamento induzido pela adição de solutos se deve à diminuição da atividade de água é analisada para estes solutos a seguir. O efeito de hidratação preferencial foi analisado das relações entre a constante de equilíbrio de reenovelamento/desenovelamento da apoMb em valores baixos de pH, e a diminuição da atividade de água devida à presença de concentrações crescentes de solutos à solução.



Utilizou-se então a equação de “linkage” de Wyman considerando, agora, a variação do $\log(K_{ap})$ como função do logaritmo da atividade de água para a determinação de Δn_w , que é a diferença do número de moléculas de água envolvidas entre as conformações inicial e final da transição. Nas figuras 4.6.15 até 4.6.17, mostra-se a dependência da constante de equilíbrio aparente para a transição entre os estados desnaturado (D) e estado intermediário (I) com a atividade de água e os respectivos valores calculados de Δn_w , dados pelas inclinações destas curvas. Estes resultados apontam para a estabilização das formas mais compactas da proteína, dificultando a ação desnaturante do ácido.

O comportamento linear das relações de $\log(K)$ versus $\log(a_w)$ reforça a sugestão de que os solutos utilizados são excluídos da superfície protéica, e que esta ação é resultante das variações na atividade de água. No intervalo de atividade de água estudados ($0,95 < a_w < 1$) todo sítio exposto ao solvente deve estar hidratado, isto é, para uma dada conformação, o número de hidratação não varia com a atividade de água, o que implica em Δn_w constante.

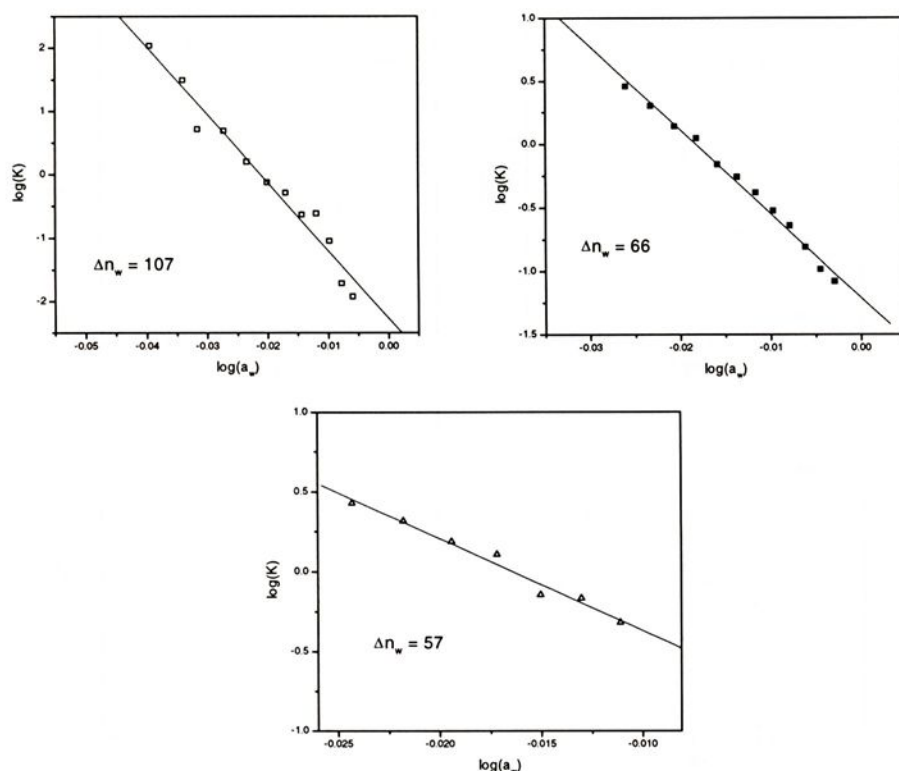


Figura 4.6.15 Gráficos da variação do logaritmo da constante de equilíbrio nas reações de titulação da apoMb (5 μ M) a pH 2,46 por açúcares, versus o logaritmo das atividades de água. Para a sacarose ($\square$), o valor da variação de hidratação (Δn_w) calculado da inclinação da curva é de 107 moles de água/mol de proteína. Para a glicose ($\blacksquare$), o valor de Δn_w foi de 66 moles de água/mol de apoMb e para a ribose ($\triangle$), $\Delta n_w = 57$ moles de água/mol de apoMb.

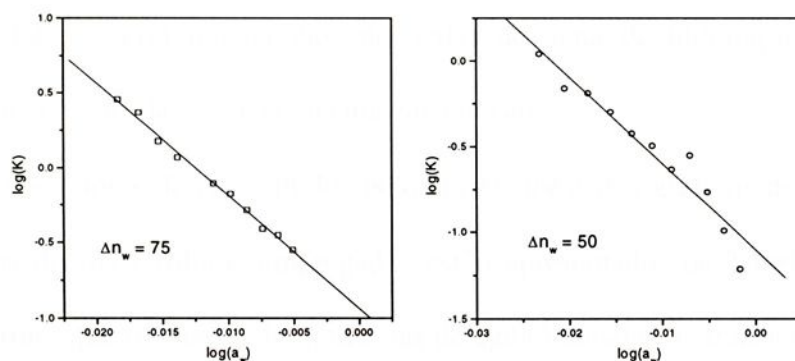


Figura 4.6.16 A variação do $\log(K)$ x $\log(a_w)$, para a titulação da apoMb (5 μ M) a pH 2,46 na presença de sorbitol ($\square$) e arabitol ($\circ$). Das inclinações foram obtidas as respectivas variações de hidratação da proteína: sorbitol, $\Delta n_w = 75$ moles de água/mol de proteína; arabitol, $\Delta n_w = 60$ moles de água/mol de proteína.

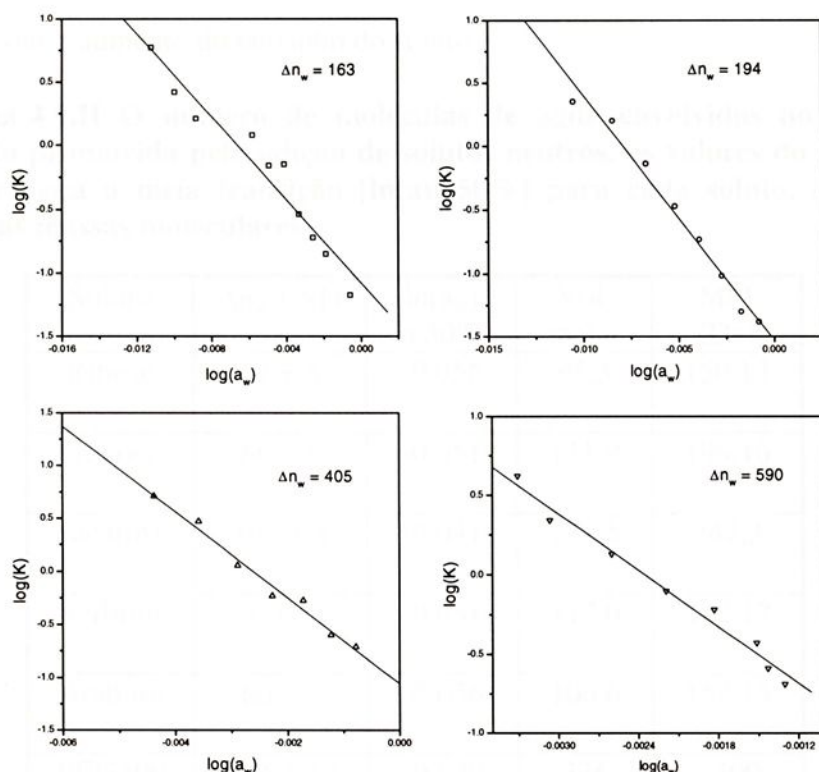


Figura 4.6.17 Para os polietileno glicóis usados na titulação da apoMb (5 μ M) a pH 2,46, $\log(K)$ versus $\log(a_w)$ forneceram: PEG400 (□), $\Delta n_w = 163$ moles de água/mol de proteína; PEG600 (○), $\Delta n_w = 194$ moles de água/mol de proteína; PEG1000 (△), $\Delta n_w = 405$ moles de água/mol de proteína, e PEG2000 (▽), $\Delta n_w = 590$ moles de água/mol de proteína.

Em resumo, estes resultados sugerem um efeito indireto do soluto, atuando como um agente modulador da atividade de água, com consequências diretas sobre a energética de ligação preferencial das moléculas de água de hidratação aos diversos estados conformacionais da macromolécula em solução.

Os valores de Δn_w obtidos pelo ajuste linear dos gráficos de $\log(K)$ versus $\log(a_w)$ para os diversos solutos empregados estão apresentados na Tabela 4.6.II. Estes dados demonstram que o número de moléculas de água liberadas na transição do estado D para o estado I da apoMb cresce com o aumento do tamanho do soluto utilizado para modificar a atividade de água da solução. Este comportamento já havia sido notado nos experimentos com sacarose e sorbitol, para induzir o enovelamento da apoMb a dois

valores de pH, onde se observou um aumenro do número de moléculas de água liberadas na transição com o aumento do tamanho do soluto.

Tabela-4.6.II O número de moléculas de água envolvidas no processo de enovelamento promovida pela adição de solutos neutros, os valores do logarítmo da atividade de água a meia transição [ln(aw)50%] para cada soluto, seus volumes molares e suas massas moleculares.

Soluto	$\Delta n_w \pm SD$	$\ln(a_w)$ a 50%	Vol. molar	MM (Da)
Ribose	57 ± 5	-0.056	95,3	150,13
Glicose	66 ± 6	-0.051	111,9	198,16
Sacarose	107 ± 8	-0.041	211,5	342,3
Sorbitol	75 ± 11	-0.051	117,0	182,17
Arabitol	60 ± 6	-0.056	100,6	152,15
PEG400	164 ± 10	-0.029	336	~400
PEG600	196 ± 12	-0.018	504	~600
PEG1000	405 ± 34	-0.012	804	~1000
PEG2000	595 ± 38	-0.006	1608	~2000

A relação entre a variação do número de moléculas de água (Δn_w) envolvidas entre os estados inicial e final do processo de enovelamento promovido pela presença dos solutos neutros e os respectivos volumes molares está mostrada na figura 4.6.18. Este gráfico, de Δn_w versus o volume molar dos solutos (V_s) mostra uma relação linear entre o número das moléculas de água deslocadas no processo e o tamanho dos solutos para provocar tal enovelamento.

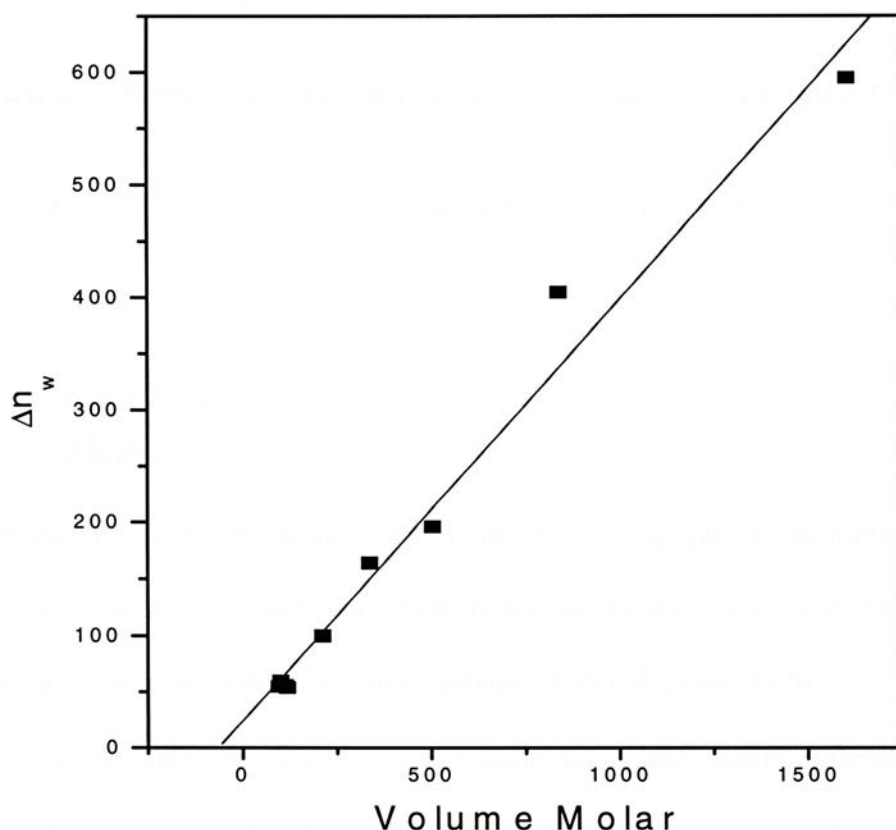


Figura 4.6.18. Correlação entre o número de moléculas de água (Δn_w) envolvidas no processo de estabilização da apoMb a pH 2,46 com o volume molar parcial dos solutos utilizados. O ajuste linear da curva é dado por: $\Delta n_w = -(24 \pm 13) + (0,37 \pm 0,02)V_s$, com $r = 0,99$.

A interpretação imediata do aumento de Δn_w com o tamanho do soluto é sugerida quando se entende Δn_w como um coeficiente de Hill. No formalismo de Hill pode-se descrever o processo de ligação de moléculas de água na transição $I \rightleftharpoons D$ como:



Onde K_w é a constante aparente de ligação das moléculas de água à proteína e vale:

$$K_w = \frac{[D]}{[I]a_w^{n_w}} \quad (4.6.2)$$

ou

$$K_w a_w^{n_w} = \frac{f_D}{1 - f_D}$$

onde f_D é a fração de proteína ligada (desnaturada). Tomando-se o logaritmo, tem-se:

$$\log\left(\frac{f_D}{1 - f_D}\right) = \log(K_D) = \log(K_w + n_w \log(a_w))$$

ou

$$\frac{\partial \log(K_D)}{\partial \log(a_w)} = n_w \quad (4.6.3)$$

No contexto da ligação de um ligante a inúmeros sítios de ligação em uma proteína, n_w é interpretado como o grau de cooperatividade da reação. Estatisticamente o coeficiente de Hill representa a extensão da distribuição de estados (Gill e Wyman, 1990).

O tamanho de Δn_w com o tamanho do soluto sugere fortemente que a cooperatividade na transição $D \leftrightarrow I$ é determinada pelo tamanho do soluto. Efeitos devidos a diminuição do volume disponível à proteína na solução pela presença do soluto de tamanho V_s , favoreceria o aumento do tamanho médio das hélices que formam a unidade cooperativa da transição. Paralelamente, a diminuição da atividade de água propicia a estabilização destas estruturas mais compactas, pois favorece a estabilização das pontes de hidrogênio intramoleculares (cadeia principal) em relação à formação de pontes de hidrogênio com a água (solvente).

A interpretação acima sugerida pressupõe entretanto a saturação do efeito do soluto sobre a cooperatividade da transição, uma vez que o número de peptídeos envolvidos na formação de hélices é limitado ao número de hélices típicas da conformação I da apoMb. Como o gráfico de Δn_w versus V_s (figura 4.5.18) não mostrou sinais de saturação, a análise da existência ou não de saturação pode ser realizada considerando que o aumento de cooperatividade de ligação de um dado ligante tem como consequência a

diminuição do trabalho químico para saturar o sistema. Este trabalho é calculado levando em conta a variação de energia livre de Gibbs para transferir dn_w moléculas do ligante do sistema de referência μ_w^0 e ligá-lo à proteína no potencial químico μ , que é dado por (Gill e Wyman, 1990):

$$dG = (\mu - \mu_w^0) dn_w \quad (4.6.4)$$

O trabalho para saturar a proteína com N ligantes, $\Delta G_{\text{saturação}}$, é dado por:

$$\Delta G_{\text{saturação}} = \int_0^{N_w} (\mu - \mu_w^0) dn = RT \int_0^{N_w} \ln(a_w) dn_w \quad (4.6.5)$$

onde N_w corresponde à diferença entre o número total de moléculas de água associadas ao estado D e I_F . Este valor não deve ser com o valor de Δn_w determinado pela dependência de $\ln(K)$ versus $\ln(a_w)$. Como demonstrado por Wyman (1964) a integral acima iguala-se a

$$\Delta G_{\text{saturação}} = +N_w RT \ln \overline{a_w} \quad (4.6.6)$$

onde $\overline{a_w}$ é o valor da atividade média do ligante. Para curvas de ligação simétrica em torno do valor de 50% da saturação, $\overline{a_w} \equiv a_w^{1/2}$, o valor de a_w na metade da transição.

O valor $\Delta G = N_w RT \ln(\overline{a_w})$ corresponde à variação da energia livre padrão para converter 1 mol de moléculas da conformação I na conformação D completamente hidratada (Gill e Wyman, 1990, pag.70), isto é, $N_w RT \ln[a_w(50\%)]$. A demonstração desta afirmação é obtida escrevendo-se o potencial químico da proteína em cada estado, μ^I e μ^D , tendo-se em conta a contribuição em termos da energia livre da ligação de N_w^I e N_w^D moléculas de água aos estados I e D da proteína. Em qualquer valor de a_w , μ_D e μ_I são dados por:

$$\mu_D = \mu_D^0 + RT \ln(D) - N_w^D RT \ln(a_w)$$

$$\mu_I = \mu_I^0 + RT \ln(I) - N_w' RT \ln(a_w)$$

onde μ_D^0 e μ_I^0 são os potenciais químicos no estado padrão. No equilíbrio $\mu_D = \mu_I$ e:

$$(\mu_D^0 - \mu_I^0) = -RT \ln\left[\frac{D}{I}\right] + (N_w^D + N_w') RT \ln(a_w) \quad (4.6.7)$$

Na metade da transição $D/I = 1$ e $\ln(a_w) = \ln[a_w^{1/2}]$, portanto:

$$\ln(a_w^{1/2}) = \frac{(\mu_D^0 - \mu_I^0)}{N_w RT} \quad (4.6.8),$$

onde $N_w = N_w^D - N_w^I$. Esta expressão demonstra que $\ln(a_w^{1/2})$ é uma medida da variação da energia livre padrão por mol de água para converter 1 mol de proteína da conformação I para a conformação D.

Quando consideramos a água como o ligante na transição entre um estado enovelado e o estado desenovelado, o aumento da cooperatividade deve implicar na diminuição da distribuição média entre as espécies conformacionais envolvidas na transição. Consequentemente, a diferença de energia livre entre os estados inicial (minimamente saturado pelo ligante) e o final (saturação máxima) diminui, portanto, $\Delta G_{\text{saturação}}$ deve diminuir com o aumento da cooperatividade e com a variável termodinâmica associada a esta.

Isto pode ser observado no gráfico da figura 4.6.19 onde $\Delta G_{\text{coop}}/N_w RT = \ln(a_w^{1/2})$ em função da razão entre o volume molar do soluto e da água. Este gráfico demonstra que o aumento do tamanho do soluto promove a diminuição da diferença entre a energia livre padrão do estado desnaturado (mais hidratado) com relação ao estado intermediário (menos hidratado). Note que $\mu_D^0 - \mu_I^0$ é sempre negativo, mostrando que para qualquer valor de V_s o potencial químico padrão da espécie I é maior que o potencial da espécie D. Isto reflete que neste pH, e na ausência de outras interações estabilizantes e para $a_w = 1$, a proteína encontrar-se-á com o equilíbrio conformacional favorecido para D.

Com o aumento de V_s , entretanto, esta diferença diminui assintoticamente.

Fenomenologicamente o comportamento assintótico de $\ln(a_w^{1/2})$ com V_s/V_w (figura 4.6.19) pode ser descrito pela seguinte equação:

$$\ln(a_w^{1/2}) = \frac{(\mu_D^0 - \mu_I^0)}{N_w RT} = a + b \frac{V_w}{V_s} \ln\left(\frac{V_s}{V_w}\right) \quad (4.6.9)$$

O ajuste desta equação aos dados experimentais fornece $a = 0,0030 \pm 0,0016$ e

$b = \frac{1}{5,3}$ e está mostrado pela linha contínua no gráfico da figura 4.6.19.

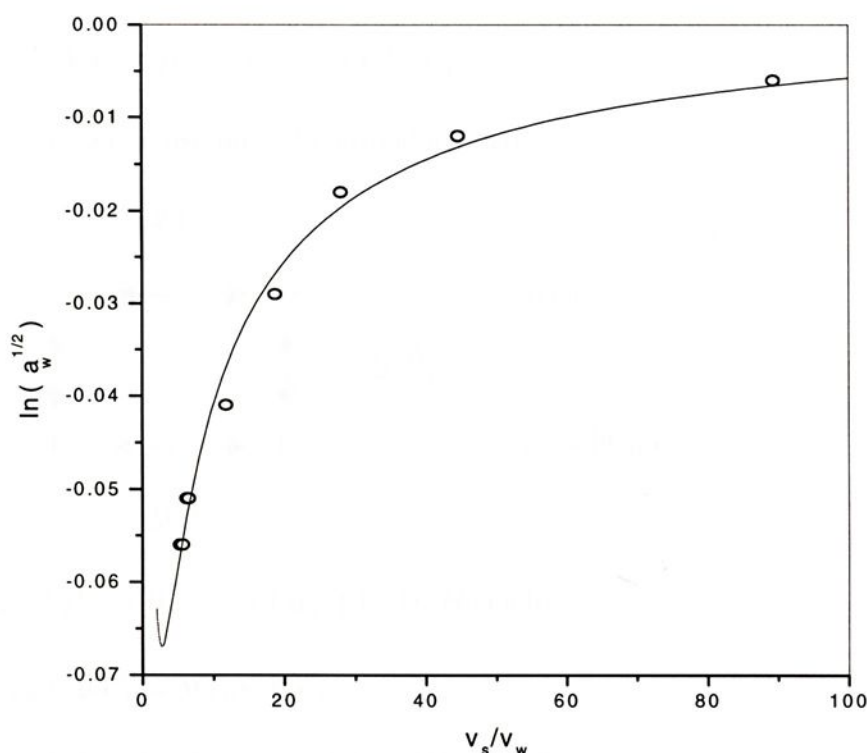


Figura 4.6.19. Gráfico da variação do logaritmo da atividade de água a 50% da transição em função da razão entre o Volume molar dos solutos usados e o Volume molar da água.

A diferença entre o potencial químico padrão dos estados D e I medida por $\ln(a_w^{1/2})$, na presença de solutos de tamanho V_s tem valor máximo para $V_s/V_w=2,72$ (mais estável) e diminui (torna a transição de $I \rightleftharpoons D$ menos favorável) a medida que V_s

aumenta. Este efeito praticamente satura para valores V_s/V_w maiores que 100. Isto demonstra a saturação do efeito do tamanho do soluto no enovelamento da apoMb que desejávamos encontrar.

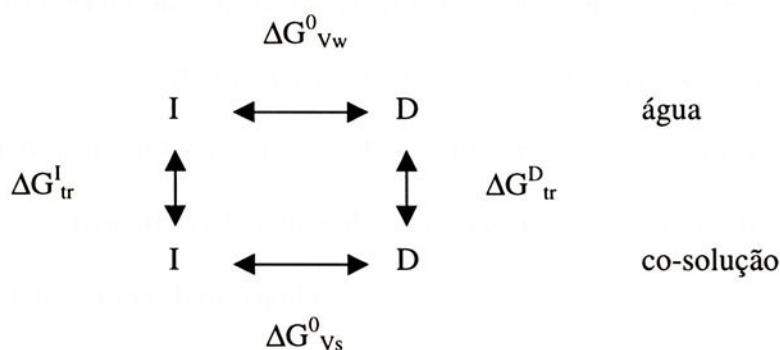
Para fins de comparação convém escrever a diferença do potencial químico padrão entre os estados D e I em termos do coeficiente de atividade de cada estado protéico. Portanto, vamos considerar que a transferência da proteína da água para a co-solução pode ser descrita em termos de um coeficiente de atividade γ , isto é:

$$\mu_{pD}^{v_w} = \mu_p^0 + RT \ln P \quad \text{água}$$

$$\mu_p^{v_s} = \mu_p^0 + RT \ln \gamma_p P \quad \text{co-solução}$$

$$\Delta G_{tr} = \mu_p^{v_s} - \mu_{pD}^{v_w} = RT \ln \gamma_p \quad (4.6.10)$$

Fazendo uso do ciclo termodinâmico:



onde $\Delta G_{vs}^0 = (\mu_D^0 - \mu_I^0) = \ln[a_w^{1/2}(V_s)]$. No ciclo:

$$\Delta G_{vw}^0 + \Delta G_{tr}^D = \Delta G_{tr}^I + \Delta G_{vs}^0$$

$$\ln[a_w^{1/2}(V_s)] + \ln(\gamma_D) = \ln[a_w(V_s)] + \ln(\gamma_I), \quad (4.6.11)$$

ou

$$\ln[a_w^{1/2}(V_s)] - \ln[a_w(V_s)] = \ln(\gamma_D / \gamma_I) \quad (4.6.12)$$

Substituindo a expressão encontrada no ajuste tem-se que:

$$\ln \frac{\gamma_D}{\gamma_I} = - \frac{1}{5,3} \frac{V_w}{V_s} \ln \frac{V_s}{V_w} \quad (4.6.13)$$

e portanto:

$$d \ln a_w^{1/2} = \ln \frac{\gamma_D}{\gamma_I} \propto \frac{V_w}{V_s} \ln \frac{V_w}{V_s} \quad (4.6.14)$$

ou seja, a dependência encontrada entre $\ln(a_w^{1/2})$ e o tamanho relativo do soluto (V_s/V_w) sugere uma expressão fenomenológica para a razão entre os coeficientes de atividade da apoMb no estado desnaturado e no estado intermediário. A forma desta função indica que γ_D/γ_I são alterados por contribuições entrópicas que surgem devido a diferença entre V_s e V_w . Uma melhor análise desta contribuição vai requerer um estudo apropriado do efeito do tamanho do soluto nos termos de atividade da macromolécula em solução. Vários estudos neste sentido têm sido publicados na literatura partindo de teorias do volume excluído. Até o momento, no entanto, não encontramos nenhuma expressão para g que se assemelhe ou possa estar relacionada à expressão fenomenológica aqui descrita.

A seguir passamos a analisar o efeito de volume excluído sobre o equilíbrio de desnaturação/renaturação da apoMb, segundo as teorias de volume excluído e da teoria que deriva os coeficientes de atividade da proteína considerando estados protéicos e o soluto como esferas rígidas.

Análise dos Dados em Termos do Volume Excluído.

Estudos recentes do efeito de solutos neutros na intercalação da actinomicina-D à molécula de DNA (Ruggiero e Colombo, 2000) e na estabilização do estado intermediário do citocromo-c em estudos de DC (Kamiyama et al, 1999) mostram, a exemplo do estudo aqui apresentado, que para determinados sistemas a perturbação do equilíbrio da reação, devido à adição de quantidades equivalentes de solutos distintos, é tanto maior quanto maior o tamanho do soluto.

Uma interpretação proposta para descrever mudanças de reatividade protéica (Minton, 1983; Wills & Winzor, 1993) sugere que na presença de osmólitos, o

potencial químico da proteína aumenta devido ao aumento do volume excluído desta macromolécula em solução ternária quando relacionada à solução da proteína em solvente puro. O aumento do potencial químico da proteína é tanto maior quanto maior é o covolume U de cada conformação protéica. Segundo o modelo de Wills e Winzor (1993) este covolume ocupado para cada estado é dado por:

$$U = \frac{4}{3} \pi N (R_e + r_o)^3 \quad (4.6.15)$$

em que N é o número de Avogadro, R_e é o raio da esfera que representa a conformação protéica e r_o é o raio do osmólito. A taxa de variação da energia livre de desnaturação (ΔG_D) com a concentração molar do soluto (C_s), é dada por:

$$\frac{\partial \Delta G_D}{\partial C_s} = \mu_I - \mu_D = -RT \frac{\partial \ln\left(\frac{K}{K_0}\right)}{\partial C_s} = RT(U_I - U_D) \quad (4.6.16)$$

onde K_0 foi calculado para a concentração zero de soluto e $(U_I - U_D) = \Delta U$ é a diferença entre os covolumes ocupados pelos estados I e D, respectivamente. Esta relação sugere a construção de gráficos de $\ln(K/K_0)$ em função da concentração molar dos solutos (C_s) em que o valor da diferença entre o covolume ocupado pela proteína no estado I e o estado D (ΔU), pode ser obtido da inclinação destes gráficos. Estes gráficos, para os diferentes solutos utilizados neste trabalho, estão mostrados nas figuras 4.6.20 a e b, e os valores de ΔU obtidos do ajuste linear de $\ln(K)$ versus C_s estão apresentados na Tabela 4.6.III para os diferentes solutos. Nota-se que ΔU é negativo e aumenta com o tamanho do soluto. Segundo esta interpretação para o volume excluído, o sinal implica em que o estado desnaturado ocupa um co-volume maior que o do estado intermediário, em acordo com as expectativas para estas estruturas protéicas.

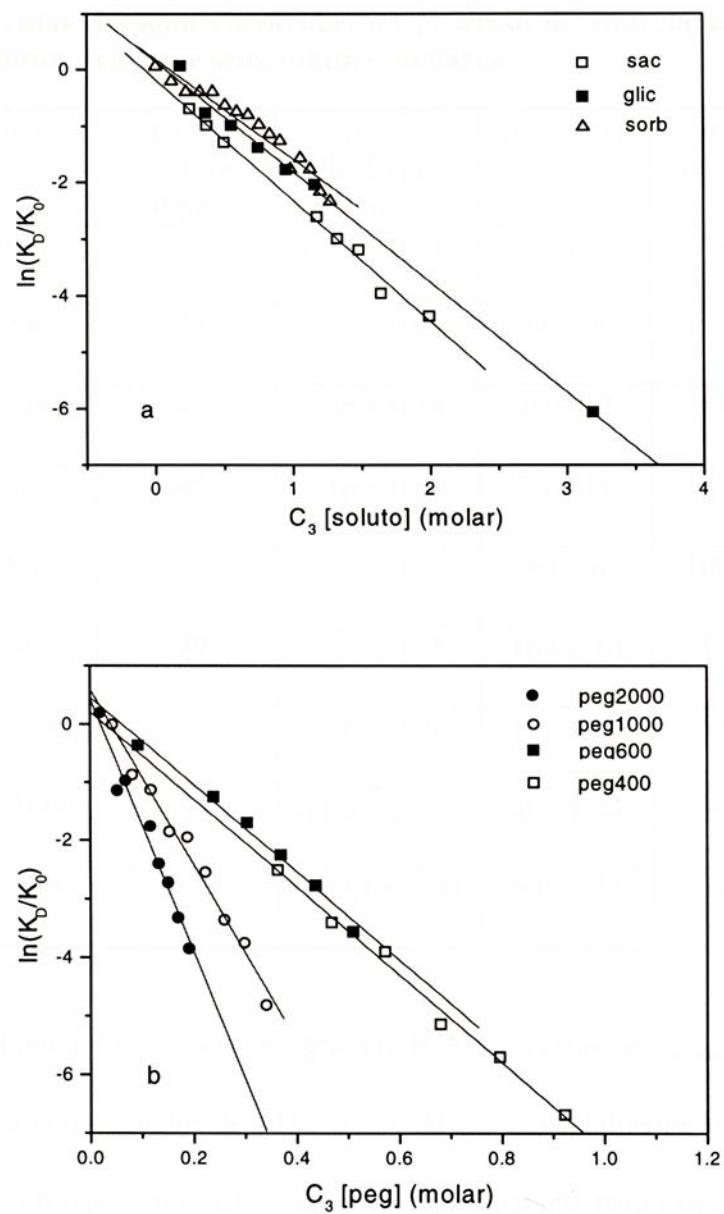


Figura 4.6.20 a e b. Gráfico da variação da energia livre (a menos de uma constante) em função das concentrações molares para os diferentes solutos usados. Em a estão representados os dados para a glicose, sacarose e sorbitol e em b para os polietileno glicóis. Destas inclinações foram calculados os valores dos volumes excluídos segundo Winzor e Wills, 1986. Estes dados estão apresentados na tabela 4.6.III.

Se tomarmos os valores dos raios de giraco, determinados por SAXS (Gast et al, 1994) para a apoMb nos estados desnaturado (R_D) e intermediário (R_I) podemos calcular os valores da diferença dos covolumes ocupados por estas conformações em diferentes solutos. Estes dados estão apresentados na Tabela 4.6.III. Nota-se que os valores de ΔU calculados são bastante menores que os valores observados.

Tabela-4.6.III Os volumes excluídos ($\Delta U^{D \leftrightarrow I}$) experimentais e teóricos (l/mol), o número de moléculas de água envolvidas no processo de enovelamento promovida pela adição de solutos neutros e seus volumes molares.

Soluto	$\Delta U^{D \leftrightarrow I}$ VE. Teór. l/mol	$\Delta U^{D \leftrightarrow I}$ VE. Exper. l/mol	$\Delta n_w \pm SD$	Vol. molar
Ribose	-43	-2.43 ± 0.21	57 ± 5	95,3
Glicose	-44	-2.42 ± 0.09	66 ± 6	111,9
Sacarose	-46	-2.56 ± 0.14	107 ± 8	211,5
Sorbitol	-45	-1.19 ± 0.06	75 ± 11	117,0
Arabitol	-47	-1.27 ± 0.07	60 ± 6	100,6
PEG400	-49	-4.52 ± 0.15	164 ± 10	336
PEG600	-52	-4.90 ± 0.26	196 ± 12	504
PEG1000	-56	-11.25 ± 0.60	405 ± 34	804
PEG2000	-62	-16.61 ± 1.31	595 ± 38	1608

A Figura 4.6.21 mostra o gráfico de ΔU_{obs} versus $\Delta U_{calculado}$, que demonstra a grande diferença entre o valor de $\Delta U_{calculado}$ e ΔU_{obs} . Especialmente para os solutos de menor tamanho a diferença entre $\Delta U_{calculado}$ e ΔU_{obs} indica que para estes solutos o raio de giração para o cálculo de U_I deveria ser bastante menor que aquele raio obtido das medidas de espalhamento de raio-X a baixos ângulos (Gast et al, 1994). Os valores experimentais de ΔU_{obs} indicam que para os solutos menores, o raio de giração da espécie enovelada é bastante próximo do raio de giração do estado desenovelado e esta diferença aumenta com o aumento do tamanho do soluto.

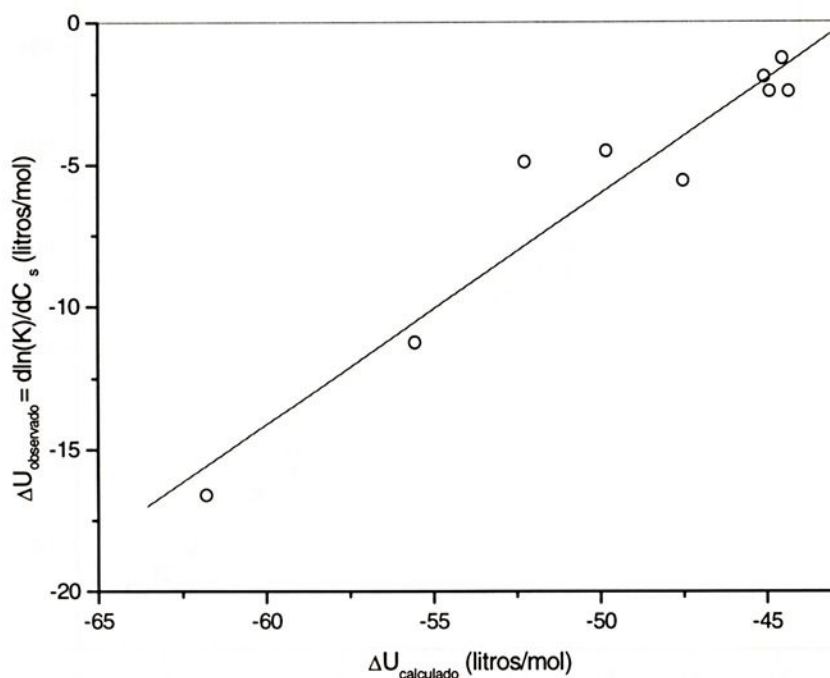


Figura 4.6.21 Gráfico da variação de volume observado, ΔU_{obs} , em função da variação do volume calculado teoricamente, $\Delta U_{\text{calculado}}$, indicando que o raio da proteína no estado I varia com o tamanho do soluto e que se aproxima do raio da macromolécula no estado D a medida que o volume molar do soluto cresce. O ajuste linear mostra os parâmetros: $r = 0,961$; $Y = (34,3 \pm 4,4) + (0,81 \pm 0,09)X$.

Isto sugere que o tamanho dos segmentos de hélices formadas na transição de D para I, deve variar com o tamanho do soluto. Esta observação é compatível com a sugestão feita aqui de que o tamanho da unidade cooperativa da transição deve aumentar com o tamanho do soluto. Esta proposição também é compatível com a observação de que Δn_w aumenta com o tamanho do soluto (figura 4.6.18). E ainda pode-se dizer que o tamanho destes solutos atinge um patamar para os solutos maiores, como se observa na figura 4.6.19.

A possível correlação entre ΔU e Δn_w , acima sugerida, foi analisada através dos gráficos de Δn_w versus ΔU mostrados na figura 4.6.22. A correlação linear pode ser observada pelos parâmetros fornecidos pelo ajuste que foram os seguintes: $Y = 2,24 \pm 9,34 + 35,88 \pm 1,31$ (moles de água/mol), com $r = 0,995$.

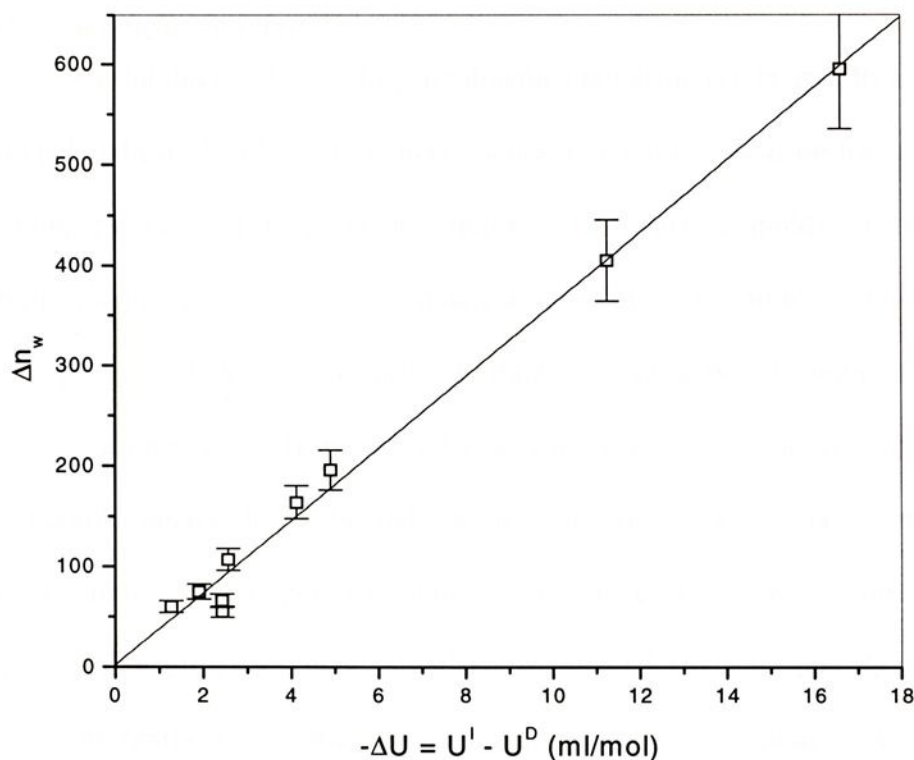


Figura 4.6.22 Correlação dos parâmetros Δn_w e ΔU_{exp} , calculados neste trabalho, utilizando o modelo da variação da atividade de água para calcular Δn_w (Colombo et al, 1992) e o modelo de volume excluído para calcular ΔU_{exp} (Winzor e Wills, 1993).

Provavelmente, os efeitos de volume excluído sejam responsáveis pelo aumento de cooperatividade. A formação de vários segmentos de hélices de tamanho compatível ao tamanho do soluto propicia um ganho entrópico no sistema em relação às estruturas muito desenoveladas.

Restou ainda verificar a influência da temperatura sobre as transições da apoMb em meio ácido ou neutro e na presença de osmólitos, experimentos estes que estão descritos a seguir.

4.7. Desnaturação térmica do estado Intermediário da apoMb a pH 2,46 e estabilizado pela adição de solutos.

A estabilidade do estado parcialmente enovelado (I) da apoMb a pH 2,46 e estabilizado pela adição de diferentes concentrações de glicose e sacarose foi estudada em diferentes temperaturas. Na ausência de solutos, e neste pH, a apoMb encontra-se no estado completamente desnaturado. Com a adição de solutos, o equilíbrio conformacional é favorecido para o estado intermediário. Portanto, as variações de temperatura estão deslocando o equilíbrio exclusivamente entre as espécies D e I, uma vez que o estado nativo está completamente desestabilizado nestas condições experimentais. Osmólitos de diferentes tamanhos, como por exemplo a glicose e sacarose, e em diferentes concentrações foram utilizados para estabilizar o estado I. As amostras de apoMb em solução com diferentes concentrações de solutos foram submetidas a variações de temperatura entre 10° e 30°C.

As figuras 4.7.23 e 4.7.24 mostram os gráficos da elipticidade relativa da apoMb a pH 2,46 em função da concentração molal de glicose e de sacarose, respectivamente, medidos para as diferentes temperaturas. A temperatura constante, o aumento da concentração do soluto aumenta o grau de elipticidade da proteína, como anteriormente observado. Estes gráficos também mostram que o aumento da elipticidade da apoMb, induzido pela presença do soluto, é tanto maior quanto menor a temperatura, indicando que esta reação de re-enovelamento é um processo exotérmico. Estes dados, analisados à temperatura constante e osmolalidade variável fornecem a variação de hidratação na reação de re-enovelamento; analisados à osmolalidade constante e temperatura variável fornecem a entalpia de van't Hoff da reação.



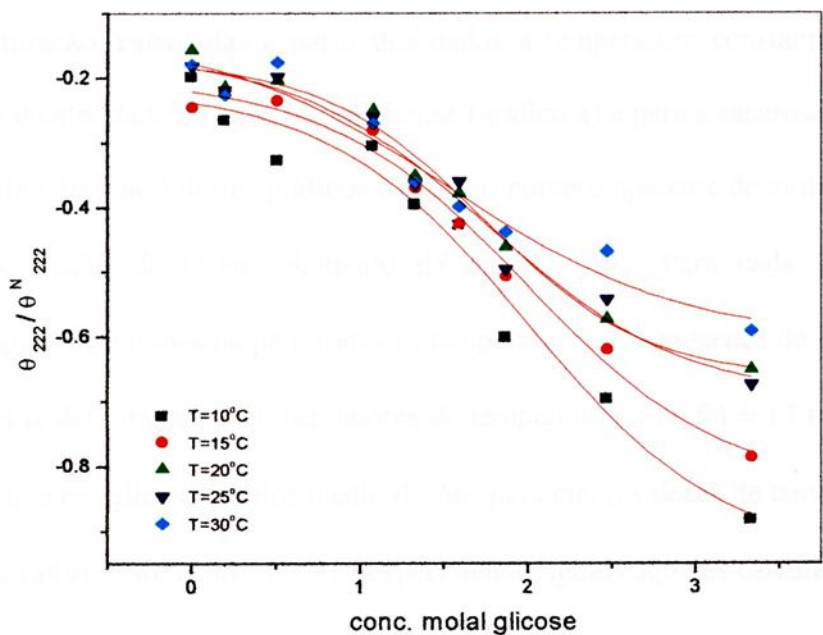


Figura 4.7.23 Razão de θ_{222} num ponto qualquer e θ_{222}^N do estado nativo, em função das diferentes concentrações de glicose para a apoMb (5 μ M) a pH 2,46 medidos para as temperaturas de 10, 15, 20, 25 e 30 °C.

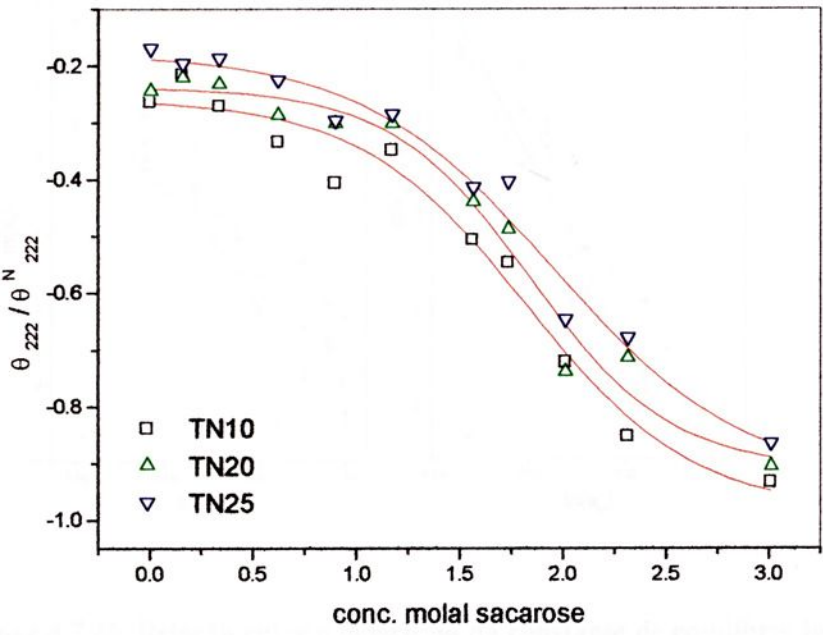


Figura 4.7.24 Gráficos de elipticidade relativa da apoMb (5 μ M) a pH 2,46 em 222 nm em função da concentração molar de sacarose, medidos para as temperaturas de 10, 20 e 25 °C.

A figura 4.7.25 mostra os gráficos de $\ln(K_t)$, o logaritmo da constante de equilíbrio de renaturação, calculadas a partir dos dados à temperatura constante, versus $\ln(a_w)$, o logaritmo da atividade de água para a glicose (gráfico a) e para a sacarose (gráfico b). A inclinação $d(\ln K_t)/d(\ln a_w)$ destes gráficos fornece o número aparente de moléculas de água liberadas na reação de re-enovelamento da apoMb, Δn_w . Para cada soluto, a inclinação destes gráficos é a mesma para todas as temperaturas. Na presença de sacarose, o valor médio de Δn_w determinado em três valores de temperatura é de 94 ± 13 moléculas de água, enquanto que em glicose o valor médio de Δn_w para cinco valores de temperaturas é de 64 ± 10 . Estes valores são, dentro do erro experimental, iguais àqueles calculados com os experimentos realizados à temperatura ambiente (20°C), descritos anteriormente. A nova informação contida nestes dados é que o número de moléculas de água liberadas na transição $D \rightleftharpoons I$, independe da temperatura de medida no intervalo utilizado.

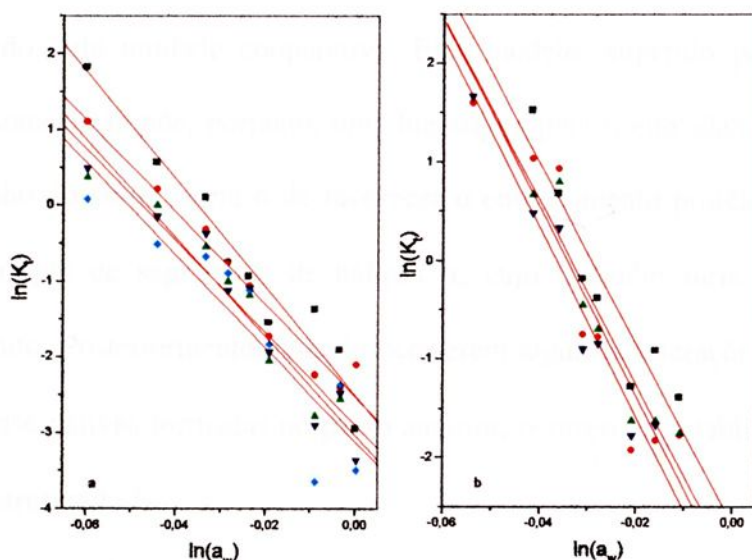


Figura 4.7.25. Relação entre o logaritmo da constante de equilíbrio $\ln(K_t)$ e o logaritmo da atividade de água $\ln(a_w)$ medidos para a apoMb ($5\ \mu\text{M}$) a pH 2,46 em diversas concentrações de glicose (a) e de sacarose (b), e com variação de temperatura entre 10 e 30°C . Os ajustes lineares para as diversas curvas forneceu os seguintes valores de Δn_w : para a glicose 71 ± 12 a 10°C ; 60 ± 8 a 15°C ; 61 ± 7 a 20°C ; 65 ± 11 a 25°C ; 61 ± 10 a 30°C ; e para a sacarose 91 ± 15 a 10°C ; 96 ± 14 a 15°C ; 93 ± 14 a 20°C e 96 ± 10 a 25°C .

A constância dos valores de $\Delta n_w \sim 64$, obtidos na presença de glicose e de $\Delta n_w \sim 94$ na presença de sacarose, representa a variação de hidratação entre os estados I e D.

Os cálculos de Δn_w a pH ácido constante a diversas temperaturas, mostrados na figura 4.7.25, demonstram que o valor de variação de hidratação, medido pela adição de solutos, independe da fração inicial relativa de proteína no estado desnaturado em relação ao estado enovelado. Equivalentemente, não importa em que ponto da curva de desnaturação a proteína se encontre, a variação de hidratação relativa entre os estados reenovelado e desenovelado, medida por uma variação diferencial do potencial químico da água (ou da concentração do soluto), é a mesma em qualquer ponto da curva. Isto sugere que: 1) a transição entre a estrutura desenovelada e a enovelada é, em qualquer ponto da curva de desnaturação-renaturação, um processo de dois estados, isto é, entre duas estruturas que diferem pela mesma variação de hidratação; 2) como esta diferença de hidratação é muito menor que aquela esperada entre os estados I estruturado e N nativo, o enovelamento protéico deve ocorrer pela formação de segmentos de hélices α , com tamanho definido pela unidade cooperativa. Este modelo, sugerido pelas medidas de variação de hidratação impõe, portanto, uma hierarquia para o enovelamento protéico. O papel do tamanho do soluto seria o de favorecer o enovelamento protéico num primeiro estágio da formação de segmentos de hélices α , cujo tamanho seria proporcional ao tamanho do soluto. Posteriormente, quando ocorrerem algumas interações terciárias entre as hélices α quase nativas formadas no passo anterior, ocorreria a estabilização do estado intermediário estruturado I_F .

O tamanho dos segmentos de hélice α , isto é, o tamanho da unidade cooperativa na transição do estado D para o estado I da apoMb induzida pela adição de solutos neutros é linearmente dependente do tamanho do soluto utilizado para mudar a_w . Este resultado foi demonstrado anteriormente para os estudos à temperatura constante



(vide Figura 4.6.18). Com o intuito de obter uma estimativa da variação de entalpia de enovelamento em sacarose e glicose e comparar estes valores quanto ao tamanho do soluto, os dados apresentados nas figuras 4.7.23 e 4.7.24 foram também analisados em função da temperatura, mantida a concentração fixa de soluto. Os valores do logaritmo da constante de equilíbrio, $\ln(K_c)$, calculados com os dados destas figuras estão apresentados em função do inverso da temperatura absoluta ($1/T$) nos gráficos de van't Hoff mostrados para diferentes concentrações de glicose na figura 4.7.26, e de sacarose na figura 4.7.27. Observa-se das inclinações destes gráficos que a variação da entalpia de re-enovelamento (ΔH) aumenta com o aumento da concentração do soluto, para cada soluto. Observa-se também que a taxa de variação de ΔH com a concentração do soluto é maior para sacarose que para glicose. Isto indica que o valor aparente de ΔH de renaturação, medido na presença de solutos, também aumenta com o aumento do soluto.

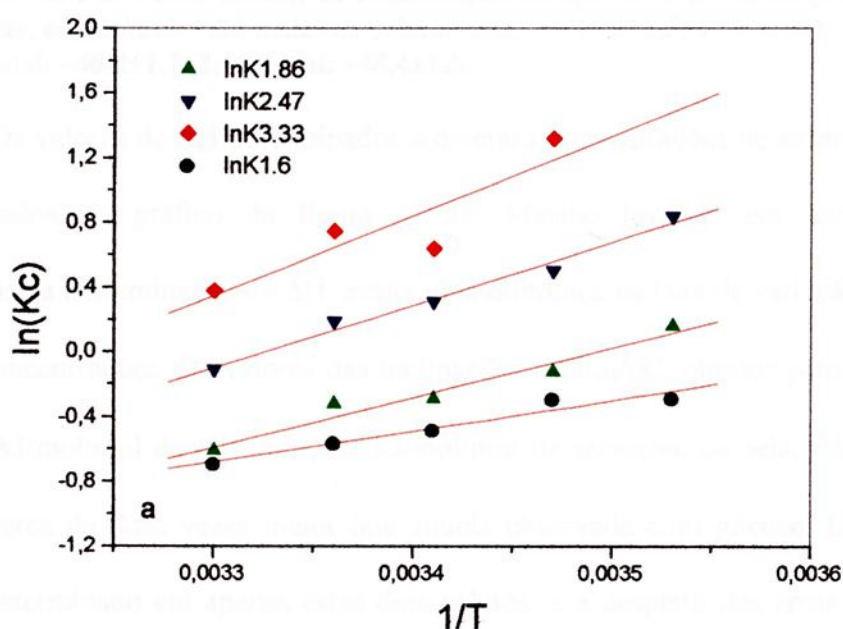


Figura 4.7.26 Gráfico do logaritmo da constante de equilíbrio $\ln(K_c)$ em função do inverso da temperatura absoluta ($1/T$) para diversas concentrações de glicose. Os ajustes lineares destas curvas fornecem valores da variação da entalpia de van't Hoff (ΔH_{vH}) de renaturação da apoMb a pH 2,46, que são os seguintes, em kJ/mol: 1,6 molal do soluto: $\Delta H_{vH} = -15,2 \pm 2,1$; 1,86 molal: $-25,5 \pm 3,1$; 2,47 molal: $-32,5 \pm 2,4$; 3,33 molal: $-40,1 \pm 1,4$.

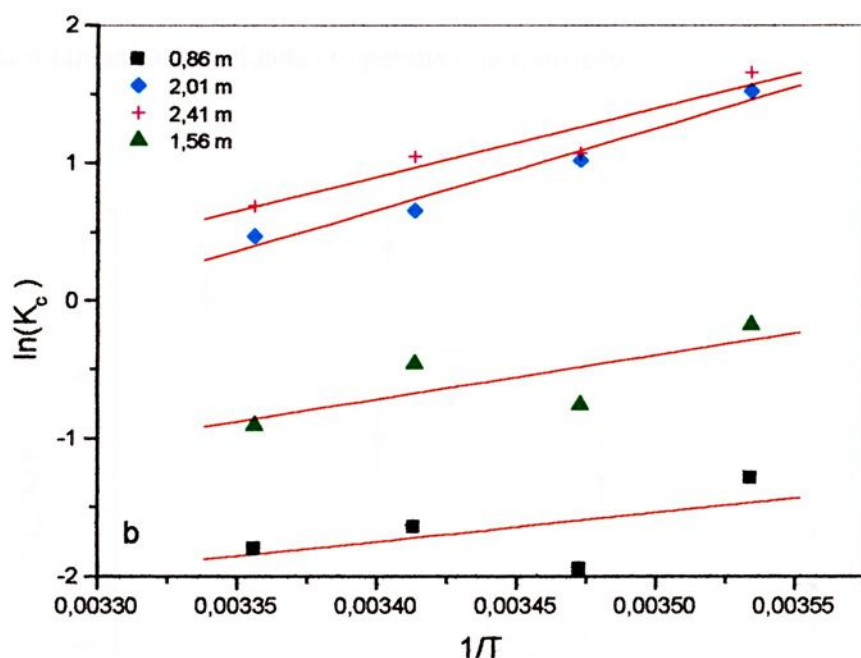


Figura 4.7.27 Gráfico do logaritmo da constante de equilíbrio, $\ln(K_c)$ em função do inverso da temperatura absoluta ($1/T$) para diversas concentrações de sacarose. Os ajustes lineares destas curvas fornecem os valores da variação da entalpia de van't Hoff (ΔH_{vH}) de renaturação da apoMb a pH 2,46, que foram os seguintes, em kJ/mol: 0,86 molal do soluto: $\Delta H_{vH} = -19,2 \pm 2,5$; 1,56 molal: $-26,6 \pm 3,1$; 2,01 molal: $-46,2 \pm 1,7$; 2,41 molal: $-48,4 \pm 1,5$.

Os valores de ΔH determinados a diversas concentrações de sacarose e glicose estão mostrados no gráfico da figura 4.7.28. Mesmo levando em conta os erros experimentais na determinação de ΔH , existe uma diferença na taxa de variação da entalpia com estas concentrações. Os valores das inclinações $\partial \Delta H_{vH} / \partial C$, obtidos pelo ajuste linear foram : -12 kJ/mol/mol de glicose e -21 kJ/mol/mol de sacarose, ou seja, $\partial \Delta H_{vH} / \partial C$ para sacarose é cerca de duas vezes maior que aquela observada com glicose. Embora ΔH_{vH} tenha sido determinado em apenas estes dois solutos, e a despeito dos erros intrínsecos a estas medidas, pode-se concluir que o calor liberado no enovelamento induzido por solutos é proporcional ao tamanho do soluto.

A proporcionalidade de ΔH e Δn_w com o tamanho do soluto implica que ΔH seja proporcional a Δn_w . Isto indica que a quantidade de calor liberado na transição estado

aleatório-segmentos de hélice α é proporcional ao número de moléculas de água liberadas nesta transição. Este resultado é compatível com a proposição de que o tamanho do soluto irá determinar o tamanho da unidade cooperativa na transição.

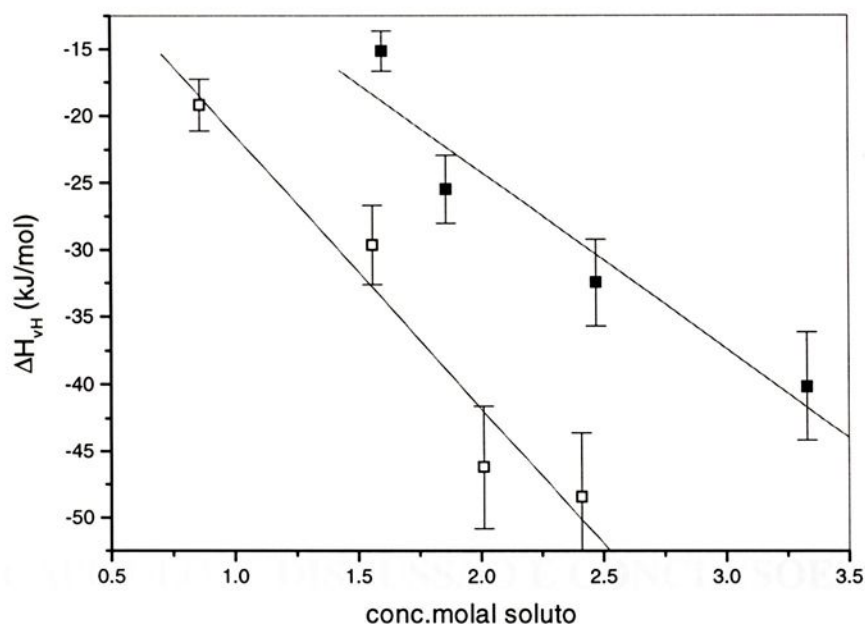


Figura 4.7.28 Variação da entalpia da van't Hoff (ΔH_{vH}) em função da concentração molal de glicose e sacarose. Os ajustes tirados da figura são: glicose $Y = 2,1 - 12X$, e sacarose: $Y = 0,350 - 21X$, sugerindo novamente um efeito do tamanho do soluto sobre a unidade cooperativa proposta antes.

5.1 Introdução

Como este estudo se insere no contexto da investigação de correlações de proteínas globulares, passa-se para a revisão de alguns conceitos fundamentais. Em geral, a história de "modelos físicos" data de 1931 a 1955. A interpretação dos dados obtidos, sobretudo nos anos 40, levou a uma série de conclusões importantes para a estrutura de proteínas de pequena dimensão. Contudo, a interpretação dos dados obtidos nos anos 50 levou a uma série de conclusões importantes para a estrutura de proteínas de grande dimensão.

Durante a década de 40, a investigação sobre a origem da estabilidade de proteínas globulares levou a uma série de conclusões importantes. A primeira conclusão foi a de que a estabilidade de proteínas globulares é determinada pela interação de várias forças, incluindo a interação eletrostática, a interação hidrofóbica, a interação de van der Waals e a interação de pontes de hidrogénio. A segunda conclusão foi a de que a estabilidade de proteínas globulares é determinada pela interação de várias forças, incluindo a interação eletrostática, a interação hidrofóbica, a interação de van der Waals e a interação de pontes de hidrogénio.

CAPÍTULO V DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A análise dos dados obtidos no capítulo IV levou a uma série de conclusões importantes. A primeira conclusão foi a de que a estabilidade de proteínas globulares é determinada pela interação de várias forças, incluindo a interação eletrostática, a interação hidrofóbica, a interação de van der Waals e a interação de pontes de hidrogénio. A segunda conclusão foi a de que a estabilidade de proteínas globulares é determinada pela interação de várias forças, incluindo a interação eletrostática, a interação hidrofóbica, a interação de van der Waals e a interação de pontes de hidrogénio.

Durante a década de 40, a investigação sobre a origem da estabilidade de proteínas globulares levou a uma série de conclusões importantes. A primeira conclusão foi a de que a estabilidade de proteínas globulares é determinada pela interação de várias forças, incluindo a interação eletrostática, a interação hidrofóbica, a interação de van der Waals e a interação de pontes de hidrogénio. A segunda conclusão foi a de que a estabilidade de proteínas globulares é determinada pela interação de várias forças, incluindo a interação eletrostática, a interação hidrofóbica, a interação de van der Waals e a interação de pontes de hidrogénio.

5.1 Introdução

Como vem sendo destacado na literatura recente, os mecanismos de enovelamento de proteínas globulares passam pela formação de estados intermediários estáveis, em geral chamados de “molten globule” (MG) (Ptitsyn, 1993 e 1995). A determinação das características estruturais e energéticas destes estados tem sido objeto de intensas investigações, com o objetivo de evidenciar as principais contribuições energéticas ao processo de enovelamento-desenovelamento destas macromoléculas.

Durante as décadas de 70 e 80 as investigações sobre a origem da estabilização de proteínas no estado nativo pela adição de solutos neutros, como açúcares, polióis e polietileno glicóis, e diversos sais como cloreto de sódio e de potássio, tricloroacetato de sódio entre outros foram, exaustivamente, conduzidas por Timasheff e colaboradores. A estratégia utilizada nestes estudos foi baseada principalmente em medidas de densidade molar parcial, para estudar a estabilização de proteínas em solução de água, soluto e proteína. Estes estudos revelaram que vários solutos neutros, conhecidos como osmólitos, são preferencialmente excluídos da superfície protéica, indicando que as proteínas na presença de solutos estão preferencialmente hidratadas (Timasheff, 1993; 1995). Embora estes estudos tenham estabelecido cabalmente o fenômeno da exclusão preferencial de osmólitos na superfície protéica, o uso desta estratégia experimental não se desenvolveu ao ponto de fornecer termodinâmicas específicas sobre a estratégia de interação das moléculas de água com a superfície exposta ao solvente.

Outras propostas foram descritas para explicar o efeito da adição de solutos sobre o equilíbrio de oligomerização de proteínas, sobre a cinética enzimática e sobre a estabilização do estado protéico nativo. Entre elas Minton (1983, 2000), e Wills e Winzor (1993) sugeriram que reações que envolvem o aumento de volume da macromolécula, são desfavorecidas na presença de solutos devido ao efeito do volume excluído, e que este efeito pode estar relacionado com o tamanho do soluto usado como substância



preenchedora de espaços na solução. A análise considerando efeitos de volume excluído, da dependência do equilíbrio químico entre os estados D e I da apoMb, em pH ácido, com a concentração e tamanho do soluto, foi realizada neste trabalho. Demonstramos que a variação do logaritmo da constante de equilíbrio é linear com a concentração molar dos solutos utilizados, em acordo com o que é previsto na literatura. Foi mostrado também que a taxa de variação de $\log(K)$ com a concentração do soluto (C_s) que formam a diferença entre os covolumes (ΔU) dos estados D e I são: a) muito menores que aquela prevista pela teoria, se consideramos os raios de giração experimental destas conformações; c) que ΔU cresce linearmente com o tamanho do soluto, e c) que ΔU está linearmente correlacionado com a variação de hidratação medida na presença de cada soluto. Isto nos levou a propor que o re-novelamento da apoMb na transição $D \rightleftharpoons I$ ocorre com a formação de segmentos de hélices α de tamanho proporcional ao soluto utilizado, como está rediscutido a frente.

Mais recentemente, o interesse em estudar o efeito de solutos preferencialmente excluídos da superfície protéica em reações biológicas ressurgiu, motivado pela proposição de que é possível determinar a variação de hidratação associada às reações envolvendo macromoléculas, verificando a dependência do equilíbrio de reação com a atividade de água em co-solução. A análise quantitativa proposta para o efeito do soluto é que a constante de equilíbrio como uma função da atividade de água fornece, a partir das equações de "linkage" de Wyman, a variação de hidratação da macromolécula na reação (Colombo et al, 1992). Esta análise rapidamente ganhou popularidade e o equilíbrio de diversas reações em função da atividade de água passaram a ser estes dados.

Em nosso laboratório, Neves (1996) obteve um estado intermediário distinguível do citocromo-c, durante desnaturação ácida na presença de sorbitol usado para modificar a atividade da água, medidos por absorção óptica. Esta estabilização foi explicada sugerindo que a diminuição da atividade de água desloca o equilíbrio para



estados mais compactos da proteína e foi determinada a medida da variação de hidratação que acompanha este processo. Em 1998, Davis-Searles e colaboradores, estudaram alterações do estado MG do citocromo-c a valores baixos de pH induzidos pela presença de açúcares, através de medidas de DC. Estes autores propuseram que o favorecimento do estado intermediário se deve à repulsão estérica entre os componentes da solução. Kamiyama e colaboradores (1999) induziram a formação do estado MG do citocromo-c estabilizado por sorbitol e discutiram o mecanismo e a estrutura do estado MG em termos da interação preferencial do soluto com a proteína, mas aventam a possibilidade que este efeito apareça do aumento da pressão osmótica do meio. Esta última possibilidade não foi quantificada pelos autores.

5.2 Caracterização dos Estados D, I, e N para a apoMb no Processo de Desnaturação Ácida na Presença Diversos Osmólitos.

O efeito de diversos solutos inertes sobre a reação de reenovelamento da apoMb em diferentes pH, foi mostrado através de medidas de DC, na região do UV distante. Nesta região, os espectros de DC permitem seguir as variações da estrutura secundária de proteínas. A apoMb em seu estado nativo ou parcialmente enovelado é essencialmente constituída por hélices α e algumas alças.

Os experimentos de titulação ácida demonstraram que a sacarose estabiliza os estados mais compactos da apoMb, isto é, estabiliza o estado nativo em relação ao estado intermediário e o estado intermediário em relação ao estado desnaturado (figura 4.2.4). Foi observado também que este efeito é proporcional à concentração do soluto. Para valores de pH < 3,0 o máximo enovelamento da apoMb pela adição de sacarose, corresponde a um valor de elipticidade equivalente a ~ 70% da elipticidade da proteína nativa. A indução da formação de um estado intermediário (I) foi observada a pH 2,46 em concentrações saturantes de sacarose (figura 4.2.4, 4.4.6, e 4.6.11) e de diversos outros solutos (figuras



4.6.10, 4.6.11, 4.6.12, 4.6.13). Demonstramos que, a pH baixo, independente do soluto utilizado (sacarose, glicose, ribose, arabitol, sorbitol, e polietileno glicol de massas moleculares 400, 600, 1000 e 2000) concentrações variáveis destes solutos estabilizam um estado conformacional parcialmente enovelado da apoMb. A característica comum nestes experimentos é que o estado I_F da apoMb apresenta o mesmo conteúdo de hélices α em todos os solutos utilizados. Portanto, a estrutura secundária do estado I_F estabilizado nestes solutos é equivalente e apresenta o mesmo valor para a elipticidade molar residual de $\sim 13.200 \text{ mgrads.cm}^2/\text{dmolar}$.

Anteriormente, Fink e colaboradores (1994) demonstraram que em pH ácido a apoMb estabiliza um estado intermediário (I) na presença de ânions. O conteúdo de hélices α deste estado é equivalente ao medido neste trabalho na presença de diferentes solutos. Com o objetivo de comparar o efeito de osmólitos com o efeito de ânions na estabilização do estado I, foram realizados experimentos de desnaturação ácida da apoMb na presença de 0,5 M de KCl (figura 4.2.2) e experimentos de renaturação da apoMb a pH fixo em 2,46 e na presença de variadas concentrações do sal (figuras 4.4.6 e 4.4.7).

Para o ânion, no caso o cloreto (Cl^-), encontrou-se que ele desestabiliza o estado nativo (N) estabilizando o estado intermediário (I) (figura 4.2.2) confirmando os resultados de Fink e colaboradores (1994). Este efeito desestabilizante do Cl^- sobre o estado N contrasta com o efeito estabilizante da sacarose sobre este estado mais enovelado N da apoMb, aqui observado. Isto indica que o mecanismo de indução do enovelamento da proteína por Cl^- é distinto daquele observado por sacarose e outros solutos neutros. Apesar disso, tanto o Cl^- quanto os outros solutos investigados estabilizam o estado I da apoMb em valores de pH ácido, ou melhor, para $\text{pH} < 5,0$ para o Cl^- e $\text{pH} < 3,0$ para a sacarose. A comparação, entre o estado I estabilizado por Cl^- e aquele estabilizado por solutos, foi feita em primeira instância através dos espectros de DC (conteúdo de hélices α)



de suas estruturas. Como mostrado nas figuras 4.4.6 e 4.4.7 o conteúdo de hélices α é o mesmo para os estados (I) finais alcançados e independem do agente estabilizador. Isto indica que independentemente do mecanismo de estabilização do estado I da apoMb, a estrutura final deste estado é a mesma.

Outros estudos demonstraram que para variações na temperatura e na presença de diferentes solutos o estado intermediário desta mesma proteína é estabilizado em um valor de elipticidade característica de $([\theta]_{222} \sim 13 \times 10^{-3} \text{ grau.cm}^2/\text{dmol})$ (Griko e Privalov, 1988; Barrick e Baldwin, 1993; Fink et al, 1994; Nishii et al, 1994 e 1995; Gast et al, 1994) que é igual ao valor obtido na presença dos solutos inertes aqui utilizados. Estes resultados sugerem que, independente do caminho termodinâmico traçado para alcançar o estado I, este estado mantém sempre as mesmas características estruturais (pelo menos no que se refere a sua estrutura secundária). Portanto, I deve ser considerado um estado termodinamicamente estável com características estruturais bem definidas. Em estudos similares de indução do estado “molten globule” do citocromo-c pela adição de soluto em pH baixo, Davis-Searles e colaboradores (1998) observaram que as taxas de troca H-D são as mesmas para o estado I estabilizado por Cl^- e por sacarose. Esta observação reforça nossa proposição de que o estado I_F estabilizado na presença de osmólitos representa um estado termodinamicamente estável da apoMb.

A medida do parâmetro de ligação dos prótons, $\Delta n_{H^+} = \partial(\log K)/\partial(\text{pH})$, calculado para a transição de desnaturação-renaturação na presença de sacarose 3 molal e mostrado na figura 4.3.5, foi de aproximadamente 1,1 mol de prótons ligados por mol de proteína. Este número de prótons liberados na transição $N \rightleftharpoons I$ estão compatíveis com aqueles determinados por Barrick e Baldwin (1993) em estudo da indução de intermediários da apoMb por uréia em meio ácido a temperatura de 0°C (na transição $N \rightleftharpoons I$). Esta é, portanto, mais uma evidência de que o estado I é um estado com

características conformacionais bem definidas do ponto de vista das interações que o estabilizam.

5.3. Sobre o mecanismo de estabilização do estado parcialmente enovelado da apoMb a pH ácido e alta concentração de solutos neutros.

Tendo concluído que a estrutura do estado I maximamente estabilizada pela presença de solutos, deve ser a mesma que aquela estabilizada em outras condições experimentais, deve-se perguntar qual o mecanismo pelo qual os diferentes osmólitos aqui investigados estabilizam este estado.

A primeira possibilidade analisada para explicar o re-enovelamento da apoMb envolvendo o deslocamento do equilíbrio do estado D ao estado I na presença de solutos, foi a de que o soluto liga-se preferencialmente ao estado I, isto é, com maior afinidade e em maior número do que ao estado desnaturado D. Esta possibilidade parece, entretanto, pouco provável. Primeiro, porque os resultados de medidas de densidade de proteínas em soluções água-proteína-soluto demonstraram que os mesmos solutos utilizados neste trabalho são preferencialmente excluídos do entorno protéico (Timasheff, 1993 e 1995). Segundo, porque se estes osmólitos se ligassem à proteína, a ligação seria muito fraca, em vista de que o efeito destes solutos é freqüentemente observado à alta concentração. Esta observação sugere que a ligação, se existisse, seria inespecífica o que, portanto, deveria favorecer a ligação em maior número ao estado desnaturado, que é o estado com maior superfície exposta ao solvente.

Alternativamente, o deslocamento do equilíbrio do estado D para o estado I induzido pela adição de osmólitos foi analisado em termos da hidratação diferencial entre estes dois estados: o D mais hidratado e o I menos hidratado. Com a adição de osmólitos, a atividade da água diminui e desloca o equilíbrio de reação para o estado menos hidratado. A análise deste efeito foi analisada conforme proposto por Colombo e colaboradores



(1992) utilizando-se as equações de “linkage” químico propostas originalmente por Wyman (1964). Esta descrição pressupõe que a variação da energia livre da reação $[-RT \ln(D/N)]$ varia proporcionalmente com a variação do potencial químico de água $[RT \ln(a_w)]$, onde a constante de proporcionalidade é igual à diferença de hidratação entre o estado final e inicial da reação. Esta linearidade foi observada com todos os solutos neutros utilizados neste trabalho, (figuras 4.5.9 c e d, 4.6.15, 4.6.16, 4.6.17). A inclinação dos gráficos do logaritmo da constante de desnaturação versus logaritmo da atividade de água mede a quantidade de moléculas de água de hidratação liberadas na reação do enovelamento protéico (Colombo e colaboradores, 1992-2000). O deslocamento do equilíbrio para o estado I está, portanto, coerente com a mudança do valor da atividade de água. A linearidade destas curvas reflete o fato que em solução aquosa, todo o sítio de hidratação exposto ao solvente deve estar saturado, independente do valor específico da atividade de água (Colombo e Bonilla, 1996). Portanto, os dados ora apresentados permitem descrever a contribuição de água ao potencial químico de cada estado da proteína como:

$$\mu_p = \mu_p^0 + RT \ln[P] - n_w \ln(a_w)$$

Esta expressão foi derivada por Colombo (1996a) considerando a contribuição do potencial químico do ligante ao potencial químico da macromolécula, a partir da teoria de ligação de ligantes, originalmente, desenvolvida por Schlemann (1975). Esta expressão prevê que com a diminuição de a_w , o potencial químico da proteína deve aumentar em proporção ao número de hidratação. Este aumento do potencial químico tem, portanto, um caráter desestabilizador da proteína em solução, com maior desestabilização para o estado mais hidratado. Medidas de densidade específica de proteínas em co-solução com osmólitos demonstram o aumento do potencial químico da proteína com o aumento da concentração de solutos neutros. Estes dados levaram Timasheff (1998) a concluir que o aumento da estabilidade de estados mais enovelados de proteína na presença de solutos neutros se deve

à maior desestabilização dos estados com maior área de superfície protéica exposta à solução. Segundo Timasheff, a origem deste efeito está no fato que os solutos, tipicamente excluídos da superfície protéica, aumentam a tensão superficial da água no entorno da proteína, desfavorecendo portanto as reações que levam à expansão destas estruturas. Mesmo que a compactação protéica tenha origem física primária no aumento da tensão superficial, ou em qualquer outra causa como por exemplo efeitos de volume excluído a serem discutidos a seguir, esta estruturação será acompanhada por mudanças de hidratação. Consequentemente, como a liberação de água ligada à proteína para o volume da solução ocorre sempre acompanhado da reestruturação da camada de hidratação protéica, a variação da energia livre de enovelamento deve aumentar com o aumento da atividade de água e diminuir com sua diminuição. Em vista desta argumentação, conclui-se que a inclinação medida nos gráficos de $\ln(K)$ versus $\ln(a_w)$ reflete a variação da energia livre de transferência de um número de moléculas de água da proteína para a solução.

Por que, então, Δn_w é tanto maior quanto maior o tamanho do soluto? No gráfico da figura 4.6.18, mostramos que Δn_w varia linearmente com o tamanho do soluto utilizado para modificar a atividade de água, para um intervalo de variação de volume molar do soluto bastante significativo (100 ml/mol até 1600 ml/mol). Este efeito pode ser explicado considerando-se inicialmente os fatores, relacionados ao tamanho do soluto, que podem desestabilizar o estado desnaturado e, em seguida, os fatores relacionados à presença de solutos (isto é, das propriedades da solução) que podem estabilizar estados mais enovelados. Em seu estado desnaturado em solução, a proteína pode assumir uma infinidade de possíveis conformações aleatórias, que não diferem energeticamente entre si. Em água, na ausência de solutos, este número está possivelmente limitado por efeitos de volume excluído entre grupos endógenos, que limitariam o mapa configuracional como descrito por Ramachandran (Cantor e Scchimmel, parte I cap. 5, 1980). A adição de solutos neutros com tamanho maior que o tamanho do solvente, mesmo estando ausentes



interações proteína- soluto de caracter atrativo e/ou repulsivo que não de corpo rígido, deve diminuir o número de estados conformacionais disponíveis ao polímero desnaturado por efeitos de volume excluído proteína-soluto. Uma análise quantitativa que leva em conta este efeito foi realizada e mostrada nos gráficos de $\ln(K/K_0)$ versus a concentração molar do soluto (C_3), $\ln([molar])$ (figura 4.6.20 a e b). Segundo os modelos propostos por Minton (1983 e 2000) a inclinação destes gráficos deveria fornecer uma medida da diferença de volume ocupado pela proteína no estado D em relação ao volume ocupado pela proteína no estado I, $\Delta U = U^I - U^D$. Entretanto, observamos que os valores de $\Delta U_{\text{observados}}$ são menores que aqueles inferidos por cálculos ($\Delta U_{\text{calculado}}$) a partir dos valores do raio de giração da apoMb no estado I e no estado D, determinados por SAXS por Gast e colaboradores (1994). Observou-se também, que os valores desta inclinação, obtidos dos gráficos de $\ln(K/K_0)$ versus $\ln([molar])$, são proporcionais ao volume molar do soluto. Além disto, demonstramos que a taxa de variação de ΔU medida com o volume molar do soluto é idêntica a taxa de variação de hidratação Δn_w , medida dos gráficos de $\ln(K)$ versus $\ln(a_w)$ (figuras 4.6.15, 4.6.16, 4.6.17). Estes resultados indicam que, diferente do proposto pelas teorias de volume excluído aplicadas ao enovelamento protéico, o estado final, a ser considerado na reação $D \rightleftharpoons I$ (MG), induzido pela adição do soluto neutro, não corresponde ao estado I final, estabilizado em concentrações saturantes do soluto. Ao contrário, os dados sugerem que o processo de formação de hélices α , medidos por DC, com o aumento do soluto, ocorre com a formação de motivos estruturais (segmentos de hélice α) menores que aqueles encontrados no estado I final estruturado (I_F). Os resultados indicam que o tamanho destes segmentos helicoidais nos estados intermediários entre D e I_F são formados em unidades de tamanho proporcional ao tamanho do soluto utilizado para induzir o re-enovelamento. Esta hipótese explica o aumento de Δn_w e de ΔU com o tamanho do soluto, e sugere que a transição entre o estado D e I final ocorra com a

formação de segmentos de hélice α de tamanho proporcional ao tamanho do soluto.

Esquematicamente:



O colapso do estado desnaturado com a adição de solutos e sua dependência com o tamanho do soluto, como este sugerido pelo esquema acima, foi observado ocorrer em experimentos atérmicos com cadeias poliméricas, por simulação de Monte Carlo da rede (Luna-Barcenas *et al*, 1996). Esta colapso é responsável portanto pelo aumento da cooperatividade da transição $D \rightleftharpoons I$. Evidentemente, o aumento de cooperatividade da transição com o aumento do volume do soluto deve atingir assintoticamente um valor máximo de cooperatividade. Esse máximo de cooperatividade é alcançado quando a transição $D \rightleftharpoons I$ ocorre num processo verdadeiro entre dois estados. Ao analisarmos o efeito do volume do soluto sobre o valor de a_w no qual ocorre metade da transição entre D e I para cada soluto $[\ln(a_w^{1/2})]$ podemos demonstrar que este efeito de tamanho atinge assintoticamente um valor máximo. Tão importante quanto, foi definir, quantitativamente, o efeito do soluto sobre o valor da diferença entre os potenciais químicos no estado padrão da proteína desnaturada e na conformação intermediária. A inspeção do gráfico de $\ln(a_w^{1/2})$ versus V_s/V_w demonstra que a pH = 2,46 a diferença $(\mu_0^D - \mu_0^I)$ é sempre negativa e diminui com o aumento de V_s/V_w . Na ausência de outras interações, moduladas pela adição de solutos que possam dar estabilidade extra ao estado I, o estado desnaturado é o mais favorável em qualquer soluto. Entretanto, esta diferença $(\mu_0^D - \mu_0^I)$ diminui com V_s e facilita a transição de $D \rightleftharpoons I$ induzida por outros fatores, como o abaixamento da atividade de água.

Enquanto o conceito de volume excluído pode explicar a formação de hélices de tamanho (entropicamente) compatível com o tamanho do soluto, este conceito por si só não explica a razão pela qual as hélices formadas são estabilizadas. O efeito de volume excluído atua no sentido de diminuir o espaço configuracional disponível para a proteína desnaturada, aumentando consequentemente o número de contatos de curto alcance possíveis entre grupos da cadeia polipeptídica desnaturada. Entretanto, este efeito de

volume excluído por si só (sem considerar mudanças em outros parâmetros termodinâmicos do sistema causados pela adição do soluto) não permite explicar a estabilização dos contatos nativos que ocorrem em maior frequência na proteína desnaturada na presença do soluto do que para a proteína desnaturada na ausência dele. Esta estabilização vai ocorrer porque o aumento da concentração do soluto está associado à diminuição da atividade de água. Esta diminuição de a_w , segundo a interpretação aqui apresentada, diminui a energia livre de transferência das moléculas de água que hidratam o esqueleto protéico para o volume da solução favorecendo, conseqüentemente, a formação de hélices α .

Recentemente, Bolen e colaboradores (1997) determinaram a energia livre de transferência de todos os amino ácidos e do esqueleto protéico de um meio em solvente puro para soluções com sarcosina e sacarose. Estes autores encontraram que a exposição do esqueleto protéico é muito desfavorecida na presença de solutos, o que explicaria a estabilização de estruturas mais compactas na presença destes osmólitos. Portanto, na presença destes solutos, a quebra das pontes de hidrogênio do esqueleto protéico e sua exposição ao solvente é desfavorecida energeticamente em co-solução com osmólitos. Anteriormente, Back e colaboradores (1979) já propunham que a água competiria na formação-ruptura das pontes de hidrogênio na construção de estruturas secundárias entre o esqueleto e os resíduos laterais da molécula protéica, na presença de açúcares e polióis. Estes resultados dão sustentação a nossa interpretação, de que o efeito do soluto é tal que a diminuição da atividade da água favorece a estabilização das hélices α formadas.

Os resultados obtidos, a temperatura ambiente, permitem ampliar a discussão dos efeitos entrópicos devidos à presença dos solutos para estimar o comportamento termodinâmico do processo de enovelamento-desenovelamento estudado. Neste raciocínio, é importante ressaltar que o parâmetro de hidratação medido, Δn_w , deve estar relacionado com um aumento de entropia que acompanha a macromolécula durante a reação, pois existe uma mudança conformacional desta. A formação de segmentos de



hélices de tamanho compatível ao tamanho do soluto promove uma variação entrópica no sistema em relação às estruturas mais desenoveladas.

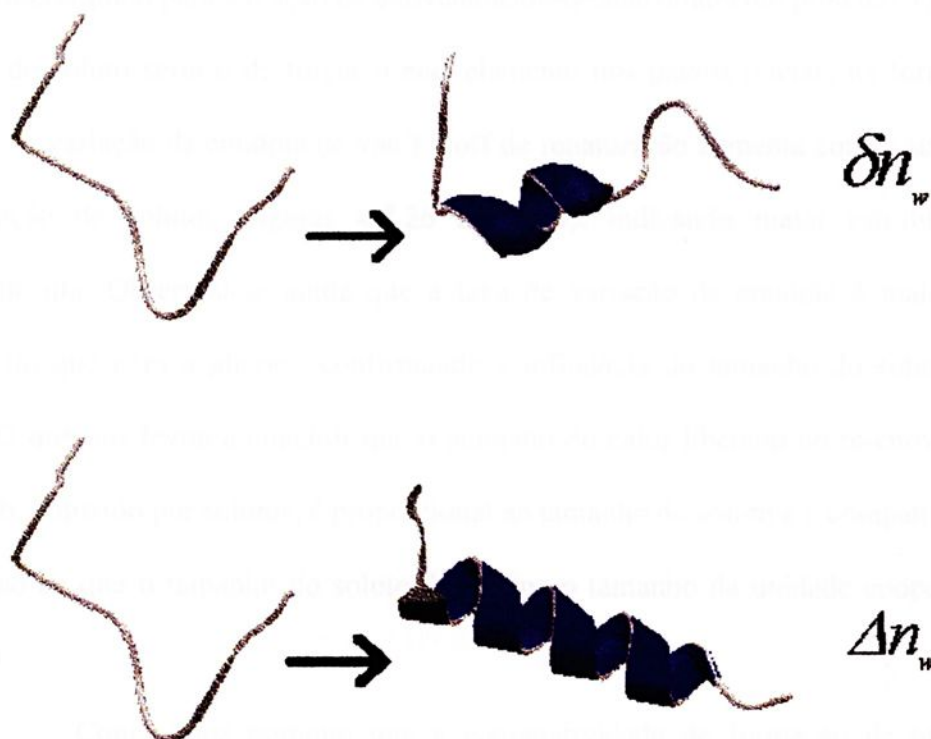


Figura 5.3.2 Representação esquemática das unidades cooperativas sugeridas neste trabalho para formação das hélices a na presença de diferentes tamanhos de soluto, envolvendo diferentes valores de hidratação.

Este efeito entrópico sugerido aqui, pode estar relacionado às chamadas interações hidrofóbicas? Este é o argumento de estudos recentes com o citocromo-c apresentado por Kamiyama e colaboradores (1999). Eles reconhecem o efeito da pressão osmótica do meio como a principal força promotora da interação do solvente à proteína não nativa. Já Nishii e colaboradores (1994) apontam que as interações hidrofóbicas no estado MG são muito fracas comparadas àquelas que ocorrem na estrutura mais compacta da proteína nativa da apoMb, mesmo comparando somente o subdomínio formado pelas hélices A, G e H dos estados MG e N.

Os experimentos de desnaturação térmica da apoMb a pH 2,46 e na presença de concentrações variadas de sacarose e glicose apontaram que: a) a transição D $\Leftrightarrow$ I em diferentes temperaturas tem a mesma variação de hidratação encontrada

anteriormente para estes solutos a temperatura ambiente; b) esta variação deve portanto ocorrer pela formação de segmentos de hélices por unidades cooperativas dependentes do tamanho do soluto. Desta maneira pode-se supor que a variação de hidratação impõe um processo hierárquico para a reação de enovelamento-desenovelamento protéico. O papel do tamanho do soluto seria o de forçar o enovelamento nos passos iniciais na formação do processo. A variação da entalpia de van't Hoff de renaturação aumenta com o aumento da concentração de solutos (figuras 4.7.26 e 4.7.27), indicando maior estruturação da macromolécula. Observou-se ainda que a taxa de variação da entalpia é maior para a sacarose do que para a glicose, confirmando a influência do tamanho do soluto (figura 4.7.28). O que nos levou a concluir que o aumento do calor liberado no re-enovelamento da apoMb, induzido por solutos, é proporcional ao tamanho do soluto e é compatível com a proposição de que o tamanho do soluto determina o tamanho da unidade cooperativa na transição.

Concluimos portanto que a cooperatividade de formação de hélice α é modulada pelo tamanho do soluto e estabilizada pela diminuição da atividade de água associada ao aumento de sua concentração. Isto sugere que a transição do estado $D \rightleftharpoons I$ ocorre entre diversos intermediários (I_i) estabilizados fundamentalmente pelas ligações de hidrogênio formadas dentro da unidade cooperativa.



Função de custo

Seja f a função de custo, $f: \mathbb{R}^n \rightarrow \mathbb{R}$, definida por

$$f(x) = \frac{1}{2} \|Ax - b\|^2$$

onde $A \in \mathbb{R}^{m \times n}$ e $b \in \mathbb{R}^m$ são matrizes e vetores dados.

Seja x^* o ponto que minimiza f , isto é, $x^* = \arg \min_{x \in \mathbb{R}^n} f(x)$.

Seja $\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_n$ os autovalores da matriz $A^T A$.

Seja $\mu_1, \mu_2, \dots, \mu_m$ os autovalores da matriz AA^T .

Seja $\alpha_1, \alpha_2, \dots, \alpha_m$ os autovalores da matriz $A A^T A$.

Seja $\beta_1, \beta_2, \dots, \beta_n$ os autovalores da matriz $A^T A A^T$.

Seja $\gamma_1, \gamma_2, \dots, \gamma_m$ os autovalores da matriz $A A^T A A^T$.

Seja

APÊNDICE

Seja f a função de custo, $f: \mathbb{R}^n \rightarrow \mathbb{R}$, definida por

$$f(x) = \frac{1}{2} \|Ax - b\|^2$$

onde $A \in \mathbb{R}^{m \times n}$ e $b \in \mathbb{R}^m$ são matrizes e vetores dados.

Seja x^* o ponto que minimiza f , isto é, $x^* = \arg \min_{x \in \mathbb{R}^n} f(x)$.

$$f(x) = \frac{1}{2} \|Ax - b\|^2$$

Seja $\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_n$ os autovalores da matriz $A^T A$.

Seja $\mu_1, \mu_2, \dots, \mu_m$ os autovalores da matriz AA^T .

Seja $\alpha_1, \alpha_2, \dots, \alpha_m$ os autovalores da matriz $A A^T A$.

Seja $\beta_1, \beta_2, \dots, \beta_n$ os autovalores da matriz $A^T A A^T$.

$$f(x) = \frac{1}{2} \|Ax - b\|^2$$

$$f(x) = \frac{1}{2} \|Ax - b\|^2$$

Apêndice

Funcionamento do Espectropolarímetro: a atividade óptica de moléculas pequenas surge da falta de simetria, isto é, da presença de átomos de carbono assimétricos e de seus efeitos sobre os cromóforos ao seu redor.

Após atravessar uma amostra com atividade óptica, a luz será modificada:

- no plano de propagação de sua amplitude máxima, isto é, a forma elíptica de propagação de E é projetada perpendicularmente ao plano xy de maneira a se enxergar uma elipse (com o observador em z). A elipticidade será então definida como sendo o ângulo cuja tangente é dada pela razão do eixo menor pelo eixo maior desta elipse, e;

- na orientação da elipse que é dada pela rotação óptica e é uma função do comprimento de onda, pois o eixo maior da elipse não é paralelo à direção da luz incidente (figura 3.2).

O dicroísmo circular, ou elipticidade, resulta da absorção diferencial, à esquerda (A_E) e à direita (A_D), da luz circularmente polarizada que atravessa uma amostra contendo moléculas assimétricas em solução. A elipticidade (θ) é o sinal registrado diretamente como a diferença na absorbância, $\Delta A = A_E - A_D$, e é expresso por:

$$\theta = \ln(10)(A_E - A_D) \cdot 180/4\pi = 32,98(A_E - A_D) \text{ (graus)}$$

Os equipamentos de DC podem medir rotações inferiores a 10^{-4} graus, e para comparar resultados de amostras diferentes é comum calcular a elipticidade em base molar e/ou molar-residual que são, respectivamente:

$$[\theta] = 100\theta / C \cdot l = 3298(A_E - A_D) / C \cdot l \text{ (mgraus.cm}^2\text{/dmol)}, \text{ ou}$$

$$[\theta]_R = 100\theta / C \cdot l \cdot N_R = 3298(A_E - A_D) / C \cdot l \cdot N_R \text{ (mgraus.cm}^2\text{/dmol.res)},$$



sendo: θ a elipticidade medida em graus ou miligraus; C a concentração molar da molécula alvo em moles/litro; l o comprimento óptico dado em cm; e N_r o número de resíduos que compõem a proteína (Schmid, 1990; Cantor e Schimmel, vol.2, 1980).

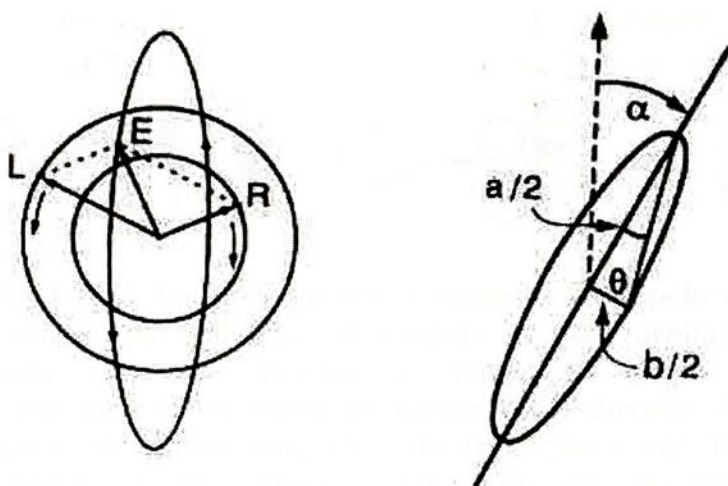


Figura A-1. Luz polarizada elípticamente: formada da desigualdade entre a intensidade da luz polarizada circularmente à esquerda e à direita. A elipticidade (θ) é a tangente da razão entre o raio menor e raio maior da elipse. A rotação óptica é o ângulo entre o eixo maior da elipse e o plano de polarização da luz inicialmente plano-polarizada.

A produção do ambiente eletrônico de uma hélice, como origem do sinal de DC, é resultado do fato de a luz induzir uma circulação helicoidal de cargas ao redor da direção do momento dipolar que só ocorre em moléculas assimétricas (figura A-2). A força rotatória das transições $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$ de uma hélice α em 222 nm é fortemente dependente do tamanho da cadeia (Woody e Tinoco, 1967).

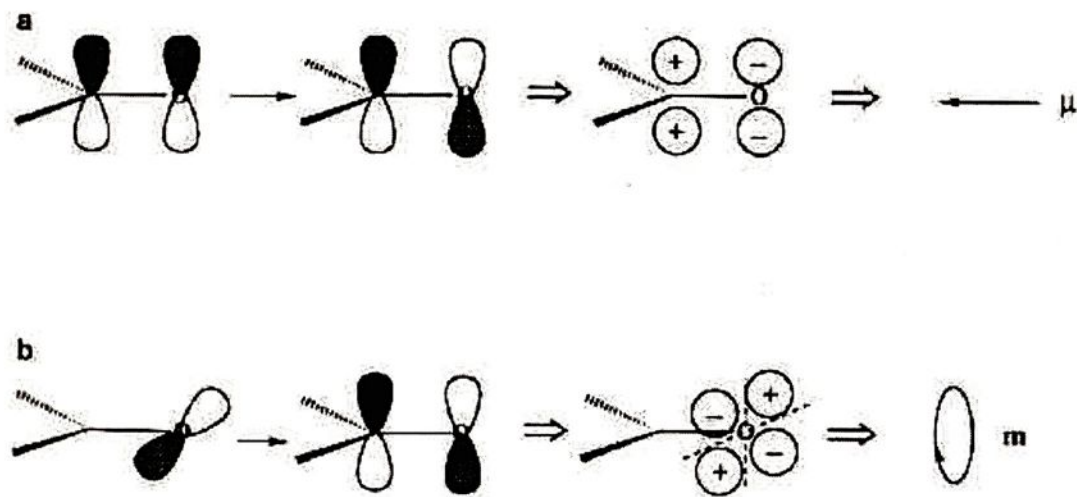


Figura A-2. A figura a mostra o momento de dipolo elétrico na transição $\pi \rightarrow \pi^*$ num grupo carbonila. O produto de seus orbitais têm um momento de dipolo resultante dirigido ao longo do grupo carbonila, correspondendo a um movimento linear de cargas nesta direção. A figura b representa o momento de dipolo magnético da transição $n \rightarrow \pi^*$ num grupo carbonil. Multiplicando os dois orbitais resulta num produto que tem um momento quadrupolar e corresponde ao movimento circular de cargas ao redor da ligação carbonila, correspondente ao momento dipolar magnético ao longo da direção da ligação.

As leituras de DC, ou de elipticidade, realizadas nos comprimentos de onda do ultra violeta longínquo, região de 180 a 250 nm, detectam transições ($n \Rightarrow \pi^*$) envolvendo variações da estrutura secundária das proteínas (Yang *et al.*, 1986; Schmid, 1990). As transições observáveis na região do ultra violeta próximo, de 250 a 330 nm, revelam contribuições dos amino ácidos aromáticos das proteínas, isto é, variações no ambiente dos cromóforos aromáticos e o sentido da assimetria do ambiente destes resíduos, que podem estar ou não encerrados no cerne protéico durante o processo de enovelamento (Schmid, 1990; Hirst e BrooksIII, 1994; Eftink, 1995).

- Anfinsen, C. B. "Principles that govern the folding of protein chains" Science, 121, 403-404, 1959.
- Arakawa, T., Hamaoka, S. H. "Stabilization of Protein Structure by Sugars" Biochemistry 21, 617-619, 1982.
- Arakawa, T. Hama, S., Hamaoka, S. H. "Preferential Interactions Between Protein Solvents in Aqueous Solutions: The $MgCl_2$ System" Biochemistry, 29, 1511-1515, 1990.
- Asanuma, T., Pappas, M. B. B., Asanuma, T. "Preparation and Properties of Apomemoglobin and Reconstituted Hemoglobins" Methods in Enzymology 76, 12-28, 1981.
- Bax, J. P., Oakenfull, J., Smith, M. B. "Effects of Thermal Stability of Proteins in the Presence of Sugars and Salts" Biochemistry, 18, 5191-5196, 1979.
- Berman, H. L. "Current Topics in Structural Biology" Science, 21, 84-91, 1983.
- Blather, R. M., Scheraga, H. A. "Energy Considerations of Fast Protein Folding: The Initial Collapse of Apomemoglobin" Proceedings of the National Academy of Sciences, 83, 5759-5764, 1986.

BIBLIOGRAFIA

- Berman, H. L., Rudolph, R. L. "Chemical Analysis of Specific Protein Apomemoglobin Folding" Biochemistry, Vol. 12, 5191-5196, 1980.
- Brachet, J. "Chemical Analysis of Biological Macromolecules" Science, 135, 1281-1285, 1959.
- Chabany, R. C. "Estudo de Alguns Aspectos e Estruturas de Ribossomos e Mitocôndrias" (Apresentação de Trabalho no Simpósio Molecular, Departamento de Física, UNESP, São José do Rio Preto, 1986).
- Creighton, C. R., Scheraga, H. A. "Biophysical Chemistry, Part I: The Conformation of Biological Macromolecules" Part II: "Thermodynamics for the Study of Biological Structure and Function" Part III: "The Behavior of Biological Macromolecules" Ed. W. H. Freeman and Company, New York, 1969.
- Costa Filho, G. "Termodinâmica dos Processos de Equilíbrio de Ligação de Oxigênio a Hemoglobinas em Solução: Variação da Entalpia e da Entropia de Ligação com a Modificação" Dissertação de Mestrado em Química Molecular, Departamento de Física, UNESP, São José do Rio Preto, 1993.
- Cullis, M. R., Sauerbrey, A. "Hydration-dependent Conformational States of DNA: Equilibrium and Kinetic Aspects" Biophysical Chemistry, 26, 17-34, 1987.

- Anfinsen, C.B. *"Principles that govern the folding of protein chain"*. *Science*. **181**, 223-230. 1973.
- Arakawa, T., Timasheff, S. N. *"Stabilization of Protein Structure by Sugars"*. *Biochemistry*. **21**, 6536-6544. 1982.
- Arakawa, T., Bhat, R., Timasheff, S. N. *"Preferential Interactions Determine Protein Solubility in Three-Component Solutions: The $MgCl_2$ System"*. *Biochemistry*. **29**, 1914-1923. 1990a.
- Ascoli, F., Fanelli, M. R. R., Antonini, E. *"Preparation and Properties of Apohemoglobin and Reconstituted Hemoglobins"*. *Methods in Enzymology*. **76**, 72-78. 1981.
- Back, J. F., Oakenfull, D., Smith, M. B. *"Increased Thermal Stability of Proteins in the Presence of Sugars and Polyols"*. *Biochemistry*. **18**, 5191-5196. 1979.
- Baldwin, R. L. *Current Opinion Structural Biology*. **3**, 84-91. 1993.
- Ballew, R. M., Sabelko, J., Gruebele. *"Direct Observation of Fast Protein Folding: The Initial Collapse of Apomyoglobin"*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **93**, 5759-5764. 1996.
- Barrick, D., Baldwin, R. L. *"Three-State Analysis of Sperm Whale Apomyoglobin Folding"*. *Biochemistry*. Vol. **32**, 3790-3796. 1993.
- Beychok, S. *"Circular Dichroism of Biological Macromolecules"*. *Science*. **154**, 1288-1299. 1966.
- Caetano, R. C. *"Efeito de Água sobre a Atividade da Ribonuclease A (Rnase A)"*. Dissertação de Mestrado em Biofísica Molecular. Departamento de Física. IBILCE UNESP. São José do Rio Preto. 1996.
- Cantor, C. R., Schimmel, P. R. *Biophysical Chemistry*. Part I: *"The Conformation of Biological Macromolecules"*. Part II: *"The techniques for the Study of Biological Structure and Function"*. Part III: *"The Behavior of Biological Macromolecules"*. Ed. W. H. Freeman and Company. New York. 1980.
- Caôn Filho, O *"Determinação das Curvas de Equilíbrio de Ligação de Oxigênio a Hemoglobinas em Soluções Viscosas Usando uma Cella Espectropolarimétrica Modificada"*. Dissertação de Mestrado em Biofísica Molecular. Departamento de Física. IBILCE UNESP. São José do Rio Preto. 1997.
- Colombo, M. F., Sanches, R. *"Hydration-dependent Conformational States of Hb Equilibrium and Kinetic Behavior"*. *Biophysical Chemistry*. **36**, 33-39. 1990.



- Colombo, M. F., Rau, C. D., Parsegian, V. A. ***“Protein Solvation in Allosteric Regulation: A Water Effect on Hemoglobin”***. *Science*. **256**, 655-659. 1992.
- Colombo, M. F., Rau, D. C., Parsegian, V. A. ***“Reevaluation of Chloride’s Regulation of Hemoglobin Oxygen Uptake: The Neglected Contribution of Protein Hydration in Allostery”***. *Proceedings of the National Academy of Science*. **91**, 10517-10520. 1994.
- Colombo, M. F., Bonilla-Rodrigues, G. O. ***“The Water Effect on Allosteric Regulation of Hemoglobin Probed in Water/Glucose and Water/Glycine Solutions”***. *The Journal of Biological Chemistry*. **271**, 4895-4899. 1996.
- Colombo, M. F. ***“O Papel da Água na Regulação de Macromoléculas Biológicas: Do Controle Alostérico À Especificidade no Reconhecimento Molecular”***. *Tese de Livre Docência*. Departamento de Física. IBILCE UNESP. São José do Rio Preto. 1996a.
- Colombo, M. B. R. ***“Efeito de água no Potencial de Oxi-redução de Hemoglobina Humana e Mioglobina Equina”***. *Dissertação de Mestrado*. Departamento de Física. IBILCE UNESP. São José do Rio Preto. 1996b.
- Colombo, M. F., Seixas, F. A. V. ***“Novel Allosteric Conformation of Human Hb Revealed by the Hydration and Anion Effects on O₂ Binding”***. *Biochemistry*. Vol. **38** (36), 11741-11748. 1999.
- Colombo, M. F., Ruggiero Neto, J. ***“Water Regulation of Actinomycin-D Binding to DNA: The Interplay among Drug Affinity, DNA Long-Range Conformation, and Hydration”***. *Biopolymers*. Vol. **53**, 46-59, 2000.
- CRC Press, 1987-88. *Handbook of Chemistry and Physics*, 68th ed.
- Davis-Searles, P. R., Moras, A. S., Saunders, A. J., Erie, D. A., Pielak, G. J. ***“Sugar-Induced Molten-Globule Model”***. *Biochemistry*. Vol. **37**, 17048-17053. 1998.
- Dobson, C. M., Evans, P. A., Radford, S. E. ***“Understanding How Proteins Fold: The Lysozyme story so far”***. *TIBS*. **19**, 31-37. 1994.
- Dolgikh, D. A., Gilmanshin, R. I., Brazhnikov, E. V., Bychkova, V. E., Semisotnov, G. V., Venyaminov, S. Yu., Ptitsyn, O. B. ***“ α Lactalbumin: Compact State with Fluctuating Tertiary Structure?”***. *FEBS Letters*. **136**, 311-315. 1981.
- Eftink, M. R. ***“Use of Multiple Spectroscopic Methods to Monitor Equilibrium Unfolding of Proteins”***. *Methods in Enzymology*. **259**, 487-511. 1995.
- Eliezer, D., Jennings, P. A., Wright, P. E., Doniach, S., Hodgson, K. O., Tsuruta, H. *Science*. **270**, 487-489. ***“The Radius of Gyration of an Apomyoglobin Folding Intermediate”***. 1995.



- Englander, S. W., Mayne, L. *Annual Review Biophysics Biomolecular Structure*. Vol. **21**, 243-265. 1992.
- Fink, A. L., Calciano, L. J., Goto, Y., Korotsu, T., Palleros, D. R. "**Classification of Acid Denaturation of Proteins: Intermediates and Unfolded States**". *Biochemistry*. **33**, 12504-12511. 1994.
- Fontana, A, Laureto, P. P., De Filippis, V., Scaramella, H., Zambonin, M. "**Probing the Partly Folded States of Proteins by Limited Proteolysis**". *Folding Design*. **2**, R17-R26. 1997.
- Freedman, R. B. "**Protein Folding in the Cell**". in *Protein Folding*. W. H. Freeman and Company. New York. Thomas E. Creighton Editor. 1992. cap.10.
- Freifelder, D. "**Principles of Physical Chemistry with Applications to the Biological Sciences**". Jones and Bartlet Publishers, Inc. 1985. cap.
- Gabler, R. "**Electrical Interactions in Molecular Biophysics**". Academic Press, Inc. New York. 1978.
- Gast, K., Damaschun, H., Misselwitz, R., Muller-Frohne, M., Zirwer, D., Damaschun G. "Compactness of Protein Molten Globule: Temperature-Induced Structured Changes of the Apomyoglobin Folding Intermediate". *European Biophysical Journal*. **23**, 297-305. 1994.
- Gill, S. J., Wyman, J. "**Binding and Linkage: Functional Chemistry og Biological Macromolecules**". Ed. University Science Books, Mill Valey. 1990.
- Goto, Y., Calciano, L.J., Fink, A.L. "**Acid-Induced Folding of Proteins**". *Proceedings of National Academy of Science*. **87**, 573-577. 1990.
- Goto, Y., Takahashi, N., Fink, A. L. "**Mechanism of Acid-Induced Folding of Proteins**". *Biochemistry*. **29**, 3480-3488. 1990.
- Goto, Y., Fink, A. *Journal of Molecular Biology*. **214**, 803-805. 1990.
- Goto, Y., Fink, A. "**Acid-Induced Folding of Heme Proteins**". *Methods in Enzymology*. **232**, 3-15. 1994.
- Greenfield, N., Fasman, G. D. "**Computed Circular Dichroism Spectra for Evaluation of Protein Conformation**". *Biochemistry*. **8**, 4108-4116. 1969.
- Griko, Y. V., Privalov, P. L., Venyaminov, S. Y., Kutysenko, V. P. "**Thermodynamic Study of the Apomyoglobin Structure**". *Journal of Molecular Biology*. **202**, 127-138. 1988.



- Griko, Y. V., Privalov, P. L. **"Thermodynamic Puzzle of Apomyoglobin Unfolding"**. *Journal of Molecular Biology*. **235**, 1318-1325. 1994.
- Hirst, J. D., Brooks III, C. L. . **"Helicity, Circular Dichroism and Molecular Dynamics of Proteins"**. *Journal of Molecular Biology*. **243**, 173-178. 1994.
- Hirst, J. D., Brooks III, C. L. **"Molecular Dynamics Simulation of Isolated Helices of Myoglobin"**. *Biochemistry*. **34**, 7612-7621. 1995.
- Hughson, F., Wright, P., Baldwin, R. "Structural Characterization of a Partly Folded Apomyoglobin Intermediate". *Science* **249**, 1544-1548. 1990.
- Hughson, F., Barrick, D., Baldwin, R. **"Probing the Stability of a Partly Folded Apomyoglobin Intermediate by Side-Directed Mutagenesis"**. *Biochemistry*. **30**:17, 4113-18. 1991.
- Jennings, P. ^a, Wright, P. E. **"Formation of a Molten Globule Intermediate Early in the Kinetic Folding Pathway of Apomyoglobin"**. *Science*. **262**, 892-896. 1993.
- Johnson Jr, W. C. **"Protein Secondary Structure and Circular Dichroism: A Pratical Guide"**. *PROTEINS: Structure, Function and Genetics*. **7**, 205-214. 1990.
- Johnson Jr. W. C. **"Circular Dichroism Instrimentation"**. In: *Circular Dichroism and the Confomational Analysis of Biomolecules*. Edited by Gerald D. Fasman. Plenum Press. New York. 1996. Cap. 18.
- Kataoka, M., Nishii, I., Fujisawa, T., Ueki, T., Tokunaga, F., Goto. **"Structural Characterization of Molten Globule and Native States of Apomyoglobin by Solution X-ray Scattering"**. *Journal of Molecular Biology*. **249**, 215-228. 1995.
- Kauzmann, W. **"Some Factors in the Interpretation of Protein Denaturation"**. *Journal of American Chemistry Society*. **77**, 1-63. 1959.
- Kendrew, J. C., Dickerson, B. E., Hart, R. G., Davies, D. R., Phillips, C. D., Shore, C. V. **"Structure of Myoglobin"**. *Nature*. **185**, 422-427. 1960.
- Kamiyama
- Kovrigin, E. L., Potekhin, S. A. **"Preferential Solvation Changes upon Lysozyme Heat Denaturation in Mixed Solvents"**. *Biochemistry*. **36**, 9195-9199. 1997.
- Ku wajima, K., Nitta, K., Yoneyama, M., Sugai, S. **"Three-State Denaturation of α -Lactalbumin by Guanidine Hydrochloride"**. *Journal of Molecular Biology*. **106**, 359-373. 1976.
- Ku wajima, K. *Protein: Structure, Function and Genetics*. **6**, 87-103. 1989.
- Lee, L., Lee, J. C. *Biochemistry*. **26**, 7813-7819. 1987.



- Lee, J. C., Timasheff, S. N. . *"The Stabilization of Proteins by Sucrose"*. *The Journal of Biological Chemistry*. **256**, 7193-7201. 1981.
- Levinthal, C. *"Are There Pathway for Protein Folding?"*. *Journal of Chemical Physics*. **65**, 44-45. 1968.
- Levitt, M., Chothia, C. *"Structural Patterns in Globular Proteins"*. *Nature*. **261**, 552-558. 1976.
- Loh, S. N., Kay, M. S., Baldwin, R. L. *"Structure and Stability of a Second Molten Globule Intermediate in the Apomyoglobin Folding Pathway"*. *Proceedings of the National Academy of Science*. **92**. 5446-5450. 1995.
- Liu, Y., Bolen, D. W. *"The Peptide Backbone Plays a Dominant Role in Protein Stabilization by Naturally Occurring Osmolytes"*. *Biochemistry*. **34**, 12884-12891. 1995.
- Luna-Bárceñas, G., Bennett, G. E., Sanchez, I. C., Johnson, K. P. *"Monte Carlo Simulation of Polymer Collapse in Athermal Solvents"*. *Journal of Chemical Physics*. **104**. 9971-9973. 1996.
- Manual da Jasco, 1995.
- Mathews, C.K., van Holde, K.E. *Biochemistry*. Benjamin e Cummings Publishing Co, New York. 1990.
- Minton, A. P. *"The Effect of Volume Occupancy upon the Thermodynamic Activity of Proteins: Some Biochemical Consequences"*. *Molecular and Cellular Biochemistry*. **55**, 119-140. 1983.
- Minton, A. P. *"Effect of a Concentrated Inert Macromolecular Cosolute on the Stability of a Globular Protein with Respect to Denaturation by Heat and by Chaotropes: A Statistical-Thermodynamic Model"*. *Biophysical Journal*. **78**, 101-109.2000.
- Neves, A C. D. *"Efeito de Água no Estado Conformacional Compacto de Citocromo-C"*.Dissertação de Mestrado em Biofísica Molecular. Departamento de Física. IBILCE UNESP. São José do Rio Preto. 1996.
- Nishii,I., Kataoka,M., Goto,Y. *"Thermodynamic Stability of the Molten Globule States of Apomyoglobin"*. *Journal of Molecular Biology*. **250**, 223-238. 1995.
- Ogushi, M., Wada, A. *"Molten Globule State: a Compact Form of Globular Proteins with Mobile Side Chains"*. *Febbs Letters*. **164**, 21-24. 1983.
- Pace, C.N., Shirley, B.A., Thomson, J. A. *"Measuring the Conformation Stability of a Protein"*. in *"Protein Structure: a pratical approach"*. Edited by T E Creighton. 1990. cap.13, 311-330.



- Parsegian, V. A., Rand, R. P., Colombo, M. F., Rau, D. C. "**Water at the Macromolecular Surface: Solvation Energy and Functional Control**". Biomembrane Electrochemistry. **235**, 177-196. 1994.
- Privalov, P. L. "**Physical Basis of the Stability of the Folded Conformations of Proteins**". in *Protein Folding*. Thomas E. Creighton Editor. W. H. Freeman and Company, New York. 1992. **cap. 3**.
- Privalov, L.P. "**Intermediate States in Protein Folding**". *Journal of Molecular Biology*. **258**. 707-725. 1996.
- Ptitsyn, O. B. "**The Molten Globule State**". in *Protein Folding*. Thomas E. Creighton Editor. W. H. Freeman and Company, New York. 1992. **cap. 6**. 243-300.
- Ptitsyn, O. "**Molten Globule and Protein Folding**". *Advances in Protein Chemistry*. **47**, 83-229. 1995.
- Richards, F. M. "**Folded and Unfolded Proteins: An Introduction**". in *Protein Folding*. Thomas E. Creighton Editor. W. H. Freeman and Company, New York. 1992. **cap. 1**.
- Richardson, J. S. *Nature*. **268**, 552-558. 1977.
- Sanger, F. "**The Arrangement of Amino acids in Proteins**". *Advances in Protein Chemistry*. **7**, 1-67. 1952.
- Santoro, M. M., Liu, Y., Khan, M. A, Hou, L. X., Bolen, D. W. "**Increased Thermal Stability of Proteins in the Presence of Naturally Occurring Osmolytes**". *Biochemistry*. **31**, 5278-5283. 1992.
- Schellman, J. A "**Macromolecular Binding**". *Biopolymers*. **14**, 999-1018. 1975.
- Schmid, F.X. "**Spectral Methods of Characterizing Protein Conformation and Conformatinal Changes**". in *Protein Structure: a pratical approach* Edited by T E Creighton. New York. 1990. **cap. 11**, 251-285.
- Seixas, F. A . "**Efeito da Atividade de Água sobre as Características Estruturais e Funcionais de Hemoglobina Humana A₀**". Dissertação de Mestrado em Biofísica Molecular. Departamento de Física. IBILCE UNESP. São José do Rio Preto. 1998.
- Tanford, C. "**Protein Denaturation**". *Advances in Protein Chemistry*. **23**, 121-282. Part A and B. 1968.
- Tanford, C. "**Extension of the Theory of Linked Functions to Incorporate the Effects of Protein Hydration**". *Journal of Molecular Biology*. 1969. **39**. 539-544.
- Tanford, C. "**Protein Denaturation**". *Advances in Protein Chemistry*. **24**. 1-67, Part C. 1970.



- Tanford, C., Roxby, R. *"Interpretation of Protein Titration Curves. Application to Lysozyme"*. *Biochemistry*. **11**, 2192-2198. 1972.
- Tanford, C. *"The Hydrophobic Effect"*. 2nd. Ed. Wiley, N. Y. 1980.
- Teale, F. W. *"Cleavage of the Haem-Protein Link by Acid Methylethylketone"*. *Bioch. Et Biophys. Acta*. **35**, 543. 1959.
- The Merck Index, 1996
- Timasheff, N.S., Arakawa,T. *"Stabilization of Protein Structure by Solvents"*. in *"Protein Structure: a pratical approach"* Edited by T E Creighton. New York. cap.14, 331-345. 1990.
- Timasheff, S. N. *"Water as Ligand: Preferential Binding and Exclusion of Denaturants in Protein Unfolding"*. *Biochemistry*. **31**, 9857-9864. 1992.
- Timasheff, S. N. *"The Control of Protein Stability and Association by Weak Interactions with Water: How Do Solvents Affect these Process?"*. *Annual Review on Biophysics and Biomolecular Structures*. **22**, 67-97. 1993.
- Timasheff, S. N. *"Preferential Interactions of Water and Cosolvents with Proteins"*. in *"Protein-Solvent Interactions"*. Edited by Roger B. Gregory. Marcel Dekker, Inc. New York. **cap. 11**, 445-482. 1995.
- Timasheff, S. N. *"In Disperse Solution, "Osmotic Stress" Is a Restricted Case of Preferential Interactions"*. *Proceedings of the National Academy of Science*. **95**, 7363-7367. 1998.
- Tinoco, I. Jr., Sauer, K., Wang, J. C. *"PHYSICAL CHEMISTRY: Principles and Applications in Biological Scieces"*. Prentice-Hall, Inc. New Jersey. 1995. Cap 9 e 10.
- van Hold, K. E. *"Physical Biochemistry"*. Cambridge University Press, Cambridge. 2* Edition, 1985.
- Voet, D., Voet, J. *Biochemistry*. 1sted. John Wiley & Sons, 1990.
- Yancey, P. H., Clark, M. E., Hand, S. C., Bowlus, R. D., Somero, G. N. *"Living with Water Stress: Evolution on Osmolyte Systems"*. *Science*. **217**, 1214-1222. 1982.
- Yang, J. T., Wu, C. S. C., Martinez, H. M. *"Calculation of Protein Conformation from Circular Dichroism"*. *Methods of Enzymology*. **130**, 208-269. 1986.
- Willard,H., Merrit,L.,Dean,J. 1974. *Análise Instrumental*, 2*ed. Fund.C.Gulbenkian, Lisboa. 1974. cap. 19 e 20.
- Wills, P. R., Winzor, D. J. *"Thermodynamics Analysis of "Preferential Solvation" in Protein Solutions"*. *Biololymers*. **33**. 1627-1629. 1993.



- Winzor, D. J., Wills, P. R. *“Effects of Thermodynamic Nonideality on Protein Interactions: Equivalence of Interpretations Based on Excluded Volume and Preferential Solvation”*. *Biophysical Chemistry*. **25**, 243-251. 1986.
- Wong, K. P., Tanford, C. *Journal of Biological Chemistry*. **248**, 8518-8523. 1973.
- Wyman, J. *“Linked Functions and Reciprocal Effects in Hemoglobin: A Second Look”*. *Advances in Protein Chemistry*. **19**, 223-286. 1964.



