INSTITUTO DE QUÍMICA

Universidade de São Paulo

18-790

Universidade de São Paulo

Instituto de Química

**Propriedades conformacionais de um fragmento (aminoácidos 92-100)
da primeira alça extra-celular do receptor AT₁ de angiotensina II em
solução e em presença de membranas modelo**

Roberto Kopke Salinas

Dissertação de Mestrado

Orientador: Profa. Dra. Shirley Schreier

São Paulo

2000

DEDALUS - Acervo - CQ

30100002457

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Salinas, Roberto Kopke
S165p Propriedades conformacionais de um fragmento
(aminoácidos 92-100) da primeira alça extra-celular do
receptor AT₁ de angiotensina II em solução e em presença de
membranas modelo / Roberto Kopke Salinas. -- São Paulo,
2000.
94p.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Química. Departamento
de Bioquímica.
Orientador: Schreier, Shirley

1. Peptídeo : Bioquímica 2. Macromolécula : Bioquímica 3.
Membrana : Biologia I. T. II. Schreier, Shirley, orientador.

574.192456 CDD

**“Propriedades Conformacionais de um Fragmento
(Aminoácidos 92-100) da Primeira Alça Extra-
celular do Receptor AT₁ de Angiotensina II em
Solução e em Presença de Membranas Modelo”.**

ROBERTO KOPKE SALINAS

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção
do grau de Mestre em Ciências - Área: Bioquímica.

Aprovado por:

Profa. Dra. SHIRLEY SCHREIER
IQ - USP
(Orientadora e Presidente)

Profa. Dra. ELIZABETH PINHEIRO GOMES ARÊAS
IQ - USP

Prof. Dr. LAERTE DE OLIVEIRA
UNIFESP

SÃO PAULO
07 DE JANEIRO DE 2000.

Resumo

Foram examinadas as propriedades conformacionais de um peptídeo (YRWPFGNHL- NH_2) presente na primeira alça extra-celular do receptor AT_1 do hormônio angiotensina II. Espectros de dicroísmo circular (CD) e fluorescência foram obtidos em solução aquosa (em função do pH e da temperatura), na presença de um solvente indutor de estrutura secundária (trifluoroetanol, TFE), e na presença de micelas carregadas negativamente (dodecil sulfato de sódio, SDS) ou zwitteriônicas (*N*-hexadecil-*N,N*-dimetil-3-amônio-1-propano sulfonato, HPS e lisofosfatidilcolina, liso-PC), e de bicamadas contendo um fosfolípido zwitteriônico (1-palmitoil-2-oleoil fosfatidilcolina, POPC) ou uma mistura de POPC e um fosfolípido carregado negativamente (ácido 1-palmitoil-2-oleoil fosfatídico, POPA). O estudo por calorimetria de titulação permitiu analisar a termodinâmica da ligação.

Espectros de CD indicaram uma estrutura flexível em solução aquosa, modulada pelo pH e pela temperatura. Na presença de TFE, de micelas, e de vesículas de POPC:POPA o peptídeo adquire estrutura secundária, sugerindo a presença de uma dobra beta.

Espectros de fluorescência intrínseca (W^3) mostraram um deslocamento do comprimento de onda máximo de emissão (λ_{max}) para o azul na presença de micelas e de vesículas de POPC:POPA. Observou-se também um aumento da intensidade de fluorescência, exceto no caso de SDS. Esses resultados indicaram que o peptídeo interagiu com os agregados. Não se observou alteração da fluorescência na presença de POPC. Medidas de anisotropia de fluorescência mostraram que, quando ligado, o peptídeo torna-se mais imobilizado. Estudos de supressão de fluorescência empregando agentes supressores aquossolúveis e de membrana sugeriram que o W^3 localiza-se próximo à interface bicamada-água.

Os resultados mostraram que o peptídeo se liga a micelas zwitteriônicas e negativas, enquanto que, no caso de bicamadas (mais empacotadas), a ligação depende da presença de cargas negativas. Experimentos de calorimetria mostraram que o ΔH de ligação do peptídeo a vesículas é negativo, compatível com a ocorrência de interações eletrostáticas.

Foram observadas diferenças qualitativas e quantitativas na ligação do peptídeo às micelas de HPS e liso-PC. A fim de examinar se essas diferenças eram devidas ao empacotamento molecular, foram obtidos espectros de ressonância paramagnética eletrônica de marcadores de spin intercalados nos dois sistemas. Diferenças foram observadas principalmente na região da cabeça polar, as quais poderiam ser responsáveis pela diferença de comportamento do peptídeo em ambos os agregados.

Os resultados obtidos para a primeira alça extra-celular do receptor AT₁ indicam que a sua conformação pode ser modulada pelo pH e pela polaridade do ambiente, que ela pode interagir com a membrana através de interações hidrofóbicas e eletrostáticas, e ainda que essa interação depende do grau de empacotamento da fase lipídica. Esses resultados estão de acordo com a visão de que domínios extra-membranares de GPCRs situam-se na interface membrana-água. As alterações conformacionais induzidas pelo meio, bem como pela interação entre domínios extra-membranares de GPCRs e a fase lipídica ou pela ligação do agonista, poderiam ter um papel no mecanismo molecular de transdução de sinal.

Abstract

In this work the conformational properties of a peptide (YRWPFGNHL-NH₂) whose sequence is present in the first extra-cellular loop of the angiotensin II AT₁ receptor were examined. Circular dichroism (CD) and fluorescence spectra were obtained in aqueous solution (as a function of pH and temperature), in the presence of a secondary structure inducing solvent (trifluoroethanol, TFE), and in the presence of negatively charged (sodium dodecyl sulfate, SDS) or zwitterionic (N-hexadecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propane sulfonate, HPS and lysophosphatidylcholine, liso-PC) micelles, and of bilayers containing a zwitterionic phospholipid (1-palmitoyl-2-oleoyl phosphatidylcholine, POPC) or a mixture of POPC and a negatively charged phospholipid (1-palmitoyl-2-oleoyl phosphatidic acid, POPA). Studies of titration calorimetry allowed the analysis of the binding thermodynamics.

CD spectra indicated a flexible structure in aqueous solution, which was modulated by pH and temperature. In the presence of TFE, micelles and of POPC:POPA vesicles, the peptide acquired secondary structure, which is suggestive of a β turn.

The intrinsic fluorescence spectra (W^3) showed a blue-shift of the maximum emission wavelength (λ_{max}) in the presence of micelles and of POPC:POPA vesicles. An increase in fluorescence intensity was also observed, except in the case of SDS. These results indicated that the peptide interacted with the aggregates. No fluorescence changes were observed in the presence of POPC. Fluorescence anisotropy measurements showed that, when bound to the aggregates, the peptide becomes more immobilized. Fluorescence quenching studies using water soluble and membrane-bound quenchers suggested that W^3 is located close to the water-bilayer interface.

The results showed that the peptide binds to negatively charged and zwitterionic micelles, while in the case of bilayers (which are more tightly packed) the binding depends on the presence of negative charges. Titration calorimetry showed that ΔH of peptide binding to the vesicles is negative, which is compatible with the occurrence of electrostatic interactions.

Qualitative and quantitative differences in binding of the peptide to HPS and liso-PC micelles were observed. In order to examine whether these differences were due to

molecular packing, electron paramagnetic resonance spectra of spin labels intercalated in both systems were obtained. Differences were observed, mainly in the polar head group region, that could be responsible for the different behaviour displayed by the peptide in both aggregates.

The results obtained for the first extra-cellular loop of the AT₁ receptor indicated that its conformation can be modulated by pH and by the polarity of the medium, and that it can interact with the membrane through hydrophobic and electrostatic interactions, and also that this interaction depends on the molecular packing of the lipid phase. These results are in agreement with the idea that the GPCRs extra-membrane domains are located at the water-membrane interface. Conformational changes induced by the medium, as well as by the interaction between extra-cellular segments and the membrane or by ligand binding, could play a role in the molecular mechanism of signal transduction.

*À Helena, pelo carinho e apoio, indispensáveis, mesmo estando longe.
Aos meus pais, e meu irmão, e ao Rafael.*

Agradecimentos

Agradeço à Shirley pela orientação, pela confiança, e pela formação que adquiri durante o convívio em seu laboratório.

Agradeço ao prof. Frank Quina, pelo empréstimo do seu fluorímetro durante as primeiras etapas desse trabalho, e pelas discussões sobre fluorescência, ao prof. Watson Loh e ao Rodrigo, da Unicamp, pela oportunidade de usar o equipamento de calorimetria de titulação, à profa. Yolanda Cuccovia e ao meu amigo Flávio Maximiano pelo empréstimo de detergentes recristalizados.

Agradecimentos especiais aos colegas do laboratório, Alice, Berê, Cláudio, Fábio, Goretti, Lua, Mercedes, Noboru, Regina, Rui, e ao Carlos Alvarez, pela amizade. À Thelma, pelas primeiras lições. E aos meus amigos, Leo, Sérgio e Janaina, pois sempre estivemos juntos.

Agradeço à FAPESP pelo apoio financeiro.

Índice

ABREVIACÕES	1
I. INTRODUÇÃO	2
I.A RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G (GPCRs)	2
I.B TRANSDUÇÃO DE SINAL E ATIVAÇÃO DO RECEPTOR	3
I.C RELAÇÃO ESTRUTURA-FUNÇÃO NOS GPCRS	4
I.D O RECEPTOR AT ₁ DE ANGIOTENSINA II	7
I.E O ESTUDO DE DOMÍNIOS EXTRA-MEMBRANARES DE GPCRS	11
I.E.1. <i>A contribuição do laboratório</i>	14
I.F OBJETIVOS	16
II. MATERIAIS E MÉTODOS	17
II.A MATERIAIS	17
II.A.1 <i>O peptídeo fEL1</i>	17
II.A.2 <i>Reagentes</i>	17
II.B. FUNDAMENTOS DAS TÉCNICAS UTILIZADAS	19
II.B.1 <i>Dicroísmo circular (CD)</i>	19
II.B.2 <i>Fluorescência</i>	22
II.B.3 <i>Ressonância paramagnética eletrônica</i>	27
II.B.4 <i>Calorimetria de titulação</i>	30
II.C MÉTODOS	31
II.C.1 <i>Preparação das soluções estoque de fosfolípido, marcador de spin e detergente</i>	31
II.C.2 <i>Preparação das vesículas de POPC:POPA com e sem marcador de spin</i>	32
II.C.3 <i>Espectros de CD</i>	32
II.C.4 <i>Medidas de fluorescência</i>	33
II.C.5. <i>Experimentos de titulação calorimétrica</i>	35
II.C.6 <i>Preparação de amostras de HPS e Liso-PC contendo marcadores de spin, e obtenção dos espectros de RPE</i>	36
III. RESULTADOS	37
III.A ESTUDOS DE DICROÍSMO CIRCULAR	37
III.A.1 <i>Estudos do peptídeo fEL1 em solução aquosa, em função do pH, da temperatura e na presença de TFE</i>	37
III.A.2 <i>Estudos da interação de fEL1 com micelas de detergente e vesículas fosfolípídicas</i>	39
III.A.3 <i>Estudos da interação de fEL1 com vesículas fosfolípídicas</i>	43
III.B ESTUDOS DE FLUORESCÊNCIA	44
III.B.1 <i>Estudo da interação do peptídeo fEL1 com micelas de detergente e bicamadas fosfolípídicas</i>	44
III.B.2 <i>Estudo da interação de fEL1 com micelas de detergente e bicamadas fosfolípídicas através de medidas de anisotropia de fluorescência</i>	48
III.B.3 <i>Estudo do efeito do pH sobre o espectro de fluorescência do peptídeo fEL1 em solução aquosa, e na presença de micelas de SDS, HPS e liso-PC</i>	50
III.B.4 <i>Estudos da interação de fEL1 com micelas e bicamadas através de medidas do grau de acessibilidade do triptofano a um supressor aquoso</i>	51
III.B.5 <i>Estudos da localização do triptofano na bicamada através de medidas de supressão de fluorescência por marcadores de spin fosfolípídicos</i>	54
III.B.6 <i>Determinação das constantes de ligação (K_b) do peptídeo fEL1 a micelas de HPS, liso-PC e vesículas de POPC:POPA</i>	55
III.C. ESTUDO DA INTERAÇÃO DE fEL1 COM VESÍCULAS DE 1:1 POPC:POPA POR CALORIMETRIA DE TITULAÇÃO	61
III.D ESTUDOS DA ORGANIZAÇÃO DE MICELAS DE LISO-PC E HPS POR RPE	67
IV. DISCUSSÃO	72

IV.A PROPRIEDADES CONFORMACIONAIS DE fEL1 EM SOLUÇÃO AQUOSA.....	72
IV.B ESTUDOS DA INTERAÇÃO DE fEL1 COM BICAMADAS FOSFOLIPÍDICAS	74
IV.C ESTUDOS DA INTERAÇÃO DE fEL1 COM MICELAS DE DETERGENTE	77
V. CONCLUSÕES	81
VI REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
CURRICULUM VITAE	94

Abreviações

λ	Comprimento de onda (em nm)
λ_{max}	λ em que a intensidade do espectro é máxima
F	intensidade de fluorescência
F_{max}	máxima intensidade de fluorescência
ε	coeficiente de extinção molar
RMN	ressonância magnética nuclear
2D- ¹ H-RMN	ressonância magnética nuclear de prótons bidimensional
RPE	ressonância paramagnética eletrônica
CD	dicroísmo circular
SDS	dodecil sulfato de sódio
HPS	N-hexadecil-N,N-dimetil-3-amônio-1-propano sulfonato
liso-PC	1-palmitoil-2-hidroxi-fosfatidilcolina
POPC	1-palmitoil-2-oleoil fosfatidilcolina
POPA	ácido 1-palmitoil-2-oleoil fosfatídico
5-PCSL	1-palmitoil-2-stearoil (5-doxil) fosfatidilcolina
12-PCSL	1-palmitoil-2-stearoil (12-doxil) fosfatidilcolina
5-SASL	ácido 5-doxil esteárico
5-MeSL	éster metílico do ácido 5-doxil esteárico
10N19	10-doxil-nonadecano
tempo	2,2,6,6-tetrametilpiperidina-N-oxil
CAT16	iodeto de 4-(N,N-dimetil-N-hexadecil) amônio-tempo
TN	éster tempo-nonanoato

I. Introdução

Neste trabalho estudaram-se os aspectos conformacionais de um peptídeo sintético, *fEL1*, cuja sequência, *YRWPFGNHL-NH₂*, corresponde aos aminoácidos 92-100 do receptor AT₁ do hormônio peptídico angiotensina II, que pertence à superfamília dos receptores acoplados a proteínas G (GPCRs). De acordo com predições teóricas, essa sequência faz parte da primeira alça extra-celular do receptor. Este peptídeo contém a Y⁹², essencial para a ligação do hormônio (Hjorth e col., 1994). O estudo foi realizado em solução aquosa, em função do pH e da temperatura, em trifluoroetanol (TFE), e na presença de interfaces (micelas e bicamadas), por espectroscopia de dicroísmo circular (CD), fluorescência e calorimetria de titulação. O comportamento conformacional do peptídeo frente a essas condições foi relacionado com o seu papel biológico na proteína inteira. As propriedades conformacionais de um peptídeo análogo, *fEL1*⁺¹, cuja sequência, *YRWPFGNHYL-NH₂*, contém uma tirosina a mais, foram estudadas por CD em solução aquosa (Spisni e col., 1996).

I.A Receptores acoplados a proteínas G (GPCRs)

Muitos receptores de membrana promovem a resposta celular via segundos mensageiros. Quando essa ação se faz através da ativação de proteínas que ligam nucleotídeos de guanina (proteínas G), eles são denominados receptores acoplados a proteínas G (GPCR). As bases moleculares do mecanismo de transdução de sinal promovido por receptores localizados na membrana celular têm sido objeto de uma enorme quantidade de estudos, devido às suas implicações fisiológicas e patológicas.

Os GPCRs formam uma superfamília de receptores de membrana, são mais de mil receptores diferentes já clonados (Baldwin e col., 1997, Horn e col., 1998), que respondem a uma infinidade de agonistas, desde fótons no caso da rodopsina, moléculas odorantes (Mombaerts, 1999), pequenas aminas como as catecolaminas, a melatonina, hormônios peptídicos como a angiotensina II e a bradicinina, a glicoproteínas, como o hormônio luteinizante e o hormônio foliculo estimulante (Schwartz, 1996).

Os GPCRs são agrupados em famílias de acordo com o grau de homologia entre

as sequências. A maior delas e mais estudada é a da rodopsina. Outras famílias são: a dos receptores de glucagon/peptídeo intestinal vasoativo (VIP)/calcitonina, dos receptores de glutamato metabotrópico/sensores de cálcio, dos receptores de ferormônios de mamíferos, dos receptores de ferormônios de leveduras e dos receptores de cAMP de *Dictyostelium* (Schwartz, 1996 e Strader e col., 1995). A única característica estrutural comum entre os membros dessas famílias parece ser a presença de sete hélices transmembranares (Schwartz, 1996).

I.B Transdução de sinal e ativação do receptor

A ligação do agonista ativa o receptor e induz a sua interação com uma proteína G. Proteínas G são formadas por três subunidades, α , β e γ , sendo que a subunidade α contém o sítio de ligação de nucleotídeos de guanina. A interação com o receptor induz uma mudança conformacional na proteína G que leva à troca de GDP por GTP na subunidade α , e à dissociação do heterotrímero em α -GTP e no complexo $\beta\gamma$, que se afastam do receptor. Estas subunidades irão modular a atividade de uma série de enzimas efetoras envolvidas na síntese de segundos mensageiros, tais como adenosina 3',5' monofosfato (cAMP), inositol trifosfato (IP3) e o diacilglicerol (DAG) (Cascieri e col., 1996).

Um modelo usado para interpretar o comportamento farmacológico dos GPCRs propõe que sejam moléculas dinâmicas, em equilíbrio entre uma conformação inativa (R) e outra ativa (R*), capaz de ativar a proteína G. O agonista reconhece e liga-se com maior afinidade à forma ativa do receptor, provocando o deslocamento do equilíbrio de isomerização da forma inativa (R) para a forma ativa (R*) (Lefkowitz e col., 1993). As mutações que induzem ativação constitutiva dos GPCRs, ou seja, aumento da atividade basal do receptor mesmo na ausência do agonista, estabilizam a conformação ativa do receptor (Lefkowitz e col., 1993).

I.C Relação estrutura-função nos GPCRs

Acredita-se que os membros da superfamília dos GPCR possuem a mesma topologia estrutural, dada a homologia entre as sequências. Dados de análises de perfil hidropático mostram que os receptores possuem sete regiões hidrofóbicas, conectadas por porções hidrofílicas. O N-terminal e o C-terminal estão voltados para os meios extracelular e intracelular, respectivamente (Baldwin, 1993). Predições teóricas sugerem que os domínios hidrofóbicos estão na forma de hélices transmembranares, à semelhança do que foi observado para a bacteriorodopsina (Pebay-Peyroula e col., 1997) e para a rodopsina (Schertler e col., 1993).

Schertler e col. (1993) obtiveram um mapa de densidade eletrônica para cristais bidimensionais da rodopsina por microscopia crioelétrica. Esta foi a primeira evidência experimental da existência de sete porções transmembranares na rodopsina, confirmando as predições teóricas. Este estudo mostrou que as sete hélices estão dispostas formando um anel; enquanto algumas hélices estão mais expostas aos lipídios, outras estão mais voltadas para as outras hélices. Um estudo mais recente permitiu identificar com mais exatidão os ângulos entre as hélices e a normal à bicamada, e verificar que a superfície intracelular da rodopsina é mais empacotada do que a superfície extra-celular (Unger e col., 1997).

Informações estruturais derivadas da análise de sequências dos receptores da família da rodopsina permitiram a Baldwin (1993) inferir quais hélices estariam mais voltadas para os lipídios e quais estariam em contato com outras hélices, e posicioná-las nos picos de densidade observados no mapa de densidade eletrônica obtido para os cristais bidimensionais de rodopsina (Schertler e col., 1993) como mostra a Figura 1. Esta proposta para o arranjo das hélices é largamente aceita para a rodopsina, e utilizada em modelos tridimensionais de outros GPCRs da mesma família.

Figura 1. Representação das sete hélices em um diagrama de rodas helicoidais. Tirado de Schwartz, 1996.

Recentemente Baldwin e colaboradores (1997) propuseram um modelo tridimensional para as sete hélices transmembranares dos GPCRs membros da família da rodopsina, com base na análise de um número bem maior de sequências e no mapa de densidade eletrônica de cristais bidimensionais da rodopsina reportado por Unger e col. (1997). Este modelo leva em conta uma estimativa do número de resíduos em cada hélice, e os ângulos de dobramento nas hélices 5 e 6 nas posições de duas prolínas conservadas (Baldwin e col., 1997).

Alinhamentos de sequências de um grande número de GPCRs da família da rodopsina mostram que a maior parte dos resíduos conservados estão nas regiões transmembranares, próximos das porções intracelulares (Baldwin e col., 1997, Paiva e col., 1998).

Nos GPCRs, em geral, o sítio de ligação para as moléculas pequenas, como as aminas biogênicas (adrenalina, acetilcolina, histamina, dopamina, serotonina, etc.), é formado por vários resíduos do núcleo transmembranar, enquanto que o sítio de ligação dos hormônios peptídicos, que são moléculas maiores, constitui-se de pontos de contacto nas alças extra-celulares e/ou no N-terminal e nas porções transmembranares. Os receptores de hormônios glicoprotêicos, como o hormônio luteinizante, possuem o N-terminal bastante extenso, acreditando-se que o sítio de ligação do agonista esteja preferencialmente localizado nessa região (Cascieri e col., 1996, Schwartz, 1996, Xie e col., 1990).

Estudos de receptores quiméricos do hormônio luteinizante (LHR) com o receptor do hormônio folículo estimulante (FSHR) mostraram que interações entre as hélices 5 e 6 são responsáveis por manter o LHR na conformação inativa (Kudo e col.,

1996). Algumas mutações encontradas nessas regiões causam a ativação constitutiva do LHR (Shenker e col., 1993), possivelmente por induzirem uma alteração na posição relativa das hélices 5 e 6.

Estudos biofísicos de marcação de spin sítio dirigida (SDSL) realizados com a rodopsina mostraram evidências de que as hélices transmembranares 3 e 6 movimentam-se uma em relação à outra durante a ativação do receptor por luz (Farrens e col. 1996).

Estas observações contribuíram para consolidar a hipótese de que a transição do receptor da forma inativa para a forma ativa envolve uma alteração da posição relativa das hélices transmembranares, expondo uma superfície então inacessível à proteína G (Wess, 1997, Gether e Kobilka, 1998 e Bourne, 1997). A exposição dessa superfície permitiria a ocorrência de interações específicas entre resíduos da proteína G e do receptor, ao mesmo tempo que interações específicas com o agonista estabilizariam a conformação ativa do receptor.

Estudos com receptores híbridos e com peptídeos sintéticos, capazes de mimetizar ou inibir as interações do receptor com a proteína G, têm indicado que aminoácidos localizados na segunda alça intra-celular, nas extremidades N- e C-terminal da terceira alça intracelular, e no começo do segmento C-terminal são importantes para o reconhecimento da proteína G (Wess, 1997).

Vários GPCRs contêm um segmento rico em resíduos carregados positivamente na porção C-terminal da terceira alça intracelular; estudos de mutação sítio dirigida têm indicado que estes resíduos são importantes para a ativação da proteína G (Wess, 1997 e Schwartz, 1996).

Oliveira e col. (1994) propuseram que a Arg¹²⁶ (essa numeração é da sequência do receptor AT₁ de angiotensina II) possui um papel essencial no mecanismo do acoplamento entre o evento de ligação do agonista e a ativação da proteína G. Este resíduo se localiza na extremidade citosólica da terceira hélice transmembranar, é o único conservado em todos os membros da família da rodopsina.

Uma classe de peptídeos particularmente interessante é a dos mastoparans, que ativam diretamente proteínas G, sendo que essa atividade é maior para proteínas G reconstituídas em vesículas fosfolipídicas do que em detergente (Higashijima e col., 1988). Estudos biofísicos indicam que o mastoparan possui grande afinidade por vesículas fosfolipídicas, e forma uma hélice anfipática ao se ligar à membrana

(Higashijima e col., 1988). Este comportamento levou à hipótese de que, assim como o mastoparan, alças intracelulares de GPCRs exibiriam alta afinidade por membranas fosfolipídicas, e formariam estrutura helicoidal ao se ligarem à membrana.

O fato de que diversos peptídeos derivados das alças intracelulares de GPCRs são capazes de ativar diretamente proteínas G sugere que essas seqüências não estão completamente acessíveis à proteína G na conformação inativa do receptor (Wess, 1997); a conversão da forma inativa para a forma ativa do receptor envolveria a exposição de uma superfície então inacessível à proteína G.

I.D O receptor AT₁ de angiotensina II

O octapeptídeo angiotensina II (DRVYIHPF) é o principal composto ativo do sistema renina-angiotensina, e está envolvido na regulação da pressão arterial e no balanço eletrolítico (Watson e Arkinstall, 1994).

Alguns medicamentos contra hipertensão incluem inibidores da enzima conversora de angiotensina (ACE), que cliva a angiotensina I (DRVYIHPFHL), precursora da angiotensina II, revelando a importância deste hormônio (Timmermans e col., 1991).

Os receptores de angiotensina II pertencem à família da rodopsina. Existem dois tipos de receptores farmacologicamente distintos, AT₁ e AT₂ (Chiu e col., 1989, Bumpus e col., 1991), sendo que o AT₁ é responsável pela maior parte dos efeitos fisiológicos da angiotensina II (Bumpus e col., 1991).

O receptor AT₁ de rato foi clonado em 1991 (Murphy e col., 1991). Posteriormente, descobriram-se duas isoformas; ambas foram classificadas como AT_{1A} e AT_{1B} (Watson e Arkinstall, 1994). Estas isoformas possuem um alto grau de homologia entre as seqüências (95 %) e as mesmas propriedades farmacológicas (Sasamura e col., 1992, Ye e Healy, 1992). A Figura 2 mostra a seqüência primária do receptor AT_{1A} de rato, e a provável localização das porções transmembranares em um modelo serpentina.

Figura 2. Modelo serpentina e sequência primária do receptor AT_{1A} de rato. As porções transmembranares são mostradas em retângulos. Em laranja encontra-se a sequência do peptídeo fEL1. Este modelo está disponível no site do Banco de Dados de GPCRs do EMBL, *G Protein-coupled receptor data base* (<http://www.sander.embl-heidelberg.de/7tm/>).

Hjorth e col. (1994) realizaram estudos de mutações sítio-dirigidas visando determinar os resíduos das porções extracelulares envolvidos na ligação da angiotensina II ao receptor AT₁. Resíduos conservados durante a evolução foram trocados por alanina, concluindo-se que a ligação do hormônio envolve sítios em regiões descontínuas, em especial a Y⁹², na primeira alça extracelular que é essencial para a ligação do hormônio, dois resíduos de ácido aspártico, D²⁷⁸ e D²⁸¹, na parte C-terminal da terceira alça extra-celular, e os resíduos H²⁴, Y²⁶ e I²⁷ no N-terminal do receptor, os quais, quando mutados em conjunto, afetaram drasticamente a afinidade. Ao trocar resíduos da primeira alça extra-celular por outros diferentes, embora quimicamente similares, Hjorth e col (1994) não observaram a ligação da angiotensina II ou de antagonistas (peptídicos ou não peptídicos), sugerindo que a sequência WPXG, que está presente na primeira alça e é conservada em receptores de angiotensina de outras espécies, e em alguns membros distantes da família dos GPCR, poderia ser um segmento

importante para a manutenção da estrutura global dos GPCRs.

A Figura 3 mostra uma visão esquemática do receptor AT₁ visto do lado extra-celular.

Figura 3. Modelo esquemático da estrutura tridimensional do receptor AT₁ de rato visto do lado extra-celular, e mostrando prováveis pontos de contato da angiotensina II. Observa-se em círculos vermelhos a Y⁹² e a T⁸⁸, na primeira alça extra-celular, e o D²⁷⁸ e D²⁸¹, na terceira alça extra-celular. Em azul aparece a Gly¹⁹⁶, próximo à Lys¹⁹⁹ (em vermelho) na quinta hélice transmembranar. Observa-se duas pontes dissulfeto, entre alças 1 e 2, e entre o N-terminal e a terceira alça. Tirado de Costa-Neto, 1997.

Costa-Neto (1997), em seu trabalho de doutoramento, observou que a mutação da Y⁹² por histidina não impede a ligação da angiotensina II, sugerindo que a presença de uma cadeia lateral volumosa nessa posição é importante para a ligação do hormônio.

Yamano e col. (1992) realizaram estudos de mutação sítio-dirigida para determinar a importância de resíduos básicos das porções transmembranares do receptor AT₁ para a ligação da angiotensina II. A troca da K¹⁹⁹, na quinta hélice transmembranar,

por glutamina resultou numa diminuição significativa da ligação do hormônio. Yamano e col. (1995) propuseram, a partir de estudos de mutações sítio-dirigidas e modelagem molecular da interação do hormônio com o receptor, que a K¹⁹⁹ forma uma ponte salina com o ânion carboxilato do C-terminal da angiotensina II; o W²⁵³, da sexta hélice transmembranar, estabilizaria essa interação.

Estudos com peptídeos sintéticos e receptores quiméricos têm sido realizados para investigar o papel das alças intracelulares do receptor AT₁ na ativação da proteína G. Neste sentido, Wang e col. (1995) empregando receptores quiméricos AT₁/AT₂ mostraram que a terceira alça intracelular, em especial os segmentos próximos das hélices transmembranares 5 e 6, são importantes para a ativação da proteína G. Cochon e col. (1997), estudando receptores quiméricos AT₁/α-adrenérgico, AT₁/β-adrenérgico e AT₁/AT₂, também concluíram que a região C-terminal da terceira alça intracelular do receptor AT₁ está envolvida na ativação da proteína G. Shirai e col. (1995), usando peptídeos sintéticos correspondentes aos domínios intracelulares do receptor AT₁ concluíram que o segmento N-terminal da terceira alça intracelular e a porção proximal do C-terminal do receptor estão envolvidos na interação do receptor com a proteína G.

Um modelo para a interação da angiotensina II com o receptor AT₁ foi proposto por Paiva e col. (1998). Neste modelo o posicionamento das coordenadas da angiotensina contra as coordenadas do receptor foi feito de modo que o ânion carboxilato do C-terminal da angiotensina II ficasse próximo da K¹⁹⁹ do receptor, e a R² da angiotensina próxima dos resíduos D²⁷⁸ e D²⁸¹, satisfazendo dessa forma dados de mutações sítio-dirigidas. De acordo com o modelo, a região N-terminal do hormônio faria contatos com resíduos localizados nas porções extra-celulares do receptor, em especial com os resíduos Asp²⁷⁸ e Asp²⁸¹ da terceira alça extra-celular, além dos resíduos His²⁴, Tyr²⁶ e Ile²⁷ no N-terminal do receptor, e Thr⁸⁸, Tyr⁹² e Lys¹⁰² da primeira alça extra-celular. Uma ponte dissulfeto entre a Cys¹⁸, no N-terminal, e a Cys²⁷⁴, na terceira alça extra-celular, contribuiria para estabilizar a angiotensina II. A região C-terminal da angiotensina II faria contatos com cadeias laterais do núcleo hidrofóbico formado pelas hélices transmembranares, envolvendo a Lys¹⁹⁹, na quinta hélice transmembranar, e a Phe²⁵⁹, na sexta hélice transmembranar (Paiva e col., 1998).

Um alinhamento de 1400 seqüências de GPCRs reportado por Paiva e col. (1998) mostrou que o W⁹⁴, a G⁹⁷ e a C¹⁰¹ da primeira alça extra-celular do receptor AT₁ são

conservados em pelo menos 50% das sequências,. A presença da G⁹⁷ faz com que a predição da conformação da região entre o W⁹⁴ e a C¹⁰¹ seja de uma dobra em pelo menos 65% dos GPCRs (Paiva e col., 1998).

I.E O estudo de domínios extra-membranares de GPCRs

Conforme descrito na seção I.C, diversos trabalhos envolvendo mutações sítio-dirigidas, receptores quiméricos e peptídeos sintéticos vêm sendo realizados nas últimas décadas para identificar os resíduos que estão envolvidos na interação entre receptor e agonista e com a proteína G, bem como aqueles que são importantes para a transdução de sinal. Mas, para compreender como ocorre a transdução de sinal ao nível molecular é essencial interpretar essas informações em termos estruturais.

No entanto, a determinação estrutural de proteínas de membrana é uma tarefa complexa. As técnicas empregadas para determinar a estrutura de proteínas globulares com resolução atômica, cristalografia de raios X, e ressonância magnética nuclear (RMN), ainda não podem ser facilmente empregadas para o estudo de proteínas de membrana, apesar dos avanços realizados (Marassi e Opella, 1998, Sakai e Tsukihara, 1998). O emprego de cristalografia de raios-X requer a obtenção de cristais adequados, o que é uma tarefa complexa especialmente em se tratando de proteínas de membrana. Por outro lado, uma das principais razões da dificuldade em aplicar métodos de RMN para o estudo de proteínas de membrana é o movimento lento de proteínas incorporadas em vesículas fosfolipídicas na escala de tempo da RMN, o que diminui a resolução das linhas espectrais. Um problema adicional é que ambos os métodos requerem quantidades consideráveis de amostra, difíceis de obter. Uma abordagem biofísica que tem fornecido importantes informações a respeito das propriedades dinâmicas e estruturais de um GPCR, a rodopsina, é a técnica de marcação de spin sítio-dirigida (SDSL) (Hubbell e col., 1998).

Nesse contexto, outra abordagem biofísica interessante é o estudo conformacional de fragmentos menores dessas proteínas na forma de peptídeos sintéticos. Alguns trabalhos mostram que peptídeos sintéticos derivados de proteínas globulares podem apresentar preferências conformacionais em solução, que são

compatíveis com a estrutura observada na proteína cognata (Dyson e Wright, 1995).

Existem na literatura vários artigos sobre estudos conformacionais de peptídeos correspondentes a regiões transmembranares de proteínas de membrana (Gazit e Shay, 1995, Bechinger e col., 1991, Corbin e col., 1998, Opella e col., 1999), mas poucos trabalhos envolvem as porções extra-membranares (Yeagle e Albert, 1998, Spisni e col., 1996, Shinagawa e col., 1994, Pellegrini e col., 1998 e 1999, Pellegrini e Mierke, 1999, Pertinhez e col., 1998a, Jung e col., 1996). Segue abaixo uma descrição dos trabalhos existentes sobre domínios extra-membranares de GPCRs.

Estudos de CD e/ou ^1H -RMN e simulações de modelagem molecular de fragmentos da segunda (Shinagawa e col., 1994) e terceira (Jung e col., 1995 e Shinagawa e col., 1994) alças intracelulares, e do C-terminal do receptor β -adrenérgico (Jung e col., 1996), mostraram que estes peptídeos não apresentam estrutura secundária em solução, mas adquirem um conteúdo de α -hélice ao interagirem com vesículas fosfolipídicas ou micelas de detergente. Ambos os peptídeos mostraram-se capazes de ativar ou inibir a proteína G (Palm e col., 1989, Münch e col., 1991, Shinagawa e col., 1994).

Estudos conformacionais acerca da terceira alça intracelular do receptor do hormônio da paratireóide (Mierke e col., 1996 e Pellegrini e col., 1997) usando CD, 2D- ^1H -RMN e modelagem molecular indicaram que o peptídeo está desestruturado em solução aquosa, e que forma uma hélice na presença de micelas de SDS (Mierke e col., 1996). O mesmo comportamento foi observado para este peptídeo na forma cíclica (Pellegrini e col., 1997).

Yeagle e colaboradores determinaram a estrutura de todas as alças intracelulares e do segmento C-terminal da rodopsina em solução aquosa, empregando técnicas de 2D- ^1H -RMN e modelagem molecular (Yeagle e Albert, 1998, Yeagle e col., 1997a, 1997b, 1995a e 1995b).

Estes trabalhos mostraram que a primeira e segunda alças intra-celulares da rodopsina apresentam a formação de uma dobra (Yeagle e col., 1997b), enquanto que a terceira alça intracelular forma uma hélice na porção N-terminal (Yeagle e col., 1995a). Observou-se que o C-terminal da rodopsina forma hélice na região que começa no fim da sétima hélice transmembranar, e uma folha β na região que se segue ao sítio de

palmitoilação (Yeagle e col., 1995b). Estudos de CD e 2D-¹H-RMN indicaram que os peptídeos formam um complexo em solução; baseando-se nestes dados Yeagle e col. (1997a) propuseram um modelo para a estrutura citoplasmática da rodopsina (Yeagle e Albert, 1998 e Yeagle e col., 1997a). Esse estudo foi realizado em solução aquosa.

Estudos de RPE, usando o método de SDSL, foram realizados com o C-terminal e as alças intracelulares da rodopsina (Farahbakhsh e col., 1995, Altenbach e col., 1996 e 1999). A estratégia de SDSL requer a construção de um mutante de cisteína, que depois reage com um marcador de spin. Dessa forma é possível introduzir cisteínas marcadas com o grupamento nítróido, e utilizar RPE para obter informações sobre a mobilidade da cadeia lateral, e o grau de acessibilidade ao solvente em posições específicas na proteína completa (Hubbell e col., 1998). Os estudos de SDSL indicaram a presença de uma α -hélice na região proximal do C-terminal da rodopsina, de acordo com a estrutura determinada por Yeagle e col. (1995b).

Quanto às porções extra-celulares, há menos informação do que para as alças intracelulares. Descatam-se os trabalhos sobre o receptor do hormônio da paratireóide (Pellegrini e col., 1998, Rolz e col., 1999), e do receptor da colecistocinina (Pellegrini e Mierke, 1999).

Pellegrini e col. (1998) descreveram a determinação da estrutura de um fragmento do N-terminal do receptor do hormônio da paratireóide, determinada por RMN na presença de micelas de detergente. Ainda sobre esse receptor, Rolz e col. (1999) publicaram um trabalho no qual propoem um modelo do complexo ligante-receptor, baseado em dados espectroscópicos de fragmentos do hormônio e do receptor, e em previsões teóricas.

Pellegrini e Mierke (1999) relataram um estudo por RMN da conformação do fragmento N-terminal do receptor da colecistocinina, do octapeptídeo da colecistocinina e de um complexo entre ambos. Os estudos foram realizados na presença de micelas de dodecilsfosfolina; os resultados mostraram que após a formação do complexo, tanto o fragmento do receptor como do hormônio não sofrem alterações conformacionais significativas. A conformação do hormônio no complexo hormônio-receptor é a mesma observada na forma ligada às micelas, sugerindo que o receptor reconhece o hormônio na forma ligada à membrana (Pellegrini e Mierke, 1999).

I.E.1. A contribuição do laboratório

O enfoque de uma das linhas de pesquisa desenvolvidas em nosso laboratório é obter informações conformacionais e dinâmicas acerca de porções extra-membranares de GPCRs. Utilizando as técnicas espectroscópicas de ressonância magnética nuclear (RMN), dicroísmo circular (CD) e fluorescência é possível obter informações sobre as preferências conformacionais dos fragmentos em solução, e investigar a sua interação com sistemas lipofílicos. O comportamento conformacional do peptídeo nestes sistemas, bem como frente a variações de pH, temperatura e força iônica é relacionado com o seu papel biológico na proteína inteira.

Foram estudados, pelo nosso laboratório, peptídeos correspondentes à região proximal (NIL3, resíduos 213-231), e distal (CIL3, resíduos 227-242) da terceira alça intracelular (Pertinhez e col., 1998, Franzoni e col., 1999) e ao C-terminal (CT, resíduos 300-320) (Pertinhez e col., 1998, Franzoni e col., 1997) do receptor AT₁ de angiotensina II.

Espectros de CD indicaram que a conformação de CT em solução é modulada pela concentração, pH, força iônica, temperatura e TFE. O conteúdo de α -hélice desse peptídeo aumenta com o aumento da concentração, sal, TFE e com a diminuição da temperatura. Agregação foi observada em concentrações acima de 0,8 mM, e em pH ~ 8,0 ou maior. O conteúdo de hélice de NIL3 também aumentou com o aumento do pH e de TFE, e com a diminuição da temperatura. Não se observou agregação de NIL3, em contraste com CT. CIL3 não se mostrou sensível a estas variações do meio, mas TFE induziu a formação de um pequeno conteúdo de hélice (Pertinhez e col., 1998). Estudos de 2D-¹H-RMN destes peptídeos em TFE indicaram a formação de hélices anfipáticas para CT (Franzoni e col., 1997) e NIL3 (Franzoni e col., 1999), e uma volta de hélice em CIL3 (Franzoni e col., 1999).

CT e NIL3 ligam em membranas modelo, com concomitante aumento do conteúdo helicoidal. CT liga melhor do que NIL3, enquanto que CIL3 ligou apenas em micelas negativamente carregadas, e a pH 4,0, indicando que interações eletrostáticas são importantes para o mecanismo de ligação neste caso (Pertinhez e col., 1998).

A modulação da conformação destas alças por diferentes condições do meio demonstra um caráter dinâmico, isso seria importante para a sua atividade biológica.

Estudos realizados por Shirai e col. (1995) mostraram que peptídeos correspondentes a CT e NIL3 são capazes de ativar a proteína G.

Quanto às porções extra-celulares, nosso laboratório apresentou estudos conformacionais de um peptídeo que correspondia à terceira alça extra-celular e ao começo da sétima hélice transmembranar do receptor órfão *mas* (Pertinhez e col., 1995, 1997). Em seu doutorado, Thelma Pertinhez estudou por 2D-¹H-RMN e cálculos de mecânica e dinâmica molecular, a conformação de fragmentos da primeira alça extra-celular do receptor AT₁: os peptídeos *f*EL1, *f*EL1⁺¹ e *f*EL1⁻¹, cujas sequências YRWPFGNHL-NH₂, YRWPFGNHYL-NH₂ e YRPFGNHL-NH₂, respectivamente, começam com a Y⁹² (Figura 2) (Spisni e col., 1996 e Pertinhez e col., 1998a).

A conformação de *f*EL1 e *f*EL1⁻¹ foi obtida em água ácida, enquanto que a conformação de *f*EL1⁺¹ foi obtida em água ácida e em DMSO. Observou-se a formação de uma dobra β envolvendo os resíduos W³P⁴F⁵G⁶ nos peptídeos *f*EL1 e *f*EL1⁺¹. Os dados de RMN sugerem ainda que os peptídeos são bastante flexíveis, apresentando um equilíbrio rápido entre diferentes conformações, e indicam a existência de isomerização *cis-trans* da ligação peptídica entre Trp³ e Pro⁴ para os peptídeos *f*EL1 e *f*EL1⁺¹. Os resultados de RMN estão de acordo com os espectros de CD obtidos em solução aquosa, que indicam a existência de conformações predominantemente estendidas para ambos os peptídeos (Spisni e col., 1996, Pertinhez e col., 1998a, esta dissertação).

Estes dados são uma evidência experimental da presença de uma dobra na primeira alça extra-celular de um GPCR, no caso o AT_{1A}, conforme predito por Paiva e col. (1998).

I.F Objetivos

Dentro da linha de pesquisa do laboratório, a proposta deste trabalho consiste em estudar as propriedades conformacionais do peptídeo *fEL1* em solução aquosa, em função do pH e da temperatura, em trifluoroetanol (TFE), na presença de interfaces (micelas e bicamadas), por espectroscopia de dicroísmo circular (CD) e fluorescência, e tentar relacionar o comportamento conformacional do peptídeo com o seu papel biológico na proteína inteira.

Utilizaram-se micelas dos detergentes dodecil sulfato de sódio (SDS), negativo, *N*-hexadecil-*N,N*-dimetil-3-amônio-1-propano sulfonato (HPS) e 1-palmitoil-2-hidroxi-fosfatidilcolina (liso-PC), zwitteriônicos, além de vesículas grandes unilamelares de 1-palmitoil-2-oleoil fosfatidilcolina (POPC), zwitteriônica, pura ou em mistura com o ácido 1-palmitoil-2-oleoil fosfatídico (POPA), carregado negativamente.

A fluorescência pode informar sobre o microambiente experimentado pelo fluoróforo intrínseco, o Trp³, que foi utilizado como sonda para estudar os efeitos de alteração do meio (pH, solvente orgânico), bem como a interação do peptídeo com os agregados anfífilos. A espectroscopia de dicroísmo circular foi empregada para investigar as preferências conformacionais do peptídeo *fEL1* em solução em função dos diversos parâmetros físico-químicos, bem como para investigar mudanças conformacionais induzidas pela interação com os agregados anfífilos.

Foi ainda empregada calorimetria de titulação para estimar a constante de ligação do peptídeo a bicamadas lipídicas.

II. Materiais e métodos

II.A Materiais

II.A.1 O peptídeo *fEL1*

O peptídeo *fEL1*, contendo a sequência YRWPFGNHL-NH₂, foi sintetizado no laboratório do prof. Clóvis R. Nakaie, do Departamento de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo, por síntese em fase sólida, empregando a estratégia BOC (Merrifield, 1986).

O peptídeo é estocado liofilizado a -20 °C. Todas as soluções do peptídeo foram preparadas a partir da diluição de uma solução estoque de concentração conhecida, guardada congelada a -20 °C. A concentração da solução estoque foi determinada por espectrofotometria, assumindo-se $\epsilon_{280} = \epsilon_Y + \epsilon_W = 6800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Utilizou-se, em todos os experimentos, tampão fosfato-borato-citrato (PBC) 5 mM em cada componente, preparado com água Milli-Q. O pH da solução tampão foi acertado com HCl e NaOH.

II.A.2 Reagentes

Os fosfolípidios POPC e POPA, e o detergente liso-PC são da Avanti Polar Lipids. O clorofórmio, de grau analítico, é da Merck. A acrilamida (99,9 % de pureza) é da Bio-Rad. O detergente HPS (Sigma) foi recristalizado de acetona e metanol. O detergente SDS é da Sigma. A Figura 4 mostra as estruturas dos fosfolípidios POPC e POPA, e dos detergentes SDS, HPS e liso-PC.

Utilizaram-se marcadores de spin fosfolipídicos 1-palmitoil-2-estearoil (5-doxil) fosfatidilcolina (5-PCSL, Figura 5a), e 1-palmitoil-2-estearoil (12-doxil) fosfatidilcolina (12-PCSL, Figura 5b), ambos da Avanti Polar Lipids, o ácido graxo ácido 5-doxil-esteárico (5-SASL), o éster metílico do ácido 5-doxil-esteárico (5-MeSL), e o marcador derivado de um hidrocarboneto alifático 10-doxil-nonadecano (10N19), da Sigma. Além destes empregaram-se também marcadores contendo o grupamento paramagnético 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-N-oxil (tempo): o éster tempo-nonanoato (TN) e o detergente iodeto de 4-(N,N-dimetil-N-hexadecil) amônio-tempo (CAT16) da Molecular

Probes. As estruturas dos marcadores 5-SASL, 5-MeSL, 10N19, CAT16 e TN são mostradas na Figura 6.

Figura 4. Estruturas de POPC (a), POPA (b), liso-PC (c), HPS (d) e SDS (e).

Figura 5. Estrutura dos marcadores de spin 5-PCSL (a) e 12-PCSL (b).

Figura 6. Estruturas de 5-MeSL (a), 5-SASL (b), TN (c), CAT16 (d) e 10N19 (e).

II.B. Fundamentos das técnicas utilizadas

II.B.1 Dicroísmo circular (CD)

Moléculas ópticamente ativas, que possuem centros assimétricos, apresentam a propriedade de absorver diferentemente a luz circularmente polarizada para a esquerda e para a direita. Este fenômeno é conhecido por dicroísmo circular (Figura 7).

O equipamento de CD é um espectropolarímetro capaz de detectar essa diferença de absorção (ΔA) entre os feixes após passarem pela amostra. A unidade mais frequentemente utilizada é a elipticidade, θ , que é proporcional a ΔA : $\theta = 32,98 \Delta A$ (Woody, 1996).

Figura 7. Ilustração esquemática do fenômeno de dicroísmo circular.

Os espectros de CD são extremamente sensíveis à conformação das moléculas. No caso de proteínas e peptídeos os espectros obtidos na região do UV distante (185 a 260 nm) resultam principalmente da absorção do grupamento amida da ligação peptídica. Em um peptídeo ou proteína os cromóforos amida interagem entre si, de forma que a estrutura tridimensional do esqueleto peptídico irá afetar a estrutura eletrônica da molécula, e portanto, o seu espectro óptico. Dessa forma elementos de estrutura secundária regular irão apresentar espectros de CD característicos. A

Figura 8 mostra os espectros de CD da poli-L-lisina em α -hélice, folha β pregueada e ao acaso (Greenfield e Fasman, 1969); estes espectros podem ser considerados típicos destes elementos de estrutura secundária.

Figura 8. Espectros de CD da poli(Lis) nas conformações em α -hélice (α), folha β pregueada (β) e “ao acaso” (r). Tirado de Greenfield e Fasman, 1969.

No entanto, a análise da estrutura secundária presente em peptídeos e proteínas a partir de espectros de CD pode vir a ser uma tarefa complexa. Cálculos teóricos e estudos experimentais têm indicado que o espectro de CD de uma α -hélice depende do seu comprimento, e dos ângulos ψ e ϕ do esqueleto peptídico (Greenfield e Fasman, 1969, Manning e col., 1988); outros estudos mostraram que estruturas β apresentam diferentes espectros (Greenfield e Fasman, 1969, Manning e col., 1988). Grande variação também foi observada para os espectros de CD de dobras β ; duas classes de dobra possuem espectros que se assemelham aos de uma folha- β ou uma α -hélice (Woody, 1996).

Espectros de CD de proteínas obtidos na região de 250 a 300 nm resultam da contribuição dos resíduos aromáticos e pontes dissulfeto, e são informativos sobre a estrutura terciária das proteínas. Vale lembrar que resíduos aromáticos também apresentam CD na região do UV distante (Mulkerrin, 1996).

Informações sobre o conteúdo de estrutura secundária em uma proteína podem ser obtidas através da análise quantitativa dos espectros de CD. Essa análise é feita através de programas de decomposição espectral. A partir de uma comparação entre o

espectro experimental e uma base de espectros de proteínas cujas estruturas secundárias são conhecidas, os algoritmos estimam o peso com o qual cada tipo de estrutura secundária contribui para o espectro observado. Os resultados derivados do uso destes programas dependem bastante da base de dados adotada (Mulkerrin, 1996).

II.B.2 Fluorescência

A espectroscopia de fluorescência é uma técnica que detecta o espectro da radiação fluorescente emitida por uma molécula quando esta retorna do estado excitado para o estado fundamental.

A absorção de luz por uma molécula induz uma transição eletrônica do estado fundamental S_0 até algum nível vibracional dos estados eletrônicos excitados S_1 ou S_2 , conforme ilustra o diagrama de Jablonski (Figura 9), e ocorre em um intervalo de tempo da ordem de 10^{-15} s (Lakowicz, 1983).

Figura 9. Diagrama de Jablonski. Tirado de Lakowicz, 1983.

O processo que se segue à absorção do fóton é a relaxação do sistema até o nível vibracional fundamental do primeiro estado eletrônico excitado S_1 , através de processos de dissipação interna. Este fenômeno chama-se conversão interna, e ocorre em um intervalo de tempo da ordem de 10^{-12} s (Cantor e Shimmel, 1980).

O diagrama de Jablonski (Figura 9) mostra que uma molécula excitada pode decair do nível vibracional fundamental do estado eletrônico S_1 para algum nível

vibracional do estado eletrônico S_0 através de diversos processos. A emissão de fluorescência ocorre quando esta transição envolve a emissão de um fóton. Esta transição é permitida pela regra de conservação do spin, pois ocorre entre dois estados de spin de mesma multiplicidade. Na fluorescência o tempo de vida do estado excitado geralmente é da ordem de 10^{-7} a 10^{-9} s (Cantor e Shimmel, 1980).

O espectro de emissão é sempre deslocado para o vermelho em relação ao espectro de absorção, pois devido ao processo de conversão interna a radiação emitida pelo fluoróforo será sempre de energia menor do que a radiação absorvida (Lakowicz, 1983). Este fenômeno é conhecido por deslocamento de Stokes.

Conforme o diagrama de Jablonski (Figura 9), estados excitados também podem decair até o estado fundamental através de processos não radioativos, tais como cruzamento inter-sistemas, quando a molécula passa do estado singlete S_1 para o estado triplete T_1 , reações fotoquímicas do estado excitado, e colisões com moléculas do solvente.

A transição radioativa do estado triplete T_1 para o estado singlete S_0 é conhecida como fosforescência (Cantor e Shimmel, 1980). Esta transição é proibida pela regra de conservação do spin, por isso o tempo de vida do estado excitado T_1 será relativamente longo, muito maior do que os tempos de vida encontrados em fluorescência.

A fração de moléculas no estado singlete excitado que retorna ao estado fundamental através da emissão de fluorescência é dada pelo rendimento quântico de fluorescência (ϕ_F), que é determinado pela razão entre as constantes de velocidades de decaimento por fluorescência e a somatória das constantes de velocidade de decaimento por todos os processos, radioativos e não radioativos, conforme demonstra a equação abaixo:

$$\phi_F = \frac{k_F}{k_F + \sum k_{nr}} \quad (1)$$

onde k_F é a constante de velocidade de decaimento por fluorescência, e $\sum k_{nr}$ é a somatória das constantes de velocidade dos processos de decaimento não radioativos.

Os parâmetros de fluorescência: comprimento de onda máximo de emissão (λ_{max}), rendimento quântico (ϕ_F) e tempo de vida do estado excitado (τ_F), podem ser afetados pelo ambiente em que o fluoróforo se encontra. Interações entre o fluoróforo e

moléculas do solvente podem contribuir para estabilizar o estado excitado, ou o estado fundamental. Assim, mudanças de propriedades do solvente, tais como constante dielétrica e capacidade de participar em pontes de hidrogênio podem alterar a energia da transição. A velocidade de decaimento por processos não radioativos também pode depender do solvente e, conseqüentemente, parâmetros como o tempo de vida e o rendimento quântico serão influenciados. Essas propriedades são características de cada fluoróforo, e podem ser empregadas para o estudo do microambiente em que ele se encontra.

II.B.2.a Fluorescência das proteínas

Em proteínas a fluorescência deve-se aos três aminoácidos aromáticos: triptofano, tirosina e fenilalanina.

A fenilalanina possui um rendimento quântico bem menor do que os outros dois, e seu espectro de emissão é mais difícil de ser observado.

A fluorescência do triptofano é extremamente útil no estudo de conformação das proteínas, pois o seu espectro de emissão é dependente da polaridade do meio: em solução aquosa o espectro do triptofano possui λ_{max} em torno de 350 nm, no entanto, em um ambiente menos polar o λ_{max} é deslocado para o azul; este deslocamento é acompanhado por um aumento significativo da intensidade de fluorescência.

O espectro de emissão da tirosina possui λ_{max} em 303 nm, porém a posição do λ_{max} não é deslocada em função da polaridade do meio, apenas a intensidade de emissão aumenta com a diminuição da polaridade (Lakowicz, 1983).

II.B.2.b Supressão da fluorescência

Supressão de fluorescência é um processo que leva à diminuição da intensidade de fluorescência. Existem dois mecanismos básicos pelos quais ocorre a supressão: o mecanismo colisional e o mecanismo estático.

O mecanismo colisional envolve choques entre moléculas do fluoróforo no estado excitado e moléculas do supressor, resultando na perda de energia e desativação do fluoróforo. Neste processo a molécula do supressor precisa difundir até o fluoróforo durante o tempo de vida do estado excitado, e colidir com ele de forma eficiente. A

variação da intensidade de fluorescência e do tempo de vida do estado excitado com a concentração de supressor ($[Q]$) obedecem à equação de Stern-Volmer:

$$\frac{F}{F_0} = \frac{\tau}{\tau_0} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q] \quad (2)$$

onde F , τ e F_0 , τ_0 são a intensidade de fluorescência e o tempo de vida do estado excitado, na presença e na ausência do supressor, respectivamente, e k_q é constante cinética de supressão de pseudo primeira ordem.

O termo $k_q \tau_0$ pode ser englobado na constante K_{sv} , conhecida por constante de Stern-Volmer. Informações sobre microambiente do fluoróforo podem ser obtidas através de medidas de K_{sv} .

O mecanismo estático envolve a formação de um complexo entre o supressor e o fluoróforo, e diferencia-se do mecanismo colisional pelo fato de que o tempo de vida do estado excitado não varia com a concentração de supressor.

Muitos agentes supressores agem via uma combinação dos dois mecanismos.

II.B.2.c Supressão da fluorescência do triptofano

Neste trabalho foram utilizados dois agentes supressores do triptofano: a acrilamida, que é um agente supressor solúvel no meio aquoso, e marcadores de spin fosfolipídicos, que agem como supressores de fluorescência na membrana. Os marcadores de spin empregados foram: 5-PCSL (Figura 5a), e o 12-PCSL (Figura 5b).

O mecanismo de supressão da fluorescência do triptofano por acrilamida é colisional, e foi bem caracterizado por Eftink e Ghiron (1976).

O mecanismo de supressão de fluorescência na membrana por um marcador de spin fosfolipídico foi discutido inicialmente por London e Feigenson (1981), que calcularam, usando o modelo da esfera de ação, como sendo 11 Å o raio de ação dos marcadores de spin na bicamada para a supressão da fluorescência do octil éster do triptofano.

Posteriormente, Chattopadhyay e London (1987) mostraram que a eficiência de supressão do triptofano por um marcador de spin na bicamada é dependente da distância entre fluoróforo e supressor, e também da concentração de supressor na membrana. Estes autores desenvolveram um método para determinar a profundidade de um dado

fluoróforo na bicamada através da comparação entre a eficiência de supressão deste fluoróforo por dois marcadores de spin, localizados em planos diferentes da bicamada lipídica (Chattopadhyay e London, 1987). Evidentemente, como as moléculas na bicamada não são imóveis, trata-se de uma localização média.

II.B.2.d Anisotropia de fluorescência

A radiação emitida por um fluoróforo é polarizada paralelamente à direção do momento de transição (Rohatgi-Mukherjee, 1978). Assim, ao incidir luz linearmente polarizada sobre uma amostra de moléculas fluorescentes em um meio isotrópico, que tombam rapidamente na escala de tempo da fluorescência, a luz emitida será totalmente despolarizada. Mas se o sistema apresentar um certo grau de anisotropia, ou imobilização, a luz emitida será apenas parcialmente despolarizada.

A anisotropia de fluorescência é um parâmetro que mede a extensão da despolarização de uma radiação polarizada incidente sobre o sistema em estudo, e pode ser empregada para medir o grau de liberdade de movimento rotacional de um fluoróforo.

A medida experimental da anisotropia de fluorescência envolve a utilização de dois polarizadores. O primeiro deles é utilizado para polarizar a luz de excitação verticalmente em relação às coordenadas do laboratório, e o segundo para detectar a radiação emitida pelo fluoróforo em duas orientações: paralela ao plano da luz de excitação (I_{VV}) e perpendicular a ele (I_{VH}).

É necessário medir, também, um fator de correção (G) devido à sensibilidade do sistema de detecção à luz polarizada (Lakowicz, 1983). Este fator de correção é dado pela razão entre as intensidades da luz emitida e polarizada paralela (i_{HH}) e perpendicularmente (i_{HV}) ao plano de polarização da luz incidente, que neste caso foi polarizada horizontalmente em relação às coordenadas do laboratório.

Dessa forma a expressão que foi empregada para calcular a anisotropia de fluorescência (r) é dada por (Lakowicz, 1983):

$$r = \frac{I_{IV} - GI_{VH}}{I_{IV} + 2I_{VH}}, (3)$$

onde $G = \frac{i_{HV}}{i_{HH}}$.

É interessante notar que a luz emitida não polarizada irá apresentar a mesma intensidade qualquer que seja a polarização ($I_{VV} = I_{VH}$), e neste caso r será igual a zero. Conforme já mencionado, esse efeito ocorre quando o fluoróforo possui grande liberdade de movimento rotacional, o que ocasiona a despolarização da radiação emitida. À medida em que a mobilidade rotacional do fluoróforo torna-se mais restrita, as duas intensidades, I_{VV} e I_{VH} , tornam-se diferentes, e o valor de r aumenta.

II.B.3 Ressonância paramagnética eletrônica¹

O elétron possui um momento angular de spin responsável pelo seu momento magnético. Na presença de um campo magnético o momento magnético do spin eletrônico alinha-se em relação ao campo de forma quantizada, podendo adotar dois estados de energias diferentes (o chamado efeito Zeeman).

O número de estados varia com o número quântico de spin da partícula. Esta multiplicidade de estados obedece à distribuição $2S + 1$, onde S é o número quântico de spin ($S = \sum_i^n s_i$, onde i é o número de elétrons desemparelhados). O número quântico de spin do elétron, s , é igual a $\frac{1}{2}$, logo a multiplicidade para uma espécie contendo um elétron desemparelhado será 2 e o momento magnético de spin (m_s) terá duas orientações possíveis em relação ao campo magnético aplicado: uma paralela ($m_s = -\frac{1}{2}$, menor energia), e outra antiparalela ($m_s = +\frac{1}{2}$, maior energia).

A transição entre os dois estados de spin do elétron somente será possível quando a frequência da radiação aplicada for suficiente para satisfazer a condição de ressonância: $\Delta E = h\nu = g\beta B_0$, onde g é o fator de interação do elétron com o campo magnético, B_0 é o campo magnético aplicado, e β é uma constante conhecida como magneton de Bohr.

A técnica de RPE detecta a absorção de energia, na faixa de microondas,

¹ Baseado em Berliner, 1976, Schreier e col., 1978 e Schreier, 1979.

envolvida na transição entre dois estados de spin de uma molécula na presença de um campo magnético externo. Por questões técnicas o aparelho de RPE utiliza um comprimento de onda fixo para a microonda e varre as diferentes energias de ressonância variando o campo magnético. O espectro é adquirido na forma da primeira derivada do espectro de absorção.

II.B.3.a O método do marcador de spin

Somente átomos ou moléculas com pelo menos um elétron desemparelhado apresentam S diferente de zero, e portanto, apresentam sinal de EPR. Como a maioria dos compostos de interesse biológico é diamagnética, ou seja, não possui elétrons desemparelhados, foi desenvolvido por Ohnishi e McConnell (1965) o método do marcador de spin, que consiste na introdução de um grupamento paramagnético no sistema a ser estudado. Em geral esse grupamento é o nitróxido, N-O, e a molécula que o contém pode ser ligada ao sistema em estudo através de ligação covalente ou apenas por intercalação física. Em geral, marcadores de spin são ligados covalentemente a proteínas e ácidos nucleicos. No caso de membranas e micelas, os marcadores são intercalados fisicamente nos agregados.

Marcadores de spin contendo o nitróxido como grupo paramagnético são largamente utilizados para investigar a estrutura e organização de membranas biológicas, pois os espectros do marcador são sensíveis ao grau de mobilidade e de organização do meio em que se encontram. Além disso, o grupamento nitróxido é bastante estável frente a variações de solvente, pH e temperatura.

II.B.3.b O espectro de RPE de nitróxidos

Quando o spin do elétron interage com o spin nuclear (I) de um núcleo próximo ocorre a interação hiperfina e aparece a estrutura hiperfina no espectro. No caso do ^{14}N do grupo nitróxido ($I = 1$), a multiplicidade do spin nuclear será $2I + 1 = 3$, correspondente às três possíveis orientações do momento magnético de spin nuclear (m_I) em relação ao campo magnético aplicado. Desse modo, cada nível de energia do momento magnético de spin do elétron (m_s) será desdobrado em três devido à interação hiperfina (Figura 10).

No caso do nitróxido, em que a maior parte da densidade eletrônica do elétron desemparelhado localiza-se no ^{14}N , a estrutura hiperfina é observada através de 3 linhas no espectro de EPR, uma vez que as transições permitidas correspondem a $\Delta m_s = 1$ e $\Delta m_I = 0$ (setas na Figura 10).

Figura 10. Níveis de energia do elétron desemparelhado do grupo nitróxido (N-O) num campo magnético: (a) sem considerar a interação hiperfina. Os níveis de energia correspondem a $m_s = +1/2$ (energia maior) e $-1/2$ (energia menor); e (b) desdobramento dos níveis de energia devido à interação do momento magnético do spin do elétron com o spin nuclear do nitrogênio ($m_I = +1, 0, -1$) (interação hiperfina). O espectro obtido apresenta três linhas, correspondentes a $m_I = +1$ (campo baixo), 0 (campo médio) e -1 (campo alto). As linhas espectrais correspondem às transições permitidas, ou seja, $\Delta m_s = 1$ e $\Delta m_I = 0$. As transições estão indicadas pelas setas na Figura.

II.B.3.c O efeito da mobilidade do marcador sobre o espectro de RPE do nitróxido

A escala de tempo do fenômeno de RPE, da ordem de 10^{-9} segundos, é da mesma ordem de grandeza da escala de tempo dos movimentos rotacionais ou translacionais das moléculas. Por isso, a largura de linha dos espectros de RPE é sensível à velocidade de movimento do marcador. As linhas são mais estreitas se o movimento é rápido, e mais largas quando o movimento é mais lento (Freed e Fraenkel, 1963). Quando o

alargamento das linhas é devido às propriedades de mobilidade do sistema, esse alargamento ocorre de forma diferencial. No caso ideal (uma molécula esférica em um meio isotrópico), a 9 GHz, quanto menor a mobilidade, ocorre alargamento diferencial das linhas espectrais, na ordem: linha de campo alto > linha de campo baixo > linha de campo central.

Quando o marcador de spin se encontra num sistema orientado, como bicamadas ou micelas, o grau de ordem também é refletido no espectro. Alguns marcadores de spin, como o 5-SASL apresentam extremos externos e internos (ver Figura 28) a partir dos quais é possível calcular um parâmetro de ordem. A separação entre os extremos externos corresponde à população de marcadores orientados com seu eixo longo molecular preferencialmente paralelo ao campo magnético, e é denotada por $2A_{||}$, enquanto que a separação entre os extremos internos corresponde à população de marcadores orientados com seu eixo longo molecular preferencialmente perpendicular ao campo magnético e é denotada por $2A_{\perp}$. Quando o espectro não apresenta extremos externos e internos, a forma e largura das linhas espectrais refletem ao mesmo tempo a contribuição tanto da ordem como da mobilidade de um marcador em um sistema organizado. Nesses casos costuma-se calcular um parâmetro, a relação h_{+1}/h_0 (altura da linha de campo baixo/altura da linha de campo central) e ele é empregado para avaliar a contribuição de ambos os efeitos. Nesse caso, costuma-se dizer que h_{+1}/h_0 reflete o grau de organização do sistema. Quanto menor h_{+1}/h_0 , maior o grau de organização (Schreier e col., 1984).

II.B.4 Calorimetria de titulação

A técnica de calorimetria permite medir a troca de calor que ocorre em processos físicos ou químicos. A interação peptídeo-membrana pode ser interpretada como uma partição do peptídeo entre duas fases: a água (fase polar), e a membrana (fase apolar). Esse processo de partição envolve ganho ou perda de calor, que pode ser medido por calorimetria.

Seelig (1997) desenvolveu dois métodos para calcular ΔH de ligação de peptídeos a vesículas lipídicas a partir de calorimetria de titulação: (i) titulando-se

peptídeo em uma solução concentrada de vesículas, (ii) titulando-se vesículas em uma solução de peptídeo.

O segundo método possui a vantagem de permitir obter também a isoterma de ligação, através da qual pode-se calcular uma constante de ligação do peptídeo às vesículas.

Neste trabalho, optou-se pelo segundo método.

II.C Métodos

II.C.1 Preparação das soluções estoque de fosfolipídio, marcador de spin e detergente

Soluções estoque de fosfolipídio foram preparadas em clorofórmio. A concentração das soluções estoque de POPC e POPA foi determinada através de dosagem de fosfato inorgânico de acordo com Roussier e col. (1970), após hidrólise dos fosfolipídios com ácido perclórico 70 % por 2 hs a 180°C. As soluções foram guardadas a -20 °C.

As soluções estoque de marcador de spin foram preparadas em clorofórmio e guardadas a -80°C. A concentração foi determinada a partir da dupla integral do espectro de RPE. Como padrão de concentração de marcador de spin utilizou-se o espectro de 4-hidroxi-tempo (tempol) em água.

As soluções estoque de SDS, HPS e de liso-PC foram preparadas dissolvendo-se uma massa conhecida do detergente em volume adequado de tampão PBC. Foi preciso aquecer levemente as soluções dos detergentes zwitterionicos para conseguir a dissolução total.

A concentração micelar crítica (cmc) do SDS em água é 8 mM (Mukerjee e Mysels, 1971). A cmc do HPS em tampão PBC (5 mM em cada componente), 3×10^{-6} M, foi determinada em nosso laboratório por medidas de tensão superficial, e a cmc da liso-PC em água é da ordem de $3,3 \times 10^{-6}$ a $8,3 \times 10^{-6}$ M (Marsh, 1990).

II.C.2 Preparação das vesículas de POPC:POPA com e sem marcador de spin

Os filmes lipídicos foram preparados adicionando-se alíquotas dos estoques em clorofórmio de POPC ou de POPC e POPA num tubo de ensaio, e evaporando-se o solvente sob fluxo de nitrogênio. Em seguida os filmes permaneceram sob vácuo por pelo menos duas horas. O filme foi ressuspense em solução tampão de PBC, formando uma suspensão de lipossomos multilamelares. As soluções de lipossomos foram extrudadas para obter vesículas unilamelares, utilizando-se duas membranas Nucleopore de poros de 0,1 μm de diâmetro, em um extrusor Liposofast-Basic (Avestin, Inc.).

Nos experimentos com POPC:POPA foi empregada a proporção molar 1:1 ou 9:1; nos experimentos de supressão de fluorescência, 10% em moles de POPC foram substituídos por 5-PCSL ou 12-PCSL.

As vesículas contendo marcador de spin foram preparadas e extrudadas da mesma forma, sendo que o marcador foi adicionado a partir de uma solução estoque em clorofórmio no momento de preparação do filme.

II.C.3 Espectros de CD

Os espectros de CD foram obtidos no espectropolarímetro Jobin-Yvon modelo CD6, utilizando celas de caminho óptico de 0,5 ou 1 mm. Os espectros adquiridos foram médias de três varreduras de 195 a 260 nm, com resolução de 0,5 nm, e tempo de integração de 1, 3 ou 5 segundos.

Para o experimento de titulação com SDS, alíquotas de uma solução estoque 0,1 ou 0,2 M de SDS foram adicionadas a 1 ml de solução de 5×10^{-5} M de fEL1 no pH 4,0 ou 9,0. Dessa amostra retirava-se uma alíquota para a obtenção dos espectros, usando cela de 1 mm de caminho óptico, tempo de integração de 1 segundo e fazendo a média de três varreduras.

Para os experimentos com vesículas fosfolipídicas de POPC ou 1:1 (mol:mol) POPC:POPA empregaram-se sempre vesículas extrudadas de acordo com o procedimento descrito acima.

II.C.4 Medidas de fluorescência

Os experimentos de fluorescência foram feitos em um espectrofluorímetro Hitachi, modelo F4500, com cubetas de caminho óptico de 1, 0,5 ou 0,2 cm na direção de incidência do feixe de excitação, e 1 cm na direção de detecção do feixe de emissão; e fendas de excitação e de emissão de 5,0 nm.

II.C.4.a Experimentos de titulação com vesículas de POPC:POPA

Os experimentos de titulação de solução de fEL1 com vesículas de POPC:POPA na proporção molar 1:1 ou 9:1 foram sempre realizados em duplicata. Adicionaram-se alíquotas de 1 ou 2 µl de uma solução 5, 10 ou 20 mM de vesículas extrudadas a 400 µl de uma solução de peptídeo na própria cubeta de fluorescência. Os espectros de fluorescência foram adquiridos utilizando-se λ_{exc} 295 nm e fendas de 5 nm; os respectivos brancos (referência) foram subtraídos de todos os espectros. Adquiriu-se também o espectro de absorção das amostras contra um branco que continha apenas a solução tampão. Utilizou-se um sistema de termostatização da cubeta por circulação de água a 30 ± 3 ° C.

Procurou-se corrigir (F_{cor}) a contribuição do espalhamento de luz sobre os valores de intensidade de fluorescência (F) lidos nos espectros. Para isso utilizou-se a seguinte equação (Lakowicz, 1983):

$$F_{cor} = Fe^{A_{exc}b_{exc}^{2,3}}e^{A_{em}b_{em}^{2,3}} \quad (4)$$

onde A_{exc} é a absorbância da amostra em 295 nm medida em uma cubeta de 1 cm de caminho óptico; b_{exc} é a distância percorrida pelo feixe de luz de excitação até o centro da cubeta (0,1 cm); A_{em} é a absorbância da amostra lida no comprimento de onda de emissão; b_{em} é a distância que a luz percorre na solução a partir do centro da cubeta (0,5 cm).

A equação 4 parte da hipótese de que as moléculas que estão absorvendo e emitindo fótons encontram-se em um volume pequeno no centro da cubeta. Como a intensidade de luz emitida é proporcional à intensidade de luz absorvida, é preciso estimar a fração de luz que é perdida por espalhamento antes de atingir o fluoróforo, e após a emissão, antes de atingir o detetor.

II.C.4.b Experimentos de titulação com detergente para cálculo de constantes de ligação (K_b)

Aliquotas de 1 μ l de uma solução estoque 0,05 M de liso-PC ou HPS foram adicionadas à cubeta de fluorescência contendo 400 μ l de uma solução 6 μ M de *JEL1* em tampão PBC no pH desejado. Os espectros foram obtidos utilizando-se $\lambda_{exc} = 295$ nm e fendas de 5 nm. O espectro do respectivo branco (referência) foi subtraído de todos os espectros. Utilizou-se um sistema de termostatização da cubeta por circulação de água a aproximadamente $30 \pm 3^\circ$ C. O experimento foi realizado em duplicata.

II.C.4.c Experimentos de supressão de fluorescência com acrilamida

Aliquotas de 2 a 14 μ l de uma solução 6 M de acrilamida foram adicionadas a 400 μ l de solução 1×10^{-5} M ou 3×10^{-5} M de *JEL1* na própria cubeta de fluorescência, em ausência ou presença de SDS, HPS e 1:1 POPC:POPA. Utilizou-se λ_{exc} 295 nm, e varreu-se o espectro de emissão entre 300 e 400 nm.

II.C.4.d Experimentos de supressão de fluorescência com marcadores de spin

As amostras foram preparadas em triplicata. Misturaram-se 6 μ l de uma solução estoque 3×10^{-4} M de *JEL1*, em tampão PBC 5mM em pH 4, a alíquotas de 300 μ l de uma solução 0,7 mM de vesículas extrudadas contendo 50 mol% de POPC, 40 mol% de POPA e aproximadamente 10 mol% de marcador de spin fosfolipídico em um tubo *ependorf*. O pH foi ajustado com NaOH quando necessário. A concentração final de *JEL1* foi 6 μ M. Os espectros de fluorescência foram obtidos utilizando-se λ_{exc} 295 nm, e o espectro de emissão foi obtido entre 300 e 450 nm. Subtraíram-se os espectros dos respectivos brancos de todos os espectros.

A concentração de marcador de spin foi calculada a partir da dupla integral do espectro de RPE das amostras após as medidas de fluorescência. Utilizou-se o espectro do tempol como padrão de concentração de marcador de spin. Os valores de concentração de marcador reportados são uma média obtida a partir de dois ou três espectros da mesma amostra, pois foi observada uma variação de reprodutibilidade do aparelho de aproximadamente 10 % do valor das integrais.

II.C.4.e Experimentos de variação do pH de amostras de fEL1 em presença de micelas de detergente

Alíquotas 50 μl de uma solução estoque de fEL1 foram diluídas a 0,8 ml com uma solução de SDS, HPS ou liso-PC 0,02 M. As soluções de detergente foram preparadas pesando-se a quantidade desejada do detergente, e dissolvendo-se em tampão PBC pH 3,1. A concentração final de fEL1 foi 1×10^{-5} M. As amostras com ou sem detergente foram tituladas com NaOH 1 M na própria cubeta de fluorescência, e acompanhou-se a variação do espectro de fluorescência do triptofano. Os espectros foram obtidos com λ_{exc} 280 e 295 nm, e fendas de 5 nm. Todos os espectros foram subtraídos do respectivo branco (referência).

II.C.5. Experimentos de titulação calorimétrica

Utilizou-se um calorímetro de titulação isotérmica da Thermometric, no laboratório do prof. Watson Loh, do Instituto de Química da Unicamp. Os experimentos de calorimetria foram realizados em conjunto com Rodrigo Cardoso da Silva, aluno de doutoramento do prof. Loh.

Foram utilizados dois canais ao mesmo tempo, de forma que realizaram-se duas titulações simultâneas: vesículas no tampão (referência) e vesículas em presença de peptídeo. Os experimentos foram realizados a 25 °C.

As celas, de aço, foram preenchidas com 800 μl de solução tampão, no caso da titulação de vesículas no tampão, ou com solução de fEL1 em tampão PBC, no caso da titulação de vesículas em presença de peptídeo. Os experimentos foram realizados nos pHs 4,0, 7,6 e 9,0.

O equipamento é equipado com um dispositivo automático permitindo injetar alíquotas de 10 μl de vesículas nas duas celas simultaneamente. As soluções nas celas foram mantidas sob agitação constante.

Os picos correspondentes à quantidade de calor envolvida em cada adição foram integrados utilizando-se o software do próprio aparelho.

Para obter os valores de calor de ligação do peptídeo às vesículas, subtraiu-se o

calor médio de diluição das vesículas no tampão do calor envolvido na adição de peptídeo às vesículas.

II.C.6 Preparação de amostras de HPS e Liso-PC contendo marcadores de spin, e obtenção dos espectros de RPE

Amostras de liso-PC foram preparadas a partir de solução estoque em clorofórmio:metanol (1:1, v:v), e dos marcadores em clorofórmio. Foram preparados filmes dos marcadores com liso-PC, de acordo com o procedimento descrito anteriormente para preparar os filmes lipídicos. As amostras foram preparadas ressuspensando-se os filmes em tampão PBC 5 mM, pH 7,4, de forma que a concentração final de liso-PC fosse 6 mM.

As amostras de HPS foram preparadas ressuspensando-se filmes dos marcadores, obtidos a partir da evaporação de soluções estoque em clorofórmio, em uma solução de HPS 6 mM, em tampão PBC 5 mM, pH 7,4.

Em todas as amostras a concentração de marcador foi de 1,5 mol%.

Os espectros de RPE foram adquiridos em um equipamento Bruker, modelo ER083CS, com amplitude modulação de 1 Gauss e potência de 20,17 mW para todos os espectros. Para as amostras de HPS utilizou-se tempo total de varredura de 167,77 s, e constante de tempo de 327,68 ms, exceto com TN, quando se utilizou constante de tempo de 163,84 ms. Para as amostras de liso-PC utilizou-se tempo total de varredura de 167,77 s e constante de tempo de 163,84 ms, exceto com 10N19 em que o tempo total de varredura foi de 335, 54 s, e a constante de tempo 327,68 ms. O ganho variou de $5,02 \times 10^4$ a 2×10^5 .

III. Resultados

III.A Estudos de dicroísmo circular

III.A.1 Estudos do peptídeo fEL1 em solução aquosa, em função do pH, da temperatura e na presença de TFE

Os espectros de CD do peptídeo fEL1 obtidos em solução aquosa, nos pHs 4,0, 7,5 e 9,0, e na presença de TFE, um solvente conhecido por induzir a formação de estrutura secundária em peptídeos (Nelson e Kallenbach, 1986), são mostrados na Figura 11. Estes espectros são característicos de uma estrutura ao acaso, em equilíbrio entre diversas populações conformacionais. Pode-se notar que a intensidade da banda positiva na região de 220-230 nm diminui com o aumento do pH. Efeitos espectrais nessa região costumam ser atribuídos a resíduos aromáticos (Mulkerrin, 1996). Observa-se que a adição de TFE induz uma redistribuição de populações conformacionais (Figura 11), porém, mesmo na presença desse solvente o espectro não é característico de α -hélice.

Não se observou variação dos espectros com a concentração de peptídeo na faixa de 3×10^{-5} a 1×10^{-4} M (dados não mostrados), indicando que ele não está agregado nestas condições.

A Figura 12 mostra o efeito da temperatura sobre o espectro de CD de fEL1 em solução aquosa, no pH 4,0. Observa-se que $[\theta]$ em 226 nm, que corresponde ao centro da banda devida a resíduos aromáticos, diminui com o aumento da temperatura (Figura 12), evidenciando o caráter dinâmico do peptídeo.

Figura 11. Espectros de CD do peptídeo *fEL1* em solução, nos pHs 4,0, 7,5 e 9,0, e em TFE:PBC pH 4,0 9:1 (v/v). [*fEL1*] = 6×10^{-5} M.

Figura 12. Efeito da temperatura sobre o espectro de CD do peptídeo *fEL1* em solução, a pH 4,0 (a). Variação de $[\theta]$ em 226 nm com a temperatura (b). [*fEL1*] = 3×10^{-5} M.

III.A.2 Estudos da interação de fEL1 com micelas de detergente e vesículas fosfolipídicas

Para investigar a interação de fEL1 com micelas de detergente foram obtidos espectros de CD do peptídeo na presença de HPS e liso-PC, detergentes zwitteriônicos, e de SDS, carregado negativamente, nos pHs 4 e 9. A Figura 13 apresenta os espectros obtidos nos dois pHs.

Figura 13. Espectros de CD do peptídeo fEL1 em solução e na presença de 0.1 M de SDS e HPS, e 0,030 M de liso-PC nos pHs 4,0 (a) e 9,0 (b). $[fEL1] = 5,3 \times 10^{-5} \text{ M}$.

As alterações espectrais observadas na presença das micelas nos pHs 4,0 e 9,0, em relação aos espectros de *f*EL1 em solução aquosa, indicam que o peptídeo interagiu com os agregados, e adquiriu estrutura secundária como consequência da ligação. Os espectros são diferentes para detergente, indicando que o peptídeo adquire conformação diferente na presença de cada tipo de micela.

Espectros de CD obtidos com concentrações variadas de SDS, nos pHs 4,0 e 9,0 (Figura 14), indicaram que *f*EL1 liga-se ao SDS em concentrações abaixo da cmc, que é 0,008 M em água (Mukerjee e Mysels, 1971), nos pHs 4,0 e 9,0.

Figura 14. Espectros de CD de *fEL1* em solução aquosa e na presença de concentrações crescentes de SDS nos pHs 4,0 (a) e 9,0 (b). $[fEL1] = 5\text{-}6 \times 10^{-5} \text{ M}$.

III.A.3 Estudos da interação de *fEL1* com vesículas fosfolipídicas

Para investigar a interação de *fEL1* com bicamadas fosfolipídicas foram obtidos espectros de CD na presença de vesículas de POPC e vesículas mistas de 1:1 POPC:POPA, nos pHs 4,0, 7,5 e 9,0. Os espectros são bastante semelhantes nos três pHs, de forma que a Figura 15 apresenta apenas aqueles obtidos no pH 4,0.

Figura 15. Espectros de CD do peptídeo *fEL1* em solução e na presença de 3 mM de POPC e 1 mM de 1:1 POPC:POPA, no pH 4,0. $[fEL1] = 6 \times 10^{-5}$ M em tampão, 4×10^{-5} M em 1:1 POPC:POPA, e 2×10^{-5} M em POPC.

Da mesma forma que na presença de detergente (Figura 13), as alterações espectrais observadas na presença de 1:1 POPC:POPA (Figura 15) indicam que o peptídeo interagiu com as vesículas e adquiriu estrutura secundária em consequência da ligação. Não se observaram alterações significativas do espectro de CD na presença de vesículas de POPC (Figura 15), sugerindo que o peptídeo não se ligou a estes agregados nas condições do

experimento.

III.B Estudos de fluorescência

III.B.1 Estudo da interação do peptídeo fEL1 com micelas de detergente e bicamadas fosfolipídicas

O espectro de fluorescência do peptídeo fEL1 em solução aquosa (Figura 16) apresenta λ_{max} em aproximadamente 349 nm; este valor é característico do triptofano em um ambiente de polaridade próxima à da água, e está de acordo com uma estrutura flexível para o peptídeo, como indicam os espectros de CD (Figura 11).

A Tabela 1 contém os valores de λ_{max} e de F_{max} encontrados para o peptídeo fEL1 em solução aquosa, na presença de micelas de SDS, HPS e liso-PC, e de vesículas de POPC:POPA (1:1) e POPC, nos pHs 4,0, 7,5 e 9,0.

Para ilustrar os efeitos da adição de micelas de detergente e vesículas fosfolipídicas sobre os espectros de fluorescência de fEL1, a Figura 16 apresenta os espectros obtidos na presença de micelas de SDS, HPS e liso-PC, no pH 7,5, enquanto que a Figura 17 apresenta os espectros obtidos na presença de vesículas de 1:1 POPC:POPA, e de POPC no pH 4,0.

Tabela 1: $\lambda_{\max}$ de fluorescência e intensidade relativa de fluorescência ($F/F_{\min}$, onde F é intensidade de fluorescência na presença de anfifílico, e $F_{\min}$ na ausência de anfifílico) para o peptídeo $fEL1$ em solução, na presença de vesículas de POPC, 1:1 POPC:POPA, e de micelas de SDS, HPS e liso-PC. $[fEL1] = 1 \cdot 10^{-5}$ M (em água e em micelas) e $2 \cdot 10^{-5}$ M (vesículas), $[SDS] = [HPS] = [liso-PC] = 0,02$ M, $[POPC] = [POPC:POPA] = 1$ mM. $\lambda_{exc} = 280$ nm.

$fEL1$ em	$\lambda_{\max}$ (nm)	$F/F_{\min}$ (u.a.)
Tampão		
pH 4,0	348	1
pH 7,4	349	1
pH 9,0	349	1
POPC:POPA		
pH 4,0	332	1,5
pH 7,4	335	1,6
pH 9,0	333	1,5
POPC		
pH 4,0	347	0,7
pH 7,4	348	0,9
pH 9,0	349	0,7
SDS		
pH 4,0	334	0,49
pH 7,4	334	0,54
pH 9,0	335	0,75
HPS		
pH 4,0	336	3,9
pH 7,4	336	3,8
pH 9,0	337	3,7
liso PC		
pH 4,0	334	1,4
pH 7,4	333	1,5
pH 9,0	333	1,7

Figura 16. Espectros de fluorescência de 6×10^{-6} M de fEL1 em solução aquosa e na presença de 0,02 M de SDS, HPS e liso-PC, no pH 7,5. $\lambda_{\text{exc}} = 280$ nm.

Figura 17. Espectros de fluorescência de 2×10^{-5} M fEL1 na ausência e na presença de 0,5 mM de POPC e 1:1 POPC:POPA, no pH 4,0. $\lambda_{\text{exc}} = 280$ nm.

Os dados da Tabela 1 e da Figura 16 mostram que, na presença de micelas de HPS e liso-PC há um deslocamento para o azul do espectro de fluorescência do Trp³ acompanhado de um aumento da intensidade de fluorescência. Este comportamento é característico do triptofano ao passar para um ambiente menos polar, e indica que o peptídeo interagiu com os agregados. Na presença de SDS também observa-se um deslocamento para o azul do espectro de emissão do Trp³, indicando que o peptídeo ligou-se às micelas, porém esse efeito é acompanhado de uma diminuição da fluorescência (Tabela 1, Figura 16). O efeito de supressão de fluorescência do triptofano por SDS já foi observado na literatura, e também para outros peptídeos no laboratório.

Na presença de vesículas mistas de 1:1 (mol:mol) POPC:POPA também observa-se o deslocamento do espectro do triptofano para o azul, com concomitante aumento da intensidade de fluorescência (Tabela 1, Figura 17). Esse efeito não é observado na presença de vesículas zwitterionicas de POPC, nos pHs 4,0, 7,5 e 9,0, mas ocorre uma pequena diminuição da intensidade de fluorescência, que pode ser atribuída ao espalhamento de luz promovido pelas vesículas. Este comportamento está de acordo com resultados de CD (Figura 15), e indica que o peptídeo interagiu com as vesículas de POPC:POPA, mas provavelmente não interagiu com as vesículas de POPC nas condições do experimento, sugerindo que interações eletrostáticas são importantes para o mecanismo de ligação do peptídeo à bicamada.

A Figura 18 mostra que a ligação do peptídeo às vesículas pode ser acompanhada pelo aumento da intensidade de fluorescência de fEL1 com a concentração de lipídio total. Este experimento mostra que fEL1 liga-se melhor a vesículas de 1:1 (mol:mol) POPC:POPA do que a 9:1 (mol:mol) POPC:POPA.

Figura 18. Variação da intensidade de fluorescência de *fEL1* com a concentração de POPC:POPA nas proporções 1:1 (●) e 9:1 (○) no pH 7,5. $[fEL1] = 1 \times 10^{-5}$ M, $\lambda_{exc} = 295$ nm, $\lambda_{em} = 332$ nm (em 1:1 POPC:POPA) ou 336 nm (em 9:1 POPC:POPA). F e F_{min} são a intensidade de fluorescência observada na presença e na ausência de fosfolípido, respectivamente.

III.B.2 Estudo da interação de *fEL1* com micelas de detergente e bicamadas fosfolipídicas através de medidas de anisotropia de fluorescência

Medidas da anisotropia de fluorescência do Trp³ foram realizadas em solução aquosa, e na presença de micelas de SDS, HPS e de vesículas de 1:1 (mol:mol) POPC:POPA. A Tabela 2 apresenta os valores obtidos nestes sistemas. Os valores de anisotropia foram calculados usando a equação 3 (ver materiais e métodos).

Tabela 2: Valores de anisotropia de fluorescência do peptídeo *fEL1* (r) em solução e na presença de 0,1 M de SDS e HPS, nos pHs 4,0 e 9,0, e de 1 mM de 1:1 (mol:mol) POPC:POPA. $[fEL1] = 1 \times 10^{-5}$ M em tampão e na presença de vesículas, e $2-3 \times 10^{-5}$ M na presença das micelas. $\lambda_{exc} = 295$ nm, $\lambda_{em} = 349$ nm (em tampão), 338 nm (em SDS e HPS) ou 332 nm (em POPC:POPA). Em solução e em vesículas os valores de r são médias de duas ou três medidas independentes, em micelas os valores referem-se a uma medida.

<i>fEL1</i> em:	r
Tampão	
pH 4,0	$0,033 \pm 0,012$
pH 7,5	$0,020 \pm 0,002$
pH 9,0	$0,021 \pm 0,004$
SDS	
pH 4,0	0,091
pH 9,0	0,087
HPS	
pH 4,0	0,082
pH 9,0	0,079
POPC:POPA	
pH 4,0	$0,075 \pm 0,001$
pH 7,5	$0,074 \pm 0,002$
pH 9,0	$0,072 \pm 0,006$

Os valores de anisotropia de fluorescência do Trp³ obtidos para o peptídeo *fEL1* em solução aquosa nos diferentes pHs (Tabela 2) são 4 ou 6 vezes maiores do que foi observado para uma mistura de 1:1 (mol:mol) N-acetil-triptofanamida e N-acetil-tirosinamida em solução aquosa no pH 7,5 ($r = 0,005$), indicando que a introdução do triptofano em uma cadeia peptídica diminui a sua liberdade de movimento rotacional.

Observa-se (Tabela 2) que os valores de anisotropia do Trp³ aumentam entre duas e quatro vezes na presença das micelas de detergente e das vesículas fosfolipídicas, em todos

os pHs estudados, indicando que o peptídeo ligou-se aos agregados, tornando-se mais imobilizado.

III.B.3 Estudo do efeito do pH sobre o espectro de fluorescência do peptídeo fEL1 em solução aquosa, e na presença de micelas de SDS, HPS e liso-PC

Estudos dos espectros de fluorescência de fEL1 em função do pH foram realizados na presença de SDS, HPS e liso-PC com o objetivo de tentar detectar alguma alteração de pKa de grupos ionizáveis do peptídeo na presença das micelas. A Figura 19 mostra o resultado da variação da fluorescência com o pH em solução aquosa, e na presença de micelas de SDS, HPS e liso-PC.

Figura 19. Variação da fluorescência de fEL1 com o pH, em solução (*) e na presença de 0,02 M de HPS (○), liso-PC (□) e SDS (Δ). $[fEL1] = 1 \times 10^{-5}$ M. $\lambda_{exc} = 280$ nm, e $\lambda_{em} = 349$ nm (tampão), 334 nm (liso-PC), 337 nm (SDS e HPS).

Observa-se (Figura 19) que há uma dependência da fluorescência de *fEL1* com o pH, tanto em solução aquosa como na presença de micelas de detergente, sugerindo que está ocorrendo a ionização de grupos ionizáveis no peptídeo. Os grupos que podem sofrer ionização são: Tyr¹, Arg² e His⁶, e o grupo amino-terminal. Não foi observado estabilização da fluorescência formando um patamar em pHs altos.

Em solução aquosa (Figura 19) nota-se uma variação pouco significativa da intensidade de fluorescência entre os pHs 3,1 e 8,5, mas entre os pHs 8,5 e 12,0 há um decréscimo acentuado de $F_{\max}$, que deve estar associado à ionização da Tyr¹, Arg² e/ou do amino-terminal. Não se observou estabilização da fluorescência em um patamar até pH 12,0, sugerindo que um resíduo com pKa elevado está sendo titulado nessa região.

Na presença de SDS, liso-PC e HPS o comportamento da fluorescência em função do pH é diferente do observado em solução aquosa (Figura 19), indicando que ocorreram alterações nos pKas dos grupos ionizáveis do peptídeo devido à interação com as diferentes micelas. Diferentemente do que se observou na presença dos outros detergentes, em SDS ocorreu um aumento da intensidade de fluorescência entre os pHs 7,0 e 10,0, e uma diminuição entre pHs 10,0 e 13,0.

*III.B.4 Estudos da interação de *fEL1* com micelas e bicamadas através de medidas do grau de acessibilidade do triptofano a um supressor aquoso*

É importante obter informações sobre a topologia do peptídeo *fEL1* nas micelas e na bicamada. Uma forma de abordar essa questão é através de medidas do grau de acessibilidade do Trp³ a um agente supressor aquoso, acrilamida. A Figura 20 compara os gráficos de Stern Volmer para a supressão de fluorescência do peptídeo *fEL1* na presença de vesículas de 1:1 POPC:POPA, e micelas de SDS e HPS no pH 4,0.

A Tabela 3 apresenta os valores de K_{sv} obtidos para a supressão da fluorescência de *fEL1* por acrilamida em solução aquosa e na presença de 1:1 POPC:POPA, SDS e HPS nos pHs 4,0, 7,5 e 9,0, em vesículas, e 4,0 e 9,0 em micelas.

Figura 20. Gráficos de Stern Volmer mostrando a supressão da fluorescência do peptídeo fEL1 por acrilamida em solução aquosa (*) e na presença de 0,1 M de SDS (Δ) e HPS (o), ou 0,7 mM de 1:1 POPC:POPA (•) no pH 4,0. $[fEL1] = 3 \times 10^{-5} \text{ M}$ em SDS e HPS; $[fEL1] = 1 \times 10^{-5} \text{ M}$ em solução aquosa e 1:1 POPC:POPA. $\lambda_{\text{exc}} = 295 \text{ nm}$. F e F_0 são a intensidade de fluorescência medida na presença e na ausência de supressor, respectivamente.

Tabela 3. Valores das constantes de Stern Volmer (K_{sv}) para a supressão da fluorescência de fEL1 por acrilamida em solução aquosa e na presença de 0,6 mM 1:1 POPC:POPA^a, nos pHs 4,0, 7,5 e 9,0, ou na presença de 0,1 M de SDS e HPS nos pHs 4,0 e 9,0. $\lambda_{exc} = 295$ nm. $[fEL1] = 1 \times 10^{-5}$ M na presença das vesículas e em solução aquosa, e 3×10^{-5} M na presença das micelas.

fEL1 em:				
pH	Solução aquosa	POPC:POPA	SDS	HPS
4,0	$9,5 \pm 0,3$	$1,5 \pm 0,3$	7,3	6,7
7,5	8,8	$1,9 \pm 0,1$		
9,0	$11,6 \pm 3,1$	$2,1 \pm 0,6$	6,5	8,1

^a [POPC:POPA] = 1,2 mM no pH 7,5.

Não se observaram variações significativas de K_{sv} com a concentração de fEL1 em solução aquosa, na faixa de 1 a 3×10^{-5} M.

Comparando-se os dados obtidos em solução aquosa com aqueles obtidos na presença dos agregados, vê-se que na presença de 1:1 POPC:POPA o Trp³ está menos exposto à acrilamida, indicando a inserção do peptídeo na bicamada.

Na presença das micelas de HPS e SDS o Trp³ é pouco menos acessível à acrilamida do que em solução aquosa, indicando uma localização mais superficial do peptídeo nestes agregados, e/ou partição da acrilamida na fase hidrofóbica das micelas.

III.B.5 Estudos da localização do triptofano na bicamada através de medidas de supressão de fluorescência por marcadores de spin fosfolipídicos

Para estudar a localização do Trp³ na bicamada empregou-se o método de supressão de fluorescência por marcadores de spin. Foram utilizados fosfolipídios marcados com o grupo doxil nos carbonos 5 e 12 da cadeia alifática de ácido esteárico (posição *sn*-2 do fosfolipídio).

A Tabela 4 apresenta valores de intensidade de fluorescência do peptídeo fEL1 na presença de POPC:POPA sem ou com aproximadamente 10 mol% de marcador.

Tabela 4: Intensidade (F_0 , F) e supressão de fluorescência (F/F_0) de fEL1 6 μ M na presença de POPC:POPA^a com e sem marcador de spin. $\lambda_{exc} = 295$ nm, $\lambda_{em} = 332$ nm. F_0 e F são a intensidade de fluorescência na ausência e na presença de supressor, respectivamente.

pH	Controle	5-PCSL ^b		12-PCSL ^c	
	F_0 (u.a.)	F (u.a.)	F/F_0	F (u.a.)	F/F_0
4,0	246 $\pm$ 18	175 $\pm$ 2	0,71 $\pm$ 0,06	165 $\pm$ 5	0,67 $\pm$ 0,07
7,4	262 $\pm$ 20	199 $\pm$ 8	0,77 $\pm$ 0,09	182 $\pm$ 4	0,70 $\pm$ 0,07
9,0	249 $\pm$ 15	163 $\pm$ 12	0,66 $\pm$ 0,09	177 $\pm$ 9	0,71 $\pm$ 0,08

^a[POPC:POPA] = 0,7 mM, contendo aproximadamente de 40 mol % (POPC), 50 mol% (POPA) e 10 mol % (PCSL), ou 1:1 POPC:POPA no caso das amostras controle. ^b [5-PCSL] = 63 μ M, ^c [12-PCSL] = 71 μ M.

Estes resultados mostram que 20 a 35 % da fluorescência do peptídeo é suprimida por marcadores de spin fosfolipídicos, indicando que o Trp³ está imerso na região das cadeias acila da bicamada.

III.B.6 Determinação das constantes de ligação (K_b) do peptídeo fEL1 a micelas de HPS, liso-PC e vesículas de POPC:POPA

Para obter informações quantitativas sobre a afinidade do peptídeo pelos sistemas anfílicos estudados, procurou-se determinar as constantes de ligação do peptídeo aos diversos agregados através de experimentos de fluorescência.

Experimentos de titulação de fEL1 com micelas de SDS, em que se acompanhou o aumento de estrutura secundária do peptídeo, mostraram que fEL1 liga-se ao SDS em concentrações abaixo da cmc (Figura 14). Por essa razão não se determinou a constante de ligação de fEL1 a micelas de SDS.

Experimentos de titulação do peptídeo fEL1 com HPS, liso-PC e vesículas de 1:1 POPC:POPA, em que se acompanhou o aumento da intensidade de fluorescência do Trp³ com a concentração de anfílico total, foram realizados para se obter a constante de ligação do peptídeo aos agregados. Este estudo foi realizado em diferentes pHs, 4,0, 7,4 e 9,0, a fim de verificar o efeito da carga do peptídeo sobre a afinidade pelos agregados anfílicos.

A Figura 21 mostra o resultado obtido para micelas de HPS, enquanto que a Figura 22 apresenta o resultado do mesmo experimento para liso-PC, e a Figura 23 para 1:1 POPC:POPA. Observa-se que a intensidade de fluorescência aumenta com a concentração de anfílico, até estabilizar em um patamar, que corresponde à situação de saturação do equilíbrio de ligação.

Figura 21. Variação da intensidade de fluorescência de *fEL1* 6 μM com a concentração de HPS nos pHs 4,0 (o), 7,4 (*) e 9,0 (●). $\lambda_{\text{exc}} = 295\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 337\text{ nm}$. Cada ponto representa a média de duas medidas independentes.

Figura 22. Variação da intensidade de fluorescência de *fEL1* 6 μM com a concentração de liso-PC nos pHs 4,0 (o), 7,4 (*) e 9,0 (●). $\lambda_{\text{exc}} = 295\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 335\text{ nm}$. Cada ponto representa a média de duas medidas independentes, exceto para a curva obtida em pH 7,4, que corresponde a apenas uma medida.

Figura 23. Variação da intensidade de fluorescência de *fEL1* 6 μM com a concentração de vesículas mistas de POPC:POPA 1:1 (mol:mol) nos pHs 4,0 (o), 7,4 (*) e 9,0 (●). $\lambda_{\text{exc}} = 295\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 332\text{ nm}$. Cada ponto representa a média de duas medidas independentes.

A ligação do peptídeo aos agregados anfífilicos pode ser interpretada como um equilíbrio de associação em que uma molécula de peptídeo liga-se a uma molécula de fosfolípido ou detergente:

onde P representa o peptídeo e L o fosfolípido ou detergente. Neste caso a isoterma de ligação apresenta comportamento hiperbólico e K_b é dada por:

$$K_b = \frac{[PL]}{[P][L]}, \quad (6)$$

onde $[P]$ e $[L]$ representam as concentrações das formas livres do peptídeo e do composto anfílico, respectivamente; e $[PL]$ a concentração da forma ligada do peptídeo e do lipídio.

Nota-se que K_b não é uma constante de ligação absoluta, pois a equação 6 supõe um equilíbrio simples de uma molécula de peptídeo para uma de anfílico, ou seja, uma estequiometria de 1:1, e isso pode não ser correto. Em vista disso, a constante é chamada de

constante aparente.

K_b foi calculada a partir das isotermas de ligação linearizadas empregando-se a equação abaixo²:

$$\frac{F_{\min}}{F - F_{\min}} = \frac{1}{\frac{F_{\max}}{F_{\min}} - 1} \frac{1}{K_b} \frac{1}{[L]} + \frac{1}{\frac{F_{\max}}{F_{\min}} - 1} \quad (7)$$

onde F é a intensidade de fluorescência observada; $F_{\max}$ é a intensidade de fluorescência no patamar da curva de titulação; $F_{\min}$ é a intensidade de fluorescência na ausência de anfifílico; e $[L]$ é a concentração de anfifílico.

A relação coeficiente linear/coeficiente angular das isotermas de ligação linearizadas fornece o valor de K_b . A Figura 24 ilustra os gráficos das isotermas de ligação linearizadas.

K_b ainda foi calculada através do ajuste das isotermas de ligação a uma hipérbole, representada pela equação abaixo:

$$F - F_{\min} = \frac{(F_{\max} - F_{\min})[L]}{\frac{1}{K_b} + [L]}, \quad (8)$$

Este ajuste foi feito empregando-se o programa “Enzkin”, sendo que o tratamento estatístico usado pelo programa foi descrito por Wilkinson (1961).

A Tabela 5 apresenta os resultados do cálculo de K_b a partir das curvas da Figura 21 a Figura 23.

² Esta equação é a forma linearizada de uma equação apresentada por Costa e col., 1997.

Tabela 5: Constantes de ligação (K_b) de fEL1 a micelas de HPS e liso-PC e a vesículas de 1:1 (mol:mol) POPC:POPA nos pHs 4,0, 7,4 e 9,0. $\lambda_{\text{exc}} = 295$ nm, e $\lambda_{\text{em}} = 337$ nm (HPS), 335 nm (Liso-PC) ou 332 nm (POPC:POPA). Os valores representam médias de dois experimentos, e foram calculados através da linearização das isotermas de ligação (Equação 7), ou empregando-se o programa “Enzkin” para fazer o ajuste dos dados experimentais a uma hipérbole (Equação 8).

$K_b \times 10^3 \text{ (M}^{-1}\text{)}$						
pH	HPS		liso-PC		POPC:POPA	
	Linearização	Enzkin	Linearização	Enzkin	Linearização	Enzkin
4,0	$0,8 \pm 0,2$	$0,8 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,6$	$2,4 \pm 0,3$	$8,1 \pm 1,4$	$7,8 \pm 0,9$
7,4	$2,4 \pm 0,4$	$2,1 \pm 0,1$	$1,9 \pm 0,1$	$2,4 \pm 0,3$	$7,9 \pm 1,3$	$11,1 \pm 1,3$
9,0	$0,8 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,2$	$2,8 \pm 0,4$	$7,4 \pm 0,3$	$9,4 \pm 1,2$

Figura 24. Linearização das isotermas de ligação de fEL1 a HPS (a), liso-PC (b) e 1:1 (mol:mol) POPC:POPA (c), nos pHs 4,0 (o), 7,4 (*) e 9,0 (•). $[fEL1] = 6 \times 10^{-6} M$, $\lambda_{exc} = 295 nm$, $\lambda_{em} = 337 nm$ (em HPS), $335 nm$ (em liso-PC) e $332 nm$ (em POPC:POPA).

III.C. Estudo da interação de *fEL1* com vesículas de 1:1 POPC:POPA por calorimetria de titulação

Com o objetivo de obter informações sobre a termodinâmica da interação de *fEL1* com vesículas fosfolipídicas, e também para medir a constante de ligação do peptídeo às vesículas através de uma segunda metodologia, foram realizados experimentos de calorimetria de titulação.

Realizaram-se titulações de *fEL1* 0,1 mM nos pHs 4,0, 7,6 e 9,0 com 30 mM (para pHs 4,0 e 7,6) e 60 mM (para pH 9,0) de POPC:POPA 1:1 (mol:mol). Não se observou variação de calor durante as titulações realizadas nos pHs 4,0 e 9,0, embora a relação lipídio/peptídeo empregada fosse a mesma, em pH 4,0, e o dobro, em pH 9,0, daquela empregada a pH 7,6. Portanto, segue abaixo somente uma descrição dos resultados obtidos em pH 7,6.

A Figura 25 e a Figura 26 apresentam o comportamento do fluxo de calor (em μW) com o tempo, para duas titulações: 0,8 ml de *fEL1* 0,1 mM em tampão PBC, pH 7,6, titulados com alíquotas de solução de vesículas de POPC:POPA 1:1 (mol:mol) (Figura 25); e 0,8 ml de tampão PBC titulados com a mesma solução de vesículas (Figura 26). Cada pico corresponde a uma injeção de solução de vesículas. A integral dos picos nas figuras corresponde ao calor liberado em cada adição, em μJ .

Observa-se que a adição de vesículas sobre o peptídeo se constitui num processo exotérmico ($\Delta H < 0$). Este resultado está de acordo com o que vem sendo observado para a interação de peptídeos carregados positivamente com vesículas contendo carga negativa (Seelig, 1997).

A diluição de vesículas no tampão também é um processo exotérmico, mas os valores medidos do calor liberado são pequenos e apresentam bastante flutuação (Figura 26), o que provavelmente ocorre porque eles são próximos do limite de sensibilidade do equipamento.

Observa-se (Figura 25) que a quantidade de calor liberado na ligação de *fEL1* a

POPC:POPA 1:1 (mol:mol) diminui com a adição de vesículas. Este comportamento mostra que há menos moléculas de peptídeo disponíveis para a ligação após cada adição, até uma situação em que a quantidade de calor é muito pequena para ser mensurável. Nessa condição considera-se que o equilíbrio de ligação atingiu a saturação (Seelig, 1997).

Figura 25. Titulação calorimétrica de 0,8 ml de uma solução de fEL1 0,1 mM com alíquotas de 10 μl de vesículas de POPC:POPA 1:1 (mol:mol), pH 7,6, 25 °C. Solução estoque de [POPC:POPA] = 30 mM. A quantidade de calor (Q) liberada em cada adição é mostrada ao lado de cada pico em μJ . Após os 200 minutos, não se observou picos de liberação de calor.

Figura 26. Controle do experimento de titulação calorimétrica. Adição de alíquotas de 10 μl de vesículas de POPC:POPA 1:1 (mol:mol) a 0,8 ml do tampão, pH 7,6, 25 °C, em ausência de peptídeo. Solução estoque de [POPC:POPA] = 30 mM. A quantidade de calor (Q) liberada em cada adição é mostrada ao lado de cada pico em μJ .

O calor devido somente à interação peptídeo-vesícula em cada adição foi calculado como sendo a quantidade de calor envolvida na adição de vesículas à solução de peptídeo, menos o calor médio de diluição das vesículas no tampão. Considerou-se para esse cálculo um valor médio do calor de diluição das vesículas no tampão de - 77,9 μJ , correspondente à média das adições de número 2 a 5 na Figura 26.

A entalpia de ligação do peptídeo às vesículas, ΔH , pode ser calculada através de (Seelig, 1997):

$$\Delta H = \frac{\sum \Delta Q}{n_p} \quad (9)$$

onde $\sum \Delta Q$ representa o calor acumulado ($Q_{\text{acumulado}}$) ao final de todas as injeções, e n_p , o número de moles de peptídeo na cela do calorímetro.

O valor de ΔH de ligação do peptídeo fEL1 a vesículas de POPC:POPA 1:1 (mol:mol), calculado através da expressão acima, é de aproximadamente -8 kcal/mol. Este número é da mesma ordem de grandeza de valores medidos para outros peptídeos carregados (Seelig, 1997).

É possível calcular a fração de peptídeo ligada à membrana (X_p) em cada adição (Seelig, 1997) a partir dos dados de $Q_{\text{acumulado}}$, aplicando-se:

$$X_p = \frac{n_p^i}{n_p} = \frac{\sum_i \Delta Q_i}{\sum \Delta Q}, \quad (10)$$

onde n_p^i é o número de mols de peptídeo ligado até uma determinada adição, e n_p o número de mols de peptídeo total, e $\sum_i \Delta Q_i$ é a quantidade de calor acumulado liberada até essa adição, e $\sum \Delta Q$ é o calor acumulado envolvido na ligação de toda a quantidade de peptídeo conforme definido acima.

De acordo com a expressão acima, a fração de peptídeo ligada é proporcional à razão entre a quantidade acumulada de calor liberado em cada adição e a quantidade de calor total envolvida no processo. A variação de X_p com a concentração de lipídio total, e de $Q_{\text{acumulado}}$, em função do número de adições é apresentada na Figura 27.

Conhecendo-se a fração de peptídeo ligada a cada concentração de vesículas, é possível determinar a constante aparente de ligação (K_b). Supondo que o comportamento de X_p vs. [lipídio] é uma hipérbole, e que a estequiometria de ligação é de uma molécula de peptídeo para uma de fosfolipídio (equação 5), K_b é dada pelo inverso da concentração de lipídio necessária para atingir $X_p = 0,5$. Neste caso, K_b para a ligação de fEL1 a vesículas de POPC:POPA 1:1 (mol:mol) em pH 7,6 é $1,8 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$. Esse valor é menor do que aquele que foi obtido por fluorescência ($K_b = 7,9 \pm 1,3 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ ou $11,1 \pm 1,3 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, Tabela 5).

Figura 27. Titulação calorimétrica de fEL1, pH 7,6, com vesículas de POPC:POPA 1:1 (mol:mol). (a) calor de reação acumulado em cada injeção ($\sum_i \Delta Q_i$) em função do número de injeções. (b) variação da fração de peptídeo ligado (X_p) com a concentração de lipídio total. [fEL1] = 0,1 mM; [POPC:POPA] = 30 mM na solução estoque. Utilizou-se o valor médio de -77,9 μJ como sendo o calor de diluição das vesículas no tampão.

III.D Estudos da organização de micelas de liso-PC e HPS por RPE

Estudos de CD (Figura 13) mostraram, até o momento, que o peptídeo β EL1 adquire conformações diferentes em liso-PC e em HPS. Estudos de fluorescência (Tabela 5) mostraram que β EL1 liga com diferentes afinidades nessas micelas, dependendo do pH. A fim de examinar se essas diferenças eram devidas às características organizacionais das micelas zwitteriônicas de HPS e liso-PC, foram obtidos espectros de RPE (Figura 28) de marcadores de spin contendo o grupo nitróxido, paramagnético, na região das cabeças polares (TN, 10N19 e CAT16) e das cadeias carbônicas (5-SASL e 5-MeSL) das micelas.

Observa-se que nos espectros do marcador TN incorporado tanto em HPS como em liso-PC, a linha de campo baixo ($m_I = +1$) tem maior amplitude do que a linha de campo médio ($m_I = 0$) (Figura 28a). Este comportamento é característico deste marcador quando incorporado em agregados de anfífilos (Nogueira e col., 1997), e indica que o eixo da ligação N-O (eixo x do sistema de coordenadas do nitróxido, Griffith e Jost, 1976) está orientado aproximadamente paralelamente ao eixo longo molecular do marcador, e que a molécula tem rotação preferencial ao redor desse eixo (Griffith e Jost, 1976, Schreier-Muccillo e col., 1973, Bianconi e Schreier, 1991). O caráter de dupla parcial da ligação éster confere maior rigidez ao grupo tempo. Observa-se que o marcador é mais orientado em HPS do que em liso-PC. No entanto, as linhas são mais largas em liso-PC, sugerindo que a região da cabeça polar é mais imóvel na micela desse detergente.

Os espectros de 10N19 são bastante semelhantes nas duas micelas (Figura 28b). Em ambos os sistemas esse marcador apresenta duas componentes, uma mais alargada, correspondendo a uma população mais imobilizada e outra mais estreita, correspondente a uma população mais móvel. As duas componentes são mais visíveis na região do pico de campo baixo (Figura 28b).

A razão entre as alturas das linhas de campo baixo (h_{+1}) e campo médio (h_0) é uma medida empírica que contém a contribuição do grau de imobilidade e de orientação do marcador. Quanto menor a relação h_{+1}/h_0 maior o grau de organização do sistema (Schreier e col., 1984). Medidas de h_{+1}/h_0 para os espectros de 10N19 em liso-PC e HPS indicam que,

ao contrário do que foi observado para TN, a mobilidade do marcador é bastante semelhante nas duas micelas (Tabela 6).

Os espectros de CAT16 são bem diferentes nas duas micelas (Figura 28c), e observa-se na linha de campo alto que há uma pequena contribuição de um sinal correspondente ao marcador em água. Em liso-PC o espectro é significativamente mais alargado do que em HPS, indicando menor mobilidade do marcador. Isso está de acordo com o maior valor de h_{+1}/h_0 medido nos espectros de HPS (Tabela 6). É importante notar que o CAT16 possui um grupamento amônio, que pode interagir eletrostaticamente com os grupos sulfonato (mais externo) nas micelas de HPS, e fosfato (mais interno) nas micelas de liso-PC. Essa interação faria com que o marcador ficasse firmemente ancorado na região da cabeça polar das micelas.

Os resultados obtidos com este marcador são análogos aos obtidos com TN, possivelmente devido ao fato de que estes dois marcadores se localizam na região das cabeças polares. Quanto a 10N19, talvez devido à sua baixa polaridade (o único grupamento polar é o próprio nitróxido), este marcador poderia estar imerso um pouco mais profundamente na micela. No entanto, o fato de os espectros de 10N19 apresentarem linhas bem mais estreitas do que os de 5-SASL ou 5-MeSL (Figura 28d e Figura 28e, respectivamente) sugere que esse marcador deve estar localizado mais próximo da região da cabeça polar. Os resultados com 5-SASL e 5-MeSL (ver abaixo) mostram que a mobilidade é bem mais restrita na região das cadeias carbônicas do que na região das cabeças polares. De fato, a razão h_{+1}/h_0 medida nos espectros de 5-MeSL é menor do que nos espectros de TN, 10N19 e CAT16 (Tabela 6).

Os marcadores 5-MeSL e 5-SASL contêm o grupo paramagnético N-O no carbono 5 da cadeia, e, neste caso, o eixo da ligação N-O está preferencialmente perpendicular ao eixo longo molecular, que é aproximadamente paralelo ao eixo z do sistema de coordenadas do nitróxido (Griffith e Jost, 1976). Graças à carga do grupo carboxilato, o 5-SASL se encontra ancorado à região da interface membrana-água em bicamadas, apresentando, em consequência, considerável grau de orientação nesses sistemas (Hubbell e McConnell, 1969). Por esse motivo, aparecem extremos internos e externos nos espectros desse

marcador quando ele se encontra orientado em bicamadas (Schreier e col., 1978). Esses espectros representam a soma dos espectros correspondentes a todas as orientações do eixo longo molecular do marcador em relação ao campo magnético (Hubbell e McConnell, 1971).

Vê-se que os espectros de 5-SASL em micelas de liso-PC e de HPS também apresentam extremos externos e internos (Figura 28d). Os valores de $A_{||}$ e $A_{\perp}$ foram utilizados para calcular o parâmetro de ordem, S , de acordo com Hubbell e McConnell (1971). Não foram feitas correções relativas à polaridade. Os valores de $A_{||}$, $A_{\perp}$ e S para 5-SASL em micelas de HPS e liso-PC encontram-se na Tabela 6. Vê-se que, apesar da diferença no valor de $A_{||}$ para os dois sistemas, S praticamente não variou, indicando que na região monitorada por esse marcador não existem diferenças significativas entre as duas micelas.

Por outro lado, os espectros de 5-MeSL (Figura 28e) não apresentam extremos internos e externos, indicando que, devido à sua maior hidrofobicidade, este marcador possui maior liberdade de movimento do que o 5-SASL. Os espectros de 5-MeSL também são bastante parecidos nas micelas de liso-PC e HPS. Esses resultados, tomados em conjunto com os obtidos para o marcador 5-SASL, indicam que, enquanto o empacotamento na região da cabeça polar difere bastante para as micelas dos dois detergentes, essa diferença é bem menos significativa na região da cabeça polar.

Figura 28. Espectros de RPE de marcadores de spin incorporados em micelas de HPS (—) e lipo-PC (—). a) TN, b) 10N19, c) CAT16, d) 5-SASL, e) 5-MeSL. [detergente] = 6 mM, pH 7,4.

Tabela 6. Relação das alturas das linhas de campo baixo (h_{+1}) e campo médio (h_0) medidas nos espectros de TN, 10N19, CAT16 e 5-MeSL em liso-PC e HPS (Figura 28), e valores de separação hiperfina ($2A_{//}$ e $2A_{\perp}$) para os espectros de 5-SASL em HPS e liso-PC (Figura 28).

Marcador	HPS		liso-PC	
	h_{+1}/h_0		h_{+1}/h_0	
TN	1,18		1,05	
10N19	0,91		0,89	
CAT16	0,88		0,71	
5-MeSL	0,64		0,68	
5SASL	$2A_{//}$ (G)	$2A_{\perp}$ (G)	$2A_{//}$ (G)	$2A_{\perp}$ (G)
	$44,0 \pm 1,0$	$21,1 \pm 0,5$	$45,0 \pm 0,5$	$21,6 \pm 0,3$

IV. Discussão

IV.A Propriedades conformacionais de *f*EL1 em solução aquosa

Os espectros de CD do peptídeo *f*EL1 obtidos em solução aquosa (Figura 11) são característicos de uma estrutura ao acaso, flexível, em equilíbrio entre diferentes populações conformacionais. Estas observações estão em acordo com dados de RMN (Pertinhez e col., 1998), que mostram que o peptídeo *f*EL1 possui uma estrutura flexível em água acidica, e popula uma dobra β formada pelos resíduos $W^3P^4F^5G^6$. Os espectros de CD do peptídeo *f*EL1 em solução são bastante semelhantes aos espectros obtidos para o peptídeo *f*EL1⁺¹ (não mostrados), que também forma uma dobra em água acidica e em DMSO, envolvendo os resíduos $W^3P^4F^5G^6$ (Spisni e col., 1996).

Estudos da conformação de *f*EL1⁻¹ por 2D-¹H-RMN e modelagem molecular mostraram que esse peptídeo não é capaz de formar dobra β em água (Pertinhez e col., 1996), sugerindo que a presença de um triptofano na posição 3 é importante para a estabilização da dobra.

Uma característica importante dos espectros de CD de *f*EL1 em solução aquosa (Figura 11) é a presença de uma banda positiva, centrada em 226,5 nm, que poderia ser atribuída a um efeito de acoplamento excitônico causado por interações de empilhamento envolvendo os resíduos aromáticos (Tyr¹, Trp³, Phe⁴ e His⁸) do peptídeo (Grishina e Woody, 1994). Dados do nosso laboratório mostraram que os espectros de CD de um peptídeo *f*EL1 mutante, no qual o Trp³ foi trocado por uma Ala (não mostrados), e do peptídeo *f*EL1⁻¹ (Pertinhez e col., 1996), em água, não apresentam essa banda, sugerindo que esse resíduo em especial poderia estar envolvido em interações de empilhamento com outros resíduos. Por outro lado, espectros de CD do triptofano isolado em solução aquosa também apresentam uma banda positiva nessa região (Mulkerrin, 1996).

Observa-se que a intensidade da banda positiva centrada em 226,5 nm pode ser modulada pela variação do pH (Figura 11) e da temperatura (Figura 12). O primeiro efeito poderia estar relacionado a uma transição conformacional envolvendo a reorientação dos resíduos aromáticos, induzida pela ionização da His⁸. O segundo efeito indica que o aumento da flexibilidade do peptídeo diminui a probabilidade de ocorrência de interações

intramoleculares (empilhamento). Esses comportamentos evidenciam o caráter dinâmico do peptídeo em solução, e a existência de interações intramoleculares envolvendo os resíduos aromáticos. A transição conformacional observada nos espectros de CD com o aumento do pH de 4,0 para 7,5 (Figura 11) não influencia de forma significativa o comportamento fotofísico do Trp³, pois não se observam grandes variações da intensidade de fluorescência (Figura 19), e nem do grau de exposição do Trp³ à acrilamida (Tabela 3) nessa faixa de pH. No entanto, a Figura 19 mostra que a fluorescência do peptídeo também sofre alterações a partir de pH 8, com diminuição da intensidade, corroborando a ocorrência de mudanças conformacionais sugerida pelos espectros de CD.

O espectro de CD de *f*EL1 obtido em 90 % de TFE, um solvente conhecido por induzir a formação de estrutura secundária em peptídeos, não é indicativo da formação de nenhum tipo de estrutura secundária regular, mas revela a estabilização de uma ou mais populações conformacionais (Figura 11). Isso está de acordo com predições teóricas que indicam que essa sequência não possui tendência a formar hélice ou estrutura β em solução. É possível especular que em TFE ocorra uma estabilização da conformação em dobra.

O estudo do efeito do pH sobre o espectro de fluorescência do peptídeo *f*EL1 em solução aquosa mostrou que o aumento do pH entre 9 e 12 leva à diminuição da intensidade de fluorescência (Figura 19). Esse efeito pode estar associado à ionização da Tyr¹, Arg², His⁸ ou do N-terminal isolados ou simultaneamente, sendo que até pH 12,0 não se observou o final da titulação. Entre os pHs 11 e 12 nota-se um deslocamento do λ_{max} de 349 nm para 354 nm, usando λ_{exc} 295nm (não mostrado), sugerindo que está ocorrendo ionização da Tyr¹ formando tirosinato, que absorve na faixa de 292 nm, e emite em aproximadamente 350 nm. A existência de um número considerável de grupos ionizáveis torna difícil estabelecer a influência mútua dos mesmos sobre seus pKas, e portanto, estabelecer o pKa correspondente a cada grupo. A titulação de cada grupo isoladamente também fica bastante dificultada.

IV.B Estudos da interação de fEL1 com bicamadas fosfolipídicas

Estudos de fluorescência (Tabela 1, Figura 17) de fEL1 realizados na presença de vesículas mistas de 1:1 (mol:mol) POPC:POPA mostraram que o λ_{max} é deslocado de aproximadamente 349 nm, para cerca de 332 nm na presença dos agregados, com concomitante aumento da fluorescência. Esse comportamento indica que o Trp³ passou para um meio menos polar, e portanto, que o peptídeo interagiu com os agregados. Medidas de anisotropia de fluorescência (Tabela 2) mostraram que o peptídeo torna-se mais imobilizado ao ligar-se às vesículas de 1:1 (mol:mol) POPC:POPA.

Os espectros de CD de fEL1 obtidos na presença de 1:1 POPC:POPA (Figura 15) são complexos, e apresentam duas bandas negativas: uma em aproximadamente 200 nm, e outra em cerca de 220 nm. Estes espectros poderiam ser resultantes da contribuição de uma população livre em solução, e responsável pela banda negativa em 200 nm, e outra inserida na bicamada e estruturada, responsável pelo componente em 220 nm.

Não se observaram alterações do espectro de CD (Figura 17) ou no λ_{max} dos espectros de fluorescência de fEL1 na presença de POPC nos pHs 4,0, 7,4, e 9,0 (Tabela 1, Figura 17), indicando que o peptídeo não interagiu significativamente com a bicamada zwitteriônica. Este comportamento mostra que a afinidade do peptídeo por vesículas mistas de fosfolípidios negativos e zwitteriônicos é bem maior do que por vesículas zwitteriônicas, sugerindo que interações eletrostáticas entre resíduos carregados no peptídeo e cargas negativas na bicamada são um evento importante no mecanismo de ligação a vesículas fosfolipídicas. De fato, a Figura 18 mostra que o peptídeo liga melhor em vesículas de 1:1 POPC:POPA do que em vesículas de 9:1 POPC:POPA. Medidas de titulação calorimétrica mostraram que o ΔH de ligação de fEL1 a vesículas de 1:1 POPC:POPA é negativo (-8 kcal mol⁻¹) no pH 7,6, e portanto compatível com um mecanismo de ligação dirigido por interações eletrostáticas.

Um comportamento semelhante já foi observado para um peptídeo correspondente à região proximal da terceira alça intra-celular do receptor β -adrenérgico (Shinagawa e col., 1994) e, em nosso laboratório, para o peptídeo NIL3, correspondente à região N-terminal da terceira alça intracelular do receptor AT₁ (Pertinhez e col., 1998),

e para um peptídeo correspondente à terceira alça extra-celular e parte da sétima hélice transmembranar do receptor *mas* (Pertinhez e col., 1995).

A fim de obter informações quantitativas sobre a ligação de β EL1 a vesículas mistas de 1:1 POPC:POPA, procurou-se determinar a constante de associação K_b dessa interação. Para isso realizaram-se medidas de fluorescência e de titulação calorimétrica.

Isotermas de ligação (Figura 23) foram obtidas acompanhando-se o aumento da fluorescência do Trp³ com a concentração de fosfolípido. Valores de K_b aparente para a ligação do peptídeo às vesículas nos pHs 4,0, 7,4 e 9,0 foram calculados a partir das isotermas de ligação linearizadas, como aquelas mostradas na Figura 24. Os dados mostram que apesar de as isotermas de ligação (Figura 23) sugerirem uma maior ligação a pH 7,5, e considerando-se as estimativas dos erros experimentais, os valores de K_b variam pouco com o pH, e apresentam uma certa dependência com o método usado para o cálculo (Tabela 5).

Nos estudos de calorimetria de titulação efetuados nos pHs 4,0 e 9,0 não se observou troca de calor, embora a relação peptídeo:lipídio fosse a mesma que em pH 7,6 no pH 4,0 e o dobro no pH 9,0. Estes resultados também diferem dos de fluorescência que permitiram a determinação de K_b nos três pHs.

O valor de K_b no pH 7,6, determinado a partir dos dados de calorimetria é $1,8 \times 10^3$. Este valor é menor que aquele encontrado por fluorescência ($7,9 \pm 1,3 \times 10^3$ ou $11,1 \pm 1,3 \times 10^3$, veja Tabela 5). Vale comentar que diferentes valores de K_b tem sido encontrados para um mesmo sistema quando medidos por diferentes técnicas (Lissi e col, 1990).

Como a principal contribuição para o valor (negativo) de ΔH tem origem na atração eletrostática, esperar-se-ia uma diminuição da carga líquida do peptídeo com o aumento do pH (Tabela 7) e, portanto, uma variação de K_b e ΔH com o pH na ordem: $K_b, \Delta H$ (pH 4,0) > $K_b, \Delta H$ (pH 7,5) > $K_b, \Delta H$ (pH 9,0).

No entanto, os dados de fluorescência e titulação calorimétrica mostram que em cada pH ocorrem diferentes contribuições de interações eletrostáticas e hidrofóbicas para a ligação. Estimar a carga do peptídeo nos diferentes pHs é complexo, o pKa dos resíduos ionizáveis sofre influência das cargas na superfície da bicamada, bem como dos outros resíduos carregados. Além disso, sabe-se que a carga na superfície da membrana

pode mudar com o pH, pois o pKa do segundo equilíbrio de ionização do ácido fosfatídico é aproximadamente 6 (Tocanne e Teissié, 1990).

Tabela 7. Estimativa das cargas presentes no peptídeo fEL1 em função do pH. Assumiu-se que o pKa dos resíduos ionizáveis é igual ao pKa observado para o aminoácido isoladamente em solução aquosa^a.

	NH ₃	Y	R	W	P	F	G	N	H	L	NH ₂
pKa	9	10	12,5						6		
pH											Total
4,0	+1,0		+1,0						+1,0		+3,0
7,4	+1,0		+1,0						+ 0,04		+2,04
9,0	+ 0,5	-0,1	+1,0								+1,4

^a Fonte: Lehninger, e col., 1993.

Enquanto que a ocorrência de interações eletrostáticas parece ser a principal contribuição para o valor negativo de ΔH de ligação (Seelig, 1997), diversos fatores poderiam contribuir para ΔS . A ligação do peptídeo à bicamada envolve o efeito hidrofóbico (liberação de moléculas de água), que contribui para o aumento da entropia do sistema, e uma maior ordenação do peptídeo na bicamada devido a perda de graus de liberdade, que contribui para diminuir a entropia do sistema (Bianconi e Schreier, 1991).

Assumindo-se que a constante de ligação de fEL1 às vesículas é da ordem de $2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, e que ΔH é -8 kcal.mol^{-1} é possível fazer uma estimativa da variação de energia livre, ΔG^0 , e da entropia, ΔS , de ligação do peptídeo à membrana usando as equações abaixo, e considerando-se que RT ($T = 300 \text{ K}$) é igual a 2439 J :

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S, \quad (9)$$

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_b, \quad (10)$$

Dessa forma chega-se a $\Delta G^0 = -4,4 \text{ kcal mol}^{-1}$ e $\Delta S = -12 \text{ cal mol}^{-1}\text{K}^{-1}$.

O fato de ΔS de ligação de fEL1 a vesículas de POPC:POPA ser negativo sugere que a ordenação do peptídeo decorrente da ligação às vesículas contribui mais para ΔS do que o efeito hidrofóbico. Essa situação poderia resultar da localização superficial do peptídeo na bicamada, o que permitiria que ele permanecesse parcialmente hidratado.

Os estudos de supressão da fluorescência do Trp³ por acrilamida mostraram que K_{sv} obtido na presença de vesículas de 1:1 POPC:POPA nos pHs 4,0, 7,5 e 9,0 é cerca de quatro vezes menor do que os valores obtidos em solução aquosa (Tabela 3, Figura 20),

indicando que o Trp³ está inserido na região das cadeias acila da bicamada.

Os dados de supressão da fluorescência do Trp³ com 5-PCSL e 12-PCSL (Tabela 4) mostraram que a eficiência de supressão obtida para os dois marcadores é similar. Este fato está de acordo com os dados de supressão de fluorescência por acrilamida, e indica que o Trp³ está mergulhado na região das cadeias acila da bicamada e, provavelmente, localiza-se numa região à mesma distância dos dois marcadores. De fato, o valor encontrado para o λ_{max} dos espectros de fluorescência de fEL1 na presença de 1:1 POPC:POPA, (~ 332 nm, Tabela 1, Figura 17), é maior do que o valor que seria esperado para o triptofano no centro da bicamada (318-320 nm, Ren e col., 1997).

É possível que haja atração eletrostática entre a Arg², o grupo amino-terminal e/ou a His⁶ e grupamentos fosfato da região da cabeça polar, o que faria com que o peptídeo permanecesse na interface apesar da penetração do triptofano no interior da bicamada.

IV.C Estudos da interação de fEL1 com micelas de detergente

Os estudos da interação de fEL1 com bicamadas fosfolipídicas apontam para a importância de interações eletrostáticas para o mecanismo de ligação do peptídeo à membrana. Contudo, estudos anteriores tem demonstrado que a ligação de um peptídeo também depende do empacotamento lipídico (Briggs e col, 1986). Micelas, por serem estruturas menos empacotadas que bicamadas (Seelig, 1987), poderiam permitir tanto uma ligação em maior extensão como uma inserção mais aprofundada do ligante. Um comportamento dessa natureza foi observado em nosso laboratório com um peptídeo correspondente à terceira alça extra-celular do receptor expresso pelo oncogene *mas*, também pertencente à família dos GPCR (Pertinhez e col., 1995 e 1997).

Estudos do efeito do grau de empacotamento lipídico sobre a atividade de vários receptores de membrana (Mitchell e col., 1990, Boesze-Battaglia e Albert, 1990, McCallum e Epan, 1995, Fong e McNamee, 1986) mostraram que o empacotamento da bicamada desempenha um papel biológico ao modular o funcionamento de receptores de membrana.

Com o objetivo de examinar o comportamento de fEL1 frente a micelas,

estudamos sua interação com dois detergentes zwitteriônicos, HPS e liso-PC, e um detergente negativo, SDS. Uma diferença entre os dois compostos zwitteriônicos é a orientação do dipolo da cabeça polar (Baptista e Politi, 1991).

Quando se examinaram os espectros de CD de *f*EL1 em presença de micelas de SDS, HPS ou liso-PC, de fato, observou-se que, em contraste com a ausência de interação observada em bicamadas de POPC (Figura 15), houve alteração nos espectros do peptídeo na presença das micelas dos detergentes (Figura 13), indicando ligação com concomitante aumento de estrutura secundária.

A Figura 13 mostra que o peptídeo parece ter adquirido maior conteúdo de estrutura secundária em SDS do que em liso-PC e em HPS. Nota-se ainda que os espectros são diferentes em HPS e liso-PC, indicando que o peptídeo adquire conformação diferente nas duas micelas zwitteriônicas.

É possível que a interação do peptídeo com as micelas provoque a estabilização preferencial de uma das conformações existentes em água. O peptídeo popula uma dobra em meio aquoso, que poderia ser estabilizada pela ligação nas micelas.

Vários fatores podem ter contribuído para as diferenças entre os espectros de CD obtidos em presença das diferentes micelas, entre eles a extensão da ligação, o sítio de ligação, e a orientação diferente dos dipolos elétricos nas cabeças polares no caso de liso-PC e HPS.

A Tabela 1 mostra que o λ_{max} do espectro de fluorescência de *f*EL1 em HPS (336 nm) é ligeiramente maior do que em liso-PC (334 nm) e em SDS (334 nm), indicando que o Trp³ está imerso em ambientes diferentes nas duas micelas. O peptídeo poderia localizar-se mais superficialmente em HPS e em SDS, devido a interações eletrostáticas entre resíduos carregados no peptídeo e grupos sulfonato do HPS e sulfato do SDS, e mais profundamente em liso-PC, devido à interação com grupamentos fosfato da fosfatidilcolina. A intensidade de fluorescência do Trp³ é muito maior em HPS do que em liso-PC (Tabela 1, Figura 16), o que não seria coerente com uma localização mais superficial para o Trp³ em HPS. Esse comportamento parece ter origem em um efeito local, decorrente da conformação do peptídeo em HPS.

Estudos com o anestésico local tetracaína mostraram que o pKa da tetracaína ligada em micelas é diferente daquele observado para a tetracaína em solução, e que esse efeito depende da carga da micela (Garcia-Soto e Fernandez, 1983, Teixeira e col.,

em preparação). Estudos posteriores mostraram que a alteração do pKa da tetracaína decorrente da ligação à membrana é tanto maior quanto maior for a concentração da membrana, e que a alteração do pKa depende das constantes de partição das formas neutra e carregada do anestésico na membrana (Schreier e col., 1984, Lee e Schreier, 1993). Estes dados sugerem que o pKa de resíduos ionizáveis do peptídeo também irá sofrer efeito das cargas presentes na bicamada, e na superfície das micelas.

De fato, estudos do o efeito do pH sobre o espectro de fluorescência de $fEL1$ na presença de micelas de SDS, HPS e liso-PC (Figura 19) mostraram que a interação do peptídeo com os agregados afeta o pKa dos resíduos ionizáveis, sendo que verificou-se um aumento do pKa em SDS e liso-PC, e uma ligeira diminuição em HPS.

Baseando-se na análise acima e supondo que $fEL1$ possui carga líquida positiva em todos os pHs, esperar-se-ia que o pKa subisse na presença de SDS, e diminuísse em HPS e liso-PC. Observou-se um comportamento de acordo com o esperado em SDS, mas não em liso-PC e HPS. Não temos até o momento explicação para esse comportamento.

Resultados de supressão da fluorescência do Trp^3 por acrilamida em SDS e HPS (Tabela 3, Figura 20) indicam que a acessibilidade do Trp^3 à acrilamida na presença das micelas diminui em comparação ao que foi observado em solução aquosa, indicando que o Trp^3 está imerso nas micelas. No entanto, a redução da acessibilidade observada na presença das micelas é bem menor do que o que a redução observada na presença de bicamadas (Figura 20). Este comportamento pode ser devido a uma localização superficial do triptofano, e/ou ao fato de que nas micelas, por serem estruturas menos empacotadas do que as bicamadas, ocorre partição da acrilamida na região das cadeias hidrofóbicas.

A fim de examinar possíveis diferenças organizacionais entre as micelas dos dois detergentes foram obtidos espectros de RPE de marcadores de spin inseridos naquelas (Figura 28). Os marcadores continham o grupamento nítróido, paramagnético, ao nível das cadeias carbônicas ou ao nível das cabeças polares dos detergentes. Os espectros indicaram que, enquanto a diferença de empacotamento na região das cadeias carbônicas era pequena, essa diferença era maior na região das cabeças polares, sendo a mobilidade menor na micela de liso-PC (Figura 28).

Embora os espectros de RPE de diferentes marcadores em liso-PC e em HPS

(Figura 28), sugeriram que o grau de empacotamento na região da cabeça polar é maior na micela de liso-PC, a Tabela 5 mostra que K_b de ligação do peptídeo a HPS é semelhante ao valor encontrado para liso-PC nos pHs 4 e 7,4, mas é menor no pH 9. Esses dados sugerem que a ligação de fEL1 a micelas de HPS e liso-PC não depende somente do grau de empacotamento da micela.

Os valores de K_b obtidos para a ligação do peptídeo a micelas de HPS e liso-PC em função do pH (Tabela 5) mostraram que não existe um efeito pronunciado dessa variável. Analisando-se os dados para micelas de HPS pelo método da linearização vê-se que K_b variou de $0,8 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ (pHs 4,0 e 9,0) a $2,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ (pH 7,4), enquanto que os valores foram de $\sim 1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ (pHs 4,0 e 9,0) e $2,1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ (pH 7,4) pelo método Enzkin. Por outro lado, para micelas de liso-PC esses valores variaram de $1,3 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ (pH 4,0) a $1,8 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ (pHs 7,4 e 9,0) pelo primeiro método e $\sim 2,5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ (para os três pHs) pelo segundo.

Esses resultados indicam que, ao contrário do que foi observado para bicamadas fosfolipídicas, o papel de interações eletrostáticas na associação do peptídeo a micelas zwitteriônicas é menos importante do que naqueles sistemas. Vale notar que não se verificou ligação do peptídeo ao fosfolipídio zwitteriônico POPC; portanto, interações hidrofóbicas devem assumir maior importância para a ligação em micelas, possivelmente dirigidas pelo menor empacotamento molecular nesses agregados.

V. Conclusões

Os resultados apresentados nesta dissertação mostram que a conformação do peptídeo *f*EL1 em solução pode ser modulada pelas condições do meio, como pH, temperatura e presença de um solvente indutor de estrutura secundária. Esse comportamento evidencia a característica dinâmica do peptídeo em solução. Verificou-se que o peptídeo liga em micelas e bicamadas, e adquire estrutura secundária como consequência da ligação. A sua interação com vesículas é modulada pela presença de cargas no peptídeo e na superfície da bicamada, assim como pelo grau de empacotamento da fase lipídica.

Esses resultados estão de acordo com a visão de que as alças extra-membranares de GPCRs, situam-se na interface membrana-água, e permitem supor que essas alças poderiam ter um caráter dinâmico. Alterações conformacionais e a modulação da sua interação com a membrana em consequência da ligação do ligante ao receptor poderiam se constituir nos eventos iniciais do mecanismo molecular de transdução de sinal, que se propagariam para as hélices transmembranares e posteriormente para as alças intracelulares.

Em estudos realizados anteriormente no laboratório, observou-se que os peptídeos *f*EL1 e *f*EL1⁺¹ (Pertinhez e col., 1998a e Spisni e col., 1996) apresentam isomerização *cis-trans* da ligação W³-P⁴ em solução aquosa, o que poderia conferir maior flexibilidade para a primeira alça extra-celular no receptor nativo. Essa flexibilidade poderia desempenhar um papel funcional, especialmente levando em conta a essencialidade da Y⁹² para a ligação do hormônio.

Acredito que para obter informações definitivas sobre a conformação do peptídeo na forma ligada a micelas ou, preferencialmente, a bicamadas, estudos de 2D-¹H-RMN são necessários. Quanto à orientação do peptídeo na bicamada, neste trabalho obtivemos informações sobre a localização do triptofano, mas não dispomos de técnicas adequadas para obter informações sobre o restante do peptídeo. Essa é uma questão complexa para ser abordada experimentalmente.

As informações termodinâmicas obtidas através de calorimetria de titulação são interessantes, pois permitem compreender com maior riqueza de detalhes os mecanismos de interação peptídeo-membrana. Este foi o primeiro trabalho do laboratório a utilizar a

técnica de calorimetria de titulação para esse tipo de estudo, mas acredito que outros estudos deverão ser realizados com outros peptídeos no laboratório, especialmente se tivermos acesso a um equipamento mais adequado para essas medidas.

Existem poucos trabalhos na literatura a respeito de propriedades conformacionais de porções extra-membranares de proteínas de membrana. No caso dos GPCRs, em especial, alguns trabalhos enfocam propriedades conformacionais de alças intra-celulares. Estes estudos tem mostrado que, em muitos casos, esses segmentos tendem a formar hélices anfipáticas, e ligar em membranas modelo (Shinagawa e col., 1994, Pertinhez e col., 1998, Franzoni e col., 1997 e 1999, Jung e col., 1995 e 1996, Pellegrini e col., 1996 e 1997). Este comportamento corrobora a hipótese de que hélices anfipáticas seriam elementos de estrutura secundária envolvidos na ativação da proteína G (Higashijima e col., 1988). Há poucos os trabalhos que tratam dos domínios extra-celulares dos GPCRs (Pertinhez e col., 1995, 1997, 1998a, Spisni e col., 1996, Pellegrini e col., 1998 e 1999, Rolz e col., 1999), o que revela a originalidade do nosso trabalho.

VI. Referências bibliográficas

- Altenbach, C., Cai, K., Khorana, H.G. e Hubbell, W.L. (1999) Structural features and light-dependent changes in the sequence 306-322 extending from helix VII to the palmitoylation sites in rhodopsin: a site-directed spin-labeling study. *Biochemistry* 38: 7931-7937.
- Altenbach, C., Yang, K., Farrens, D.L., Farahbakhsh, Z.T., Khorana, H.G. e Hubbell, W.L. (1996) Structural features and light-dependent changes in the cytoplasmic interhelical E-F loop region of rhodopsin: a site-directed spin labeling study. *Biochemistry* 35: 12470-12478.
- Baldwin, J.M. (1993) The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors. *EMBO J.* 12: 1693-1703.
- Baldwin, J.M., Schertler, G.F.X. e Unger, V.M. (1997) An alpha-carbon template for the transmembrane helices in the rhodopsin family of G-protein-coupled receptors. *J. Mol. Biol.* 272: 144-164.
- Baptista, M.S. e Politi, M.J. (1991) Dipole oriented anion binding and exchange in zwitterionic micelles. *J. Phys. Chem.* 95: 5936-5942.
- Bechinger, B., Kim, Y., Chirlian, L.E., Gesell, J., Neumann, J.M., Montal, M., Tomich, J., Zasloff, M. e Opella, S.J. (1991) Orientations of amphipathic helical peptides in membrane bilayers determined by solid-state NMR spectroscopy. *J. Biomol. NMR* 1: 167-173.
- Berliner, L.J., editor (1976) Spin labeling: theory and applications, Academic Press, New York.
- Bianconi, M.L. e Schreier, S. (1991) EPR study of membrane partitioning, orientation, and membrane-modulated alkaline hydrolysis of a spin-labeled benzoic acid ester. *J. Phys. Chem.* 95: 2483-2486.
- Boesze-Battaglia, K. e Albert, A.D. (1990) Cholesterol modulation of photoreceptor function in bovine retinal rod outer segments. *J. Biol. Chem.* 265: 20727-20730.
- Bourne, H.R. (1997) How receptors talk to trimeric G proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9: 134-142.
- Briggs, M.S., Cornell, D.G., Dluhy, R.A. e Gierash, L.M. (1986) Conformations of

- signal peptides induced by lipids suggest initial steps in protein export. *Science* 233: 206-208.
- Bumpus, F.M., Catt, K.J., Chiu, A.T., DeGasparo, M., Goodfriend, T., Husain, A. e Peach, M.J. (1991) Nomenclature for angiotensin receptors. *Hypertension* 17: 720-721.
- Cantor, C.R. e Shimmel, P.R. (1980) Biophysical Chemistry Part II: Techniques for the study of biological structure and function, W. H. Freeman and Company, San Francisco.
- Cascieri, M.A., Fong, T.M., Graziano, M.P., Tota, M.R., Candelore, M.R. e Strader, C.D. (1996) Signaling through G-protein-coupled-receptors, *in* Signal Transduction (Heldin, C. e Purton, M., eds.), Chapman & Hall, London, pp. 93-108.
- Chattopadhyay, A. e London, E. (1987) Parallax method for direct measurement of membrane penetration depth utilizing fluorescence quenching by spin-labeled phospholipids. *Biochemistry* 26: 39-45.
- Chiu, A.T., Herbin, W.F., McCall, D.E., Ardecky, R.J., Carini, D.J., Duncia, J.V., Pease, L.J., Wong, P.C., Wexler, R.R., Johnson, A.L. e Timmermans, P.B.M.W.M. (1989) Identification of angiotensin II receptor subtypes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 165: 196-203.
- Conchon, S., Barrault, M., Miserey, S., Corvol, P. e Clauser, E. (1997) The C-terminal third intracellular loop of the rat AT1A angiotensin receptor plays a key role in G protein coupling specificity and transduction of the mitogenic signal. *J. Biol. Chem.* 272: 25566-25572.
- Corbin, J., Méthot, N., Wang, H.H., Baenziger, J.E. e Blanton, M.P. (1998) Secondary structure analysis of individual transmembrane segments of the nicotinic acetylcholine receptor by circular dichroism and fourier transform infrared spectroscopy. *J. Biol. Chem.* 273: 771-777.
- Costa, E.J.X., Shida, C.S., Biaggi, M.H., Ito, A.S. e Lamy-Freund, M.T. (1997) How melatonin interacts with lipid bilayers: a study by fluorescence and ESR spectroscopies. *FEBS Lett.* 416: 103-106.
- Costa-Neto, C.M. (1997) Bases moleculares da ativação do receptor de angiotensina II, Tese de doutorado, Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de

Medicina, São Paulo.

- Dolphin, A.C. (1996) G-proteins, *in* Textbook of Receptor Pharmacology (Foreman, J. C. e Johansen, T., eds.), CRC Press, New York, pp.187-196.
- Dyson, H.J. e Wright, P.E. (1995) Antigenic peptides. *FASEB J.* 9: 37-42.
- Eftink, M.R. e Ghiron, C.A. (1976) Fluorescence quenching of indole and model micelle systems. *J. Phys. Chem.* 80: 486-493.
- Farahbakhsh, Z.T., Ridge, K.D., Khorana, H.G. e Hubbell, W.L. (1995) Mapping light-dependent structural changes in the cytoplasmic loop connecting helices C and D in rhodopsin: a site-directed spin labeling study. *Biochemistry* 34: 8812-8819.
- Farrens, D.L., Altenbach, C., Yang, K., Hubbell, W.L. e Khorana, H.G. (1996) Requirements of rigid-body motion of transmembrane helices for light activation of rhodopsin. *Science* 274: 768-770.
- Fong, T.M. e McNamee, M.G. (1986) Correlation between acetylcholine receptor function and structural properties of membranes. *Biochemistry* 25: 830-840.
- Franzoni, L., Nicastro, G., Pertinhez, T.A., Tatò, M., Nakaie, C.R., Paiva, A.C.M., Schreier, S. e Spisni, A. (1997) Structure of the C-terminal fragment 300-320 of the rat angiotensin II AT_{1A} receptor and its relevance with respect to G-protein coupling. *J. Biol. Chem.* 272: 9734-9741.
- Franzoni, L., Nicastro, G., Pertinhez, T.A., Oliveira, L., Nakaie, C.R., Paiva, A.C.M., Schreier, S. e Spisni, A. (1999) Structure of two fragments of the third cytoplasmic loop of the rat angiotensin II AT_{1A} receptor. *J. Biol. Chem.* 274: 227-235.
- Freed, J.H. e Fraenkel, G.H. (1963) Theory of linewidths in electron spin resonance spectra. *J. Chem. Phys.* 39: 326-348.
- Garcia-Soto, J. e Fernandez, M.S. (1983) The effect of neutral and charged micelles on the acid-base dissociation of the local anesthetic tetracaine. *Biochim. Biophys. Acta* 731: 275-281.
- Gazit, E. e Shai, Y. (1995) The assembly and organization of the alpha 5 and alpha 7 helices from the pore-forming domains of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. Relevance to a functional model. *J. Biol. Chem.* 270: 2571-2578.
- Gether, U. e Kobilka, B.K. (1998) G protein-coupled receptors II. Mechanism of agonist

- activation. *J. Biol. Chem.* 273: 17979-17982.
- Greenfield, N. e Fasman, G.D. (1969) Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry* 8: 4108-4116.
- Griffith, O.H. e Jost, P.C. (1976) Lipid spin labels in biological membranes, *in* Spin labelling: theory and applications (Berliner, L. J., ed.) Academic Press, New York, pp. 453-523.
- Grishina, I.B. e Woody, R. (1994) Contributions of tryptophan side chains to the circular dichroism of globular proteins: exciton couplets and coupled oscillators. *Faraday Discuss.* 99: 245-262.
- Higashijima, T., Uzu, S., Nakajima, T. e Ross, E.M. (1988) Mastoparan, a peptide toxin from wasp venom, mimics receptors by activating GTP-binding regulatory proteins (G-proteins). *J. Biol. Chem.* 263: 6491-6494.
- Hjorth, S.A., Schambye, H.T., Greenlee, W.J. e Schwartz, T. (1994) Identification of peptide binding residues in extracellular domains of the AT1 receptor. *J. Biol. Chem.* 269: 30953-30959.
- Horn, F., Weare, J., Beukers, M.W., Hörsch, S., Bairoch, A., Chen, W., Edvardsen, Ø., Campagne, F. e Vriend, G. (1998) GPCRDB: an information system for G protein-coupled receptors. *Nucleic Acids Res.* 26: 277-281.
- Hubbell, W.L. e McConnell, H.M. (1969) Orientation and motion of amphiphilic spin labels in membranes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 64: 20-27.
- Hubbell, W.L. e McConnell, H.M. (1971) Molecular motions in spin-labeled phospholipids and membranes. *J. Amer. Chem. Soc.* 93: 314-326.
- Hubbell, W.L., Gross, A., Langen, R. e Lietzow, M.A. (1998) Recent advances in site-directed spin labelling of proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8: 649-656.
- Jung, H., Windhaber, R., Palm, D. e Schnackerz, K.D. (1995) NMR and circular dichroism studies of synthetic peptides derived from the third intracellular loop of the β -adrenoceptor. *FEBS Lett.* 358: 133-136.
- Jung, H., Windhaber, R., Palm, D. e Schnackerz, K.D. (1996) Conformation of a beta-adrenoceptor-derived signal transducing peptide as inferred by circular dichroism and ¹H NMR spectroscopy. *Biochemistry* 35(20): 6399-6405.
- Kudo, M., Osuga, Y., Kobilka, B.K. e Hsueh, A.J.W. (1996) Transmembrane regions V and VI of the human luteinizing hormone receptor are required for

- constitutive activation by a mutation in the third intracellular loop. *J. Biol. Chem.* 271: 22470-22478.
- Lakowicz, J.R. (1983) Principles of Fluorescence Spectroscopy, Plenum Press, New York.
- Lee, A.G. e Schreier, S. (1993) Binding of charged molecules to lipid bilayers, *in* Liposome Technology: entrapment of drugs and other materials, (Gregoriades, G., ed.) CRC Press, Boca Raton, pp. 1-24.
- Lefkowitz, R.J., Cotecchia, S., Samana, P. e Costa, T. (1993) Constitutive activity of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Trends Pharmacol. Sci.* 14: 303-307.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L. e Cox, M.M. (1993) Principles of biochemistry, 2nd edition, Worth Publishers, New York.
- Lissi, E., Bianconi, M.L., Amaral, A.T., de Paula, E., Blanch, L.E.B. e Schreier, S. (1990) Methods for the determination of partition coefficients based on the effect of solutes upon membrane structure. *Biochim. Biophys. Acta* 1021: 46-50.
- London, E. e Feigenson, G.W. (1981) Fluorescence quenching in model membranes. 1. characterization of quenching caused by a spin-labeled phospholipid. *Biochemistry* 20: 1932-1938.
- Marsh, D. (1990) CRC Handbook of lipid bilayers, CRC Press, Boca Raton.
- Marassi, F.M. e Opella, S.J. (1998) NMR structural studies of membrane proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8: 640-648.
- McCallum, C.D. e Epand, R.M. (1995) Insulin receptor autophosphorylation and signaling is altered by modulation of membrane physical properties. *Biochemistry* 34: 1815-1824.
- Mierke, D.F., Royo, M., Pellegrini, M., Sun, H. e Chorev, M. (1996) Peptide mimetic of the third cytoplasmic loop of the PTH/PTHrP receptor. *J. Am. Chem. Soc.* 118: 8998-9004.
- Mombaerts, P. (1999) Seven-transmembrane proteins as odorant and chemosensory receptors. *Science* 286: 707-711.
- Mitchell, D.C., Straume, M., Miller, J.L. e Litman, B.J. (1990) Modulation of metarhodopsin formation by cholesterol-induced ordering of bilayer lipids.

- Biochemistry* 29: 9143-9149.
- Mukerjee, P. e Mysels, K. J. (1971) Critical Micelle Concentrations of Aqueous Surfactant Systems, Office of Standard Reference Data, National Bureau of Standards, Washington D.C.
- Mulkerrin, M.G. (1996) Protein structure analysis using circular dichroism, *in* Spectroscopic methods for determining protein structure in solution (Havel, H. A., ed.), VCH Publishers, Inc., New York, pp. 5-27.
- Münch, G., Dees, C., Hekman, M. e Palm, D. (1991) Multisite contacts involved in coupling of the β -adrenergic receptor with the stimulatory guanine-nucleotide-binding regulatory protein. *Eur. J. Biochem.* 198: 357-364.
- Murphy, T.J., Alexander, R.W., Griendling, K.K., Runge, M.S. e Bernstein, K.E. (1991) Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor, *Nature* 351: 233-236.
- Nelson, J. W. e Kallenbach, N. R. (1986) Stabilization of the ribonuclease S-peptide α -helix by trifluoroethanol. *Proteins* 1: 211-217.
- Nogueira, L.V., Maranhão, R.C. e Schreier, S. (1997) Characterization of lipoproteins mimetic emulsions used in chemotherapy. Spin label and quasielastic light scattering studies. XXVI Reunião Anual da SBBq, Caxambu.
- Ohnishi, S. e McConnell, H.M. (1965) Interaction of the radical ion of chlorpromazine with deoxyribonucleic acid. *J. Am. Chem. Soc.* 87: 2293.
- Oliveira, L., Paiva, A.C.M., Sander, C. e Vriend, G. (1994) A common step for signal transduction in G protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 15: 170-172.
- Opella, S.J., Marassi, F.M., Gesell, J.J., Valente, A.P., Kim, Y., Oblatt-Montal, M. e Montal, M. (1999) Structures of the M2 channel-lining segments from nicotinic acetylcholine and NMDA receptors by NMR spectroscopy. *Nat. Struct. Biol.* 6: 374-379.
- Paiva, A.C.M., Costa-Neto, C.M. e Oliveira, L. (1998) Molecular modeling and mutagenesis studies of angiotensin II/AT₁ interaction and signal transduction. INABIS'98 - 5th Internet World Congress on Biomedical Sciences at McMaster University, Canada, 7-16 de dezembro. Disponível em: <http://www.mcmaster.ca/inabis98/escher/paiva0625/index.html>.

- Palm, D., Münch, G., Dees, C. e Hekman, M. (1989) Mapping of β -adrenoceptor coupling domains to Gs-protein by site-specific synthetic peptides. *FEBS Lett.* 254: 89-93.
- Pebay-Peyroula, E., Rummel, G., Rosenbusch, J.P. e Landau, E.M. (1997) X-ray structure of bacteriorhodopsin at 2.5 angstroms from microcrystals grown in lipidic cubic phases. *Science* 277: 1676-1681.
- Pellegrini, M. e Mierke, D.F. (1999) Molecular complex of cholecystokinin-8 and N-terminus of the cholecystokinin A receptor by NMR spectroscopy. *Biochemistry* 38: 14775-14783.
- Pellegrini, M., Bisello, A., Rosenblatt, M., Chorev, M. e Mierke, D.F. (1998) Binding domain of human parathyroid hormone receptor: from conformation to function. *Biochemistry* 37: 12737-12743.
- Pellegrini, M., Royo, M., Chorev, M. e Mierke, D.F. (1997) Conformational characterization of a peptide mimetic of the third cytoplasmic loop of the G-protein coupled parathyroid hormone/parathyroid hormone related protein receptor. *Biopolymers*. 40: 653-666.
- Pertinhez, T.A., Nakaie, C.R., Carvalho, R.S.H., Paiva, A.C.M., Tabak, M., Toma, F. e Schreier, S. (1995) Conformational changes upon binding of a receptor loop to lipid structures: possible role in signal transduction. *FEBS Lett.* 375:239-242.
- Pertinhez, T.A., Franzoni, L., Sartor, G., Nakaie, C.R., Carvalho, R.S.H., Paiva, A.C.M. Spisni, A. e Schreier S. (1998a) Conformational studies of the first extracellular loop of the angiotensin II AT₁ receptor involved in hormone binding, *in* Peptides 1996: Proceedings of the Twenty-Fourth European Peptide Symposium (Range, R. e Epton, R., eds.), Mayflower Scientific Ltd., Kingswinford, UK , pp.717-718.
- Pertinhez, T.A., Nakaie, C.R., Paiva, A.C.M.e Schreier, S. (1997) Spin-labeled extracellular loop from a seven-transmembrane helix receptor: studies in solution and interaction with model membranes. *Biopolymers* 42:821-829.
- Pertinhez, T.A., Krybus, R., Nakaie, C.R., Paiva, A.C.M., Franzoni, L., Nicastro, G., Spisni, A. e Schreier, S. (1998) Solution and membrane-bound conformation of intracellular loops of the angiotensin II AT₁ receptor. *Peptides 1996*

- (Bajusz, S. e Hudecz, F., eds.), The European Peptide Society, pp. 710-711.
- Ren, J., Lew, S., Wang, Z. e London, E. (1997) Transmembrane orientation of hydrophobic α -helices is regulated both by the relationship of the helix length to bilayer thickness and by cholesterol concentration. *Biochemistry* 36: 10213-10220.
- Rohatgi-Mukherjee, K.K. (1978) Fundamentals of Photochemistry. Wiley Eastern Limited, New Delhi.
- Rolz, C., Pellegrini, M. e Mierke, D.F. (1999) Molecular characterization of the receptor-ligand complex for parathyroid hormone. *Biochemistry* 38: 6397-6405.
- Rouser, G., Fkeischer, S. e Yamamoto, A. (1970) Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorous analysis of spots. *Lipids* 5: 494-496.
- Sakai, H. e Tsukihara, T. (1998) Structures of membrane proteins determined at atomic resolution. *J. Biochem.* 124: 1051-1059.
- Sasamura, H., Hein, L., Krieger, J.E., Pratt, R.E., Kobilka, B.K. e Dzau, V.J. (1992) Cloning, characterization, and expression of two angiotensin receptor (AT1) isoforms from the mouse genome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 185: 253-259.
- Schenker, A., Laue, L., Kosugi, S., Merendino Jr., J.J., Minegishi, T. e Cutler Jr., G.B. (1993) A constitutively activating mutation of the luteinizing hormone receptor in familial male precocious puberty. *Nature* 365: 652-654.
- Schertler, G.F., Villa, C. e Henderson, R. (1993) Projection structure of rhodopsin. *Nature* 362: 770-772.
- Schreier-Muccillo, S., Marsh, D., Dugas, H., Schneider, H. e Smith, I.C.P. (1973) A spin probe study of the influence of cholesterol on motion and orientation of phospholipids in oriented multibilayers and vesicles. *Chem. Phys. Lipids* 10: 11-27.
- Schreier, S., Polnaszek, C.F. e Smith, I.C.P. (1978) Spin labels in membranes, problems in practice. *Biochim. Biophys. Acta* 515: 375-436.
- Schreier, S. (1979) Estudos estruturais e dinâmicos de membranas pelo método de marcador de spin, Tese de livre docência – IQUSP, São Paulo.

- Schreier, S., Frezzatti Jr., W.A., Araujo, P.S., Chaimovich, H. e Cuccovia, I.M. (1984) Effect of lipid membranes on the apparent pK of the local anesthetic tetracaine. Spin label and titration studies. *Biochim. Biophys Acta* 769:231-237.
- Schwartz, T.W. (1996) Molecular structure of G-protein-coupled receptors, in Textbook of Receptor Pharmacology (Foreman, J. C. e Johansen, T. eds.), CRC Press, New York, pp. 65-84.
- Seelig, A. (1987) Local anesthetics and pressure: a comparison of dibucaine binding to lipid monolayers and bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* 899: 196-204.
- Seelig, J. (1997) Titration calorimetry of lipid-peptide interactions. *Biochim. Biophys. Acta* 1331: 103-116.
- Shinagawa, K., Ohya, M., Higashijima, T. e Wakamatsu, K. (1994) Circular dichroism studies of the interaction between synthetic peptides corresponding to intracellular loops of β -adrenergic receptors and phospholipid vesicles. *J. Biochem.* 115: 463-468.
- Shirai, H., Katsunobu, T., Katada, T. e Inagami, T. (1995) Mapping of G protein coupling sites of the angiotensin II type 1 receptor. *Hypertension* 25: 726-730.
- Spisni, A., Franzoni, L., Sartor, G., Nakaie, C.R., Carvalho, R.S.H., Paiva, A.C.M., Salinas, R.K., Pertinhez, T.A. e Schreier, S. (1996) NMR, CD and molecular modeling studies on the solution conformation of a modified fragment of the first extra-cellular loop of the angiotensin II AT1 receptor. *Bull. Magn. Res.* 17: 151-153.
- Strader, C.D., Fong, T.M., Tota, M.R., Underwood, D. e Dixon, R. A. F. (1994) Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annu. Rev. Biochem.* 63: 101-132.
- Timmermans, P.B.M.W.M., Wong, P.C., Chiu, A.T. e Herblin, W.F. (1991) Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. *Trends Pharmacol. Sci.* 12: 55-62.
- Tocanne, J. e Teissié, J. (1990) Ionization of phospholipids and phospholipid-supported interfacial lateral diffusion of protons in membrane model systems. *Biochim. Biophys. Acta* 1031: 111-142.
- Unger, V.M., Hargrave, P.A., Baldwin, J.M. e Schertler, G.F.X. (1997) Arrangement of

- rhodopsin transmembrane α -helices. *Nature* 389: 203-206.
- Wang, C., Jayadev, S. e Escobedo, J. A. (1995) Identification of a domain in the angiotensin II type 1 receptor determining G_q coupling by the use of receptor quimeras. *J. Biol. Chem.* 270: 16677-16682.
- Watson, S. e Arkininstall, S. (1994) The G-protein linked receptor facts book, Academic Press, San Diego.
- Wess, J. (1997) G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition. *FASEB J.* 11:346-354.
- Wilkinson, G.N. (1961) Statistical estimations in enzyme kinetics. *Biochem. J.* 80: 324-332.
- Woody, R. W. (1996) Theory of circular dichroism of proteins, *in* Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules (Fasman, G. D., ed.), Plenum Press, New York, pp. 25-67.
- Xie, Y., Wang, H. e Segaloff, D.L. (1990) Extracellular domain of lutropin/choriogonadotropin receptor expressed in transfected cells binds choriogonadotropin with high affinity. *J. Biol. Chem.* 265: 21411-21414.
- Yamano, Y., Ohyama, K., Chaki, S., Guo, D. e Inagami, T. (1992) Identification of amino acid residues of rat angiotensin II receptor for ligand binding by site directed mutagenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187: 1426-1431.
- Yamano, Y., Ohyama, K., Kikyo, M., Sano, T., Nakagomi, Y., Inoue, Y., Nakamura, N., Morishima, I., Guo, D., Hamakubo, T. e Inagami, T. (1995) Mutagenesis and molecular modeling of the rat angiotensin II receptor (AT_1). *J. Biol. Chem.* 270: 14024-14030.
- Ye, M.Q. e Healy, D.P. (1992) Characterization of an angiotensin type-1 receptor partial cDNA from rat kidney: evidence for a novel AT_{1B} receptor subtype. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 185: 204-210.
- Yeagle, P.L., Alderfer, J.L. e Albert, L.D. (1995a) Structure of the third cytoplasmic loop of bovine rhodopsin. *Biochemistry* 34: 14621-14625.
- Yeagle, P.L., Alderfer, J.L. e Albert, L.D. (1995b) Structure of the carboxy-terminal domain of bovine rhodopsin. *Nat. Struct. Biol.* 2: 832-834.
- Yeagle, P.L., Alderfer, J.L. e Albert, A.D. (1997a) Three dimensional structure of the

cytoplasmic face of the G protein receptor rhodopsin. *Biochemistry* 36: 9649-9654.

Yeagle, P.L., Alderfer, J.L., Salloum, A.C., Ali, L e Albert, A.D. (1997b) The first and second cytoplasmic loops of the G-protein receptor, rhodopsin, independently forms β -turns. *Biochemistry* 36: 3864-3869.

Yeagle, P. L. e Albert, A. D. (1998) Structure of the G-protein-coupled receptor, rhodopsin: a domain approach. *Biochem. Soc. Trans.* 26: 520-531.