UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA E QUÍMICA DE SÃO CARLOS

"ESTUDOS ESTRUTURAIS DAS MIOGLOBINAS DE "APLYSIA BRÁSILIANA" E "DERMOCHELIS CORIACEA" POR TÉCNICAS ÓPTICAS E RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA".

OSWALDO BAFFA FILHO

Tese apresentada ao Instituto de Física e Química de São Carlos, para obtenção do título de Doutor em Ciências (Física A plicada).

Orientador: Prof.Dr. Otaciro Rangel Nascimento

Departamento de Física e Ciência dos Materiais

São Carlos - 1984

MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA TESE DE DOUTORADO DE _____

OSWALDO BAFFA FILHO

APRESENTADA AO INSTITUTO DE FÍSICA E QUÍMICA DE SÃO CARLOS, DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, EM 20 DE junho DE 1984.

, COMISSÃO JULGADORA:

Dr. OTACIRO RANGEL NASCIMENTO - Orientador

Dr. MARCEL TABAK

Dr. MARIA TERESA LAMY FREUND

Dr. SÔNIA R. WANDERLEY LOURO

Dr. NILCE CORREA MEIRELLES

Dedico

Aos meus pais, à minha es
posa Iraídes e aos meus
filhos Lina e Augusto.

AGRADECIMENTOS

Esta primeira página, paradoxalmente a última a ser redigida é duplamente gratificante. Em primeiro lugar porque quando escrita, o trabalho estará concluído e, em segundo porque, podemos aqui externar os nossos agradecimentos àqueles que mais intimamente conosco colaboraram.

Ao Prof. Otacírio R. Nascimento, grande figura humana, pela orientação, espírito de confiança com que conduziu o trabalho permitindo ao orientado seguir os seus próprios passos... e também pela amizade e incentivo continuados.

Ao Prof. Marcel Tabak, incansável batalhador, pelo constante apoio, incentivo, sugestões, críticas e pela amizade.

Ao Prof. Sérgio Mascarenhas, entusiasta naquilo tudo - que faz, pelo esforço realizado em prol do desenvolvimento da Biofísica, pelo apoio constante, incentivo e amizade.

Aos colegas do Laboratório de Biofísica Molecular e Do simetria: JOÃO, MÁRCIO, LAURA, LADISLAU, ANTONIO, IGNEZ, SILVERIO, WASHINGTON, APARECIDO, JANICE e ANA pelo excelente ambiente de convívio e trabalho.

À Profa. Rosemary Sanches pela colaboração e amizade.

Aos colegas do setor de Física do DGFM-FFCLRP-USP, THOMAS, RODAS, PELÁ e PÍO pelo constante apoio.

Ao Sanches e Isabel pelo constante apoio técnico e amizade.

Aos Profs. Maurizio Brunori e Savério Condò da Universidade de Roma pela acolhida em seus laboratórios.

Aos Profs. F.A. Leone, J.C. Say e O.A. Serra do Depto. de Química da FFCLRP-USP pelas discussões acerca de vários aspectos.

-tos deste trabalho e pela acolhida em seus laboratórios.

À CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

À Iraídes, Lina e Augusto, minha família, que souberam compreender e aceitar a opção pela tese nos momentos cruciais deste trabalho.

ÍNDICE

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO I - A MOLÉCULA DE MIOGLOBINA	
1. Descrição Geral	5
2. Os Complexos de Cu^{2+} com Mioglobinas	10
3. As características da MbT e MbApB	15
CAPÍTULO II- ASPECTOS TEÓRICOS	
1. A Hamiltoniana de Spin	19
2. O espectro do Fe^{3+}	22
3. O espectro do Cu^{2+}	27
4. Marcadores de Spin	29
CAPÍTULO III- MATERIAIS E MÉTODOS	
1. Preparação da MbApB	38
2. Preparação da MbT	39
3. Redução e Oxidação da forma MbT-CN	39
4. Preparação da MbT-F	40
5. Preparação da MbT-NO	40
6. Procedimento de marcação	41
7. Complexação de Cu^{2+} e Mn^{2+} com MbApB	41
8. Medidas de EPR	42
9. Medidas de temperatura	42
10. Medidas de Absorção Óptica	42
11. Medidas de pH	43
12. Tampões	43
CAPÍTULO IV- RESULTADOS	
1. A transição Ácida Alcalina da MbApB	44
2. Interação da MbApB com Cu^{2+}	52
3. Interação da MbApB com Mn^{2+}	58

4. A transição Ácida Alcalina da MbT	63
5. Mudanças Conformacionais Induzidas termica- mente na MbT	70

CAPÍTULO V - DISCUSSÃO

1. A transição Ácida Alcalina da MbApB	80
2. Interação de Cu^{2+} e Mn^{2+} com MbApB	84
3. A transição Ácida Alcalina da MbT	86
4. Mudanças Conformacionais Induzidas termica - mente na MbT	89

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
----------------------------------	----

RESUMO

Neste trabalho são estudadas as mioglobinas de *Aplysia Brasiliana* (MbApB) e da tartaruga marinha "*Dermochelis Coriacea*" (MbT) focalizando a transição ácida alcalina (TAA), a interação com metais de transição e mudanças conformacionais induzidas - termicamente com objetivo de observar diferenças estruturais das mioglobinas.

A TAA da MbApB possui um $pK = 7,2$ quando observada pelo espectro do Fe^{3+} em $g_{\perp} = 5,83$ e $pK = 7,5$ quando medida através da absorção óptica ($\lambda = 590nm$). O espectro de EPR do Fe^{3+} a pH alcalino revela uma distorção rombica no campo cristalino do ferro que esta de acordo com a ausência da histidina distal nesta proteína. Além disso as linhas associadas à configuração de baixo spin são bastante alargadas. Este alargamento de linha pode ser explicado por uma flutuação no posicionamento da heme em relação aos eixos de simetria.

A MbApB forma complexos com o Cu^{2+} e Mn^{2+} . Existe somente um sítio de ligação para esses metais na proteína. Este sítio provavelmente envolve ligantes comuns ao Mn^{2+} e Cu^{2+} pois a ligação é competitiva, indicando que o complexo com o Cu^{2+} é mais estável do que com o Mn^{2+} ($K_A^{Mn^{2+}} = (11,5 \pm 0,8) \cdot 10^3 M^{-1}$). O complexo MbApB: Cu^{2+} exibe uma transição dependente do pH indicando uma mudança na coordenação do Cu^{2+} . Esta transição pode ser ajustada teoricamente admitindo-se uma interconversão entre duas formas, fornecendo um $pK = 11,0$. Observa-se também que a complexação da MbApB com mais de um Cu^{2+} provoca desnaturação.

A TAA da MbT foi estudada por absorção óptica ($pK=8,4$) e EPR ($pK = 8,3$). Os espectros de EPR mostram que o Fe^{3+} está num campo cristalino com simetria axial e distorção rombica. As medidas de absorção óptica revelam pontos isosbéticos praticas -

-mente idênticos aos de outras mioglobinas e um espectro na região de Soret típico de hemoproteínas que possuem a histidina distal. Estes dados permitem antecipar que a MbT deve possuir os mesmos resíduos de aminoácidos na região da heme que a Mb(II), porém com a histidina E-7 ligeiramente inclinada em relação ao eixo de simetria da heme.

As mudanças conformacionais induzidas pela temperatura foram estudadas para a MbT em várias pH's. Esta proteína possui uma cisteína em sua cadeia polipeptídica que permite a ligação de um marcador de spin específico para os grupos SH. Os resultados obtidos através do espectro de EPR do marcador de spin e da absorção óptica do Fe^{3+} permitem concluir que esta proteína exibe o fenômeno de pré-desnaturação e a transição da forma nativa para a desnaturada é o resultado de uma sequência de etapas indicando que existem estados intermediários.

ABSTRACT

The myoglobins of "Aplysia Brasiliana" (MbApB) and of the sea turtle "Dermochelis Coriacea" (MbT) are studied in this work with special attention devoted to the acid-alkaline transition (AAT), the interaction with transition metals and temperature induced conformational changes in order to characterize structural differences in these proteins.

The AAT of MbApB has a $pK = 7.2$ obtained from the EPR spectra of Fe^{3+} at $g_{\perp} = 5.83$ and a $pK = 7.5$ obtained from optical absorption ($\lambda = 590nm$). The EPR Spectrum of Fe^{3+} at alkaline pH shows a rhombic distortion of the ion crystal field which is in agreement with the absence in this protein of the distal histidine residue. The ESR lines associated with the low spin configuration are considerably broadened. This effect can be explained by fluctuations on the heme position relative to the symmetry axis.

MbApB forms complexes with both Cu^{2+} and Mn^{2+} only one binding site is obtained for both metals in the protein. This site probably has common ligands for Mn^{2+} and Cu^{2+} as the binding is competitive, suggesting also that the Cu^{2+} complex is more stable than the Mn^{2+} one ($K_A^{Mn^{2+}} = (11,5 \pm 0,8) \cdot 10^3 M^{-1}$). The Cu^{2+} : MbApB complex shows a pH dependent transition probably related to a change in the Cu^{2+} coordination. This transition can be adjusted assuming an interconversion between two different forms with a $pK = 11,0$. Addition of more than one Cu^{2+} ion per MbApB produces the denaturation of the protein.

The AAT of MbT was studied through optical absorption ($pK = 8,4$) and EPR ($pK = 8.3$). The EPR spectra show that the Fe^{3+} ion is in a crystal field with axial symmetry with rhombic distortion. Measurements of optical absorption show isosbestic

points practically identical to other hemoproteins with the distal histidina present. Our data permit to anticipate that MbT probably has the same aminoacid residues in the heme region as Mb(II), and that a slight displacement of the histidine E-7 about the heme symmetry axis is observed.

Temperature induced conformational changes were studied in MbT at various pH's. This protein has a cysteine residue in the polypeptide chain which allows the binding of a specific spin label, a maleimide derivative. Our results from the EPR spectra of the spin label attached to MbT together with the optical absorption by Fe^{3+} lead to the conclusion that this protein exhibits a pre-denaturation behaviour and the transition from the native to the denatured forms in a result of a sequence of steps suggesting the existence of intermediate states.

INTRODUÇÃO

A associação de diferentes áreas do conhecimento humano têm-se mostrado uma profícua e interessante maneira de desenvolver a ciência. A Física tem dado vários exemplos de interação dos quais podemos citar a Física Médica , a Físico-química, a Física dos solos, a Biofísica, etc. Em todos esses exemplos a aplicação do instrumental, métodos e acima de tudo, das idéias da Física tornaram possíveis a solução de muitos problemas importantes e solidificaram a crença de que estas idéias e teorias são amplamente aplicáveis.

Vamos aqui falar um pouco mais detalhadamente da interação da Física com a Biologia ou a assim chamada Biofísica. Os problemas fundamentais da Biologia moderna podem ser resumidos em três áreas. A morfogênese ou o estudo da formação das estruturas supermoleculares, organelas celulares, membranas e o problema da relação entre a forma e a função. A ontogênese ou o problema da diferenciação e desenvolvimento dos organismos complexos. Finalmente temos a neurobiologia que engloba o estudo do funcionamento do sistema nervoso e a decodificação dos sinais neurológicos. (1)

Em biologia, assim como em outras áreas, o binômio forma-função desempenha um papel de destaque. Conhecer com precisão a estrutura de um determinado aparelho, órgão, célula ou macromolécula implica muitas vezes em desvendar sua função, mecanismos de ação e princípios de funcionamento.

Ao longo de sua evolução a Física desenvolveu um preciso instrumental teórico e experimental para a solução de problemas estruturais até o nível atômico. Numa primeira aproximação é, portanto, natural que se tente utilizar esse arsenal na

solução dos problemas relacionados com a morfogenese.

Inicialmente, a microscopia óptica foi suficiente, - mas com o acúmulo de informações, novas teorias e um conhecimento mais detalhado das estruturas foram necessários ⁽²⁾. Essa evolução atinge seu ápice com a cristalografia de proteínas onde macromoléculas de até 120.000 daltons de peso molecular estão - sendo resolvidas.

O conhecimento da estrutura da proteína "per se" permite uma série de especulações sobre o seu funcionamento. Com a cristalografia podemos obter "imagens" estáticas do que está acontecendo, ou seja, geralmente temos uma sucessão de imagens - truncadas do processo em estudo. É aqui que se faz necessário o uso de outras técnicas experimentais. Tendo já uma noção precisa da estrutura molecular, uma série de experimentos podem ser realizados para que tenhamos informações dinâmicas sobre o processo.

Os problemas biofísicos são geralmente de tal complexidade que não existe uma técnica única que possa resolver um problema por completo. Geralmente, uma abordagem combinada de várias técnicas e métodos se faz necessária. Dentro desta tática, a absorção óptica e a ressonância paramagnética eletrônica (EPR) - têm sido bastante utilizadas devido à sua complementaridade.

Tendo optado por um problema (estrutura-função) e um conjunto de técnicas físicas (EPR, Abs. Óptica) que sistema estudar? Células? Membranas? Vírus? Enzimas? Proteínas não Catalíticas? DNA?... A lista é enorme! Sistemas complexos como uma célula devem ser evitados numa primeira aproximação. Isto nos leva para sistemas mais simples como as macromoléculas. Dentre as macromoléculas que possuem a sua estrutura cristalográfica resol-

-vida, a Hemoglobina (Hb) e a Mioglobina (Mb) ocupam um lugar de destaque. A Hb é um tetramero composto de 2 cadeias α e 2 cadeias β , sendo que a cadeia β é bastante semelhante à Mb que é um monômero. Logo, algumas propriedades da Hb podem ser compreendidas a partir do estudo da Mb que é um sistema consideravelmente mais simples. Além do mais, estas proteínas tem cor, absorvem no visível e ultra violeta, e possuem um átomo de ferro no seu centro ativo que pode ser convenientemente colocado num estado paramagnético.

A Mb apesar de bem mais simples que a Hb é bastante complexa quando comparada com qualquer sistema usualmente estudado em Física. Seu peso molecular é da ordem de 17.000 daltons, possuindo aproximadamente 151 resíduos de aminoácidos. Logo, uma abordagem a partir de primeiros princípios é praticamente impossível. Felizmente existe o recurso ao estudo comparativo ou empírico. Numa situação de tal complexidade, o que se tem a fazer é induzir modificações no nosso sistema e observar o que acontece com as variáveis em estudo. No estudo da Física de defeitos em cristais isto pode ser feito mudando-se a impureza presente na rede cristalina. Na Biofísica Molecular isto é conseguido através da natureza, procurando-se moléculas mutantes numa mesma espécie ou em espécies diferentes que possam fornecer novas informações, resolver ambigüidades e, conseqüentemente, aprofundar o nosso conhecimento do sistema em estudo. Assim, Hemoglobinas e Mioglobinas dos mais diferentes animais tais como minhocas, serpentes, moluscos, vermes, etc..., além do homem, cavalo, baleia, ... tem ocupado a atenção de bioquímicos, inicialmente, e mais recentemente dos biofísicos. Esta antecipação dos bioquímicos é necessária visto que todo estudo biofísico a nível molecular tem que ser precedido de um estudo bioquímico aprimorado, - pois a matéria-prima do biofísico é o produto final do bioquímico

-co, ou seja, proteína pura, caracterizada, etc.

Neste trabalho são estudadas mudanças conformacionais induzidas pela temperatura e pH na mioglobina de tartaruga marinha "Dermochelis Coriácea" (MbT) e do molusco *Aplysia Brasiliensis* (MbApB) usando-se a técnica de EPR e absorção óptica. Estas duas proteínas apresentam características marcantes. A primeira possui um grupo SH titulável em sua cadeia polipeptídica e a segunda não possui o resíduo de aminoácido Histidina na posição distal de coordenação com o átomo de ferro. Estas peculiaridades e as características da molécula de Mb serão discutidas detalhadamente no Capítulo I. No Capítulo II apresentamos os principais aspectos teóricos para interpretação dos dados experimentais. As técnicas e materiais empregados são descritas no Capítulo III. Finalmente, os Capítulos IV e V apresentam e discutem os resultados experimentais.

Todos os trabalhos já existentes na literatura relacionados com Mioglobinas e Hemoglobinas levam-nos a crer que quando a história da Biofísica Molecular for escrita, estas proteínas estarão para a Biofísica assim como o átomo de hidrogênio esteve para a Mecânica Quântica e o silício para o Estado Sólido. (3)

CAPÍTULO I

A MOLÉCULA DE MIOGLOBINA

I-1 - Descrição Geral

A mioglobina é a hemoproteína presente nos músculos responsável pelo transporte e armazenamento do oxigênio necessário às células. O oxigênio é capturado nos pulmões pela hemoglobina, carregado por esta até os tecidos e entregue aí à mioglobina para que esta possa transportá-lo e entregá-lo às células quando necessário. Esta proteína aparece em grandes quantidades nos músculos que possuem atividade rítmica, longos períodos de contração e nos músculos esqueléticos de animais mamíferos que mergulham como a baleia, a foca e o hipopótamo, etc...

O oxigênio molecular liga-se ao átomo de ferro presente na protoporfirina IX, que constitui o grupo heme responsável pela cor característica da molécula. A heme é o centro ativo desta proteína, também chamada de grupo prostético.

Esta capacidade de ligar reversivelmente o oxigênio de modo a liberá-lo quando a pressão parcial do oxigênio é baixa é garantida por um imenso arranjo atômico que envolve a heme. Este arranjo é uma cadeia polipeptídica construída a partir da união de aproximadamente 150 aminoácidos. Esta cadeia tem a forma globular com uma fenda onde insere-se o grupo heme. Esta forma globular das proteínas advem do fato de que dos 20 aminoácidos existentes alguns são hidrofílicos e outros hidrofóbicos. Isto leva à que num polímero construído por resíduos de aminoácidos distribuídos aleatoriamente a forma globular seja privilegiada, pois permite que os resíduos hidrofóbicos (não polares) fiquem em posições não acessíveis à água e os hidrofílicos (polares) fiquem expostos à estas minimizando assim a energia livre total do sis-

-tema. Desta maneira a heme está inserida numa fenda em que os únicos resíduos polares presentes são duas histidinas que desempenham um importante papel. Uma delas coordena-se através do nitrogênio e do grupo imidazol com o ferro e é chamada proximal (F8), a outra situa-se do lado oposto à heme e não coordena-se diretamente com o ferro. Quando a 6ª coordenação do ferro é ocupada por uma molécula de água, esta histidina (distal (E7)) forma uma ponte de hidrogênio com esta molécula de água.

Estas são as ligações mais fortes existentes entre a heme e a cadeia polipeptídica, as outras interações presentes são do tipo hidrofóbico, portanto fracas. Devido à este fato a heme pode ser extraída da mioglobina com relativa facilidade. A figura 1 ilustra a estrutura tridimensional da molécula de mioglobina de baleia. É uma molécula bastante compacta com dimensões de $43 \times 35 \times 25 \text{ \AA}$, possui 153 aminoácidos, um peso molecular de 17815 daltons e oito segmentos helicoidais de comprimento variável. Estes segmentos são designados por letras de A à H, sendo A o segmento mais próximo do terminal amino (N-terminal) e H o mais próximo do terminal carboxílico (C-terminal). As regiões onde ocorrem dobras são denotadas pelas letras correspondentes aos segmentos adjacentes. É interessante notar que os resíduos de prolina ocorrem somente nestas regiões de dobramento juntamente com alguns aminoácidos que dificilmente formam espirais α helicoidais como a serina e isoleucina. ⁽⁴⁾

A estrutura tridimensional da molécula de mioglobina é a mesma para as diferentes espécies estudadas até o presente (o que reforça a idéia da relação entre forma e função). Isto sugere que apesar da microheterogeneidade na composição dos aminoácidos alguns resíduos devem ter suas composições conservadas na estrutura primária (sequência) de modo a determinar a estrutura terciária da proteína.

Figura 1 - Modelo da molécula de Mb mostrando os carbonos α , o grupo heme e alguns resíduos de aminoácidos.

A figura 2 ilustra a heme e sua vizinhança mais próxima. O ferro coordena-se com 5 nitrogênios, sendo 4 dos grupos pirrólicos da heme e um da histidina proximal F-8. A sexta posição de coordenação, ocupada na figura pela esfera hachurada, é o sítio do ligante que no caso fisiológico é o oxigênio. Vários ligantes podem ocupar esta posição. A tabela I mostra os mais importantes e seus efeitos sobre o estado de spin e valência do ferro. (5)

O átomo de ferro na heme está num campo cristalino de simetria octaédrica. Dependendo da intensidade do desdobramento do campo cristalino Δ , que levanta a degenerescência dos orbitais d, podemos ter uma configuração baixo spin ou alto spin. Assim ligantes fortes, Δ intenso, como o CN fornecem uma configura

-ção de baixo spin e ligantes fracos como o F fornecem uma configuração de alto spin.

Tabela I

Ligantes que podem ocupar a 6ª coordenação do ferro na heme e o efeito sobre a valência e estado de spin do composto resultante.

Ligante	Valência	Spin
O ₂	2+	0
deoxi	2+	2
NO	2+	2
CO	2+	0
H ₂ O	3+	5/2
OH ⁻	3+	1/2
F	3+	5/2
CN	3+	1/2
N ₃	3+	1/2

A figura 3 ilustra os possíveis estados de spin para o ferro na heme. É interessante notar que a mudança de estado de spin faz com que o ferro saia do plano da heme em direção à 6ª coordenação quando passa de baixo spin para alto spin.

Alguns destes ligantes tem um efeito estabilizador sobre a estrutura da proteína. Assim o CN é bastante usado durante a fase preparativa, pois impede a desnaturação da proteína durante os processos, às vezes um tanto drásticos, de extração e purificação da mioglobina. Este ligante pode ser facilmente removido através de tratamento com ditionito de sódio. O CO também estabiliza a proteína, mantendo o ferro no estado de valência 2+ (ferroso), no plano de heme (spin zero) mimetizando,

portanto, a ligação com o oxigênio. O NO também mimetiza a ligação do oxigênio com a vantagem de ser paramagnético.

Figura 2 - A estrutura da heme com as histidinas proximal (F8) e distal (E7) a esfera hachurada é o sexto ligante.

(a)

(b)

Figura 3 - A ocupação dos orbitais d pelos elétrons do Fe^{2+} e Fe^{3+} (a) e o efeito do campo cristalino Δ no estado de spin.

Um caso interessante de transição alto spin - baixo spin é o da Mb-H₂O ou aquometa mioglobina. Nesta mioglobina a 6ª coordenação é ocupada por uma molécula de H₂O ou OH⁻ dependendo do pH da solução. Assim a transição alto spin - baixo spin é dependente do pH. Esta transição pode ser esquematizada como segue:

Esta mudança é acompanhada de variações espectrais, a cor da solução passa de marrom para verde, que podem fornecer informações sobre a transição do spin do ferro (transição ácida alcalina).

1-2) Os complexos de Cu²⁺ com mioglobinas

Os íons metálicos desempenham um importante papel na ativação de várias enzimas. Cerca de um terço de todas as enzimas estudadas até o presente necessitam de um íon metálico para o seu funcionamento. Em alguns casos o íon faz parte da estrutura da enzima e estas recebem o nome de metalo-enzimas, em outros íons funcionam como ativadores extrínsecos ligando-se a sítios específicos. A ligação química no caso em que o íon faz parte da estrutura geralmente é mais forte do que quando este é

um ativador externo, o que exige processos relativamente mais drásticos para a remoção do íon estrutural.

Toda enzima é uma proteína, entretanto a relação inversa não vale. Existem proteínas não catalíticas que desempenham atividades de transporte de oxigênio (Mioglobina, Hemoglobina, Hemocianina, etc...) de elétrons (Citocromos), etc... Em todas estas proteínas o íon metálico também é essencial para o seu funcionamento.

A mioglobina, que possui um átomo de ferro no seu centro ativo, pode formar complexos com outros metais em outras regiões. Isto de fato foi verificado quando da resolução da estrutura cristalográfica da proteína. Para resolver o problema da fase da onda de raio X difratada emprega-se um átomo pesado (Hg), que ligado à algum sítio da proteína pode fixar a fase da onda espalhada. Este fato abre uma perspectiva interessante que é a de complexar a proteína com íons e usar estes como uma sonda estrutural.

O cobre é um dos mais estudados íons de transição. Este íon é extremamente lábil podendo formar complexos com grande facilidade, normalmente exibe absorção Óptica, e mesmo complexo permanece num estado paramagnético.

A complexação de cobre também tem sido estudada com pequenos peptídeos que formariam uma classe de sistemas modelos para auxiliar na interpretação e análise dos complexos obtidos com sistemas de peso molecular alto como as proteínas extrinsecamente complexadas ou as proteínas já naturalmente complexadas como as "proteínas-azuis".

Os principais grupos ionizáveis que podem atuar como ligantes do cobre ou outros metais de transição são os terminais amina e carboxílicos, anéis imidazol de histidinas, grupos

sulfidrilícos de cisteínas, ϵ -NH₃ de lisinas, grupos fenólicos de tirosinas e ou guanidinas e finalmente nitrogênios da cadeia polipeptídica. Existem muitas possibilidades de coordenação dependendo do número de grupos ionizáveis, comprimento da cadeia, pH, etc...⁽⁶⁾

A interação de cobre com a aquometa mioglobina de baleia [Mb(II)] foi estudada inicialmente por Gurd e Breslow⁽⁷⁾ e posteriormente por Gurd, Falk, Malmström e Vanngard^(8,9), estes pesquisadores utilizaram amostras em solução de Mb(II) à temperatura ambiente e de nitrogênio líquido e através das técnicas de absorção óptica, EPR, potenciometria, etc... estabeleceram que:

1) Ocorre a complexação com o Cu²⁺ e Zn²⁺, esta reação é competitiva sugerindo o mesmo sítio de ligação.

2) A variação observada do pH quando da ligação de 1 Cu²⁺ é maior que a esperada caso ocorresse uma ligação simples. À pH = 5,0 pelo menos um próton é deslocado enquanto que à pH = 11,0 3 prótons são deslocados para cada Cu²⁺ ligado.

3) Grupos imidazóis fazem parte da coordenação com o íon de transição formando um quelato.

4) Ligações com mais de um íon Cu²⁺ induzem mudanças conformacionais reversíveis. A estrutura da proteína é compatível com somente um íon Cu²⁺.

5) O espectro de EPR de um Cu²⁺ ligado à proteína apresenta uma transição com o pH indicando uma mudança de coordenação. O espectro à pH alto exhibe uma estrutura superhiperfina indicando a interação com nitrogênios.

6) Esta transição pode ser explicada pela composição

de dois espectros, um característico da coordenação à pH baixo e outro da coordenação à pH alto. Existe então uma transição entre duas formas de complexação com um $pK = 8,9$, ligeiramente inferior ao pK de transição ácida alcalina observada através do espectro do ferro por EPR e absorção óptica.

Estudos de difração de raios X usando cristais de Mb (II) dopados com Cu^{2+} e Zn^{2+} realizados por Banaszak, Watson e Kendrew ⁽¹⁰⁾ mostraram que os sítios de ligação dos dois íons são vizinhos e três resíduos de aminoácidos estão suficientemente próximos de cada íon para possibilitar a coordenação com a proteína. Para o Zn^{2+} estes resíduos são histidina GH1, asparagina GH4 e a lisina Al4, para o Cu^{2+} são a asparagina GH4, lisina Al4 e histidina Al0. A figura 4 ilustra a região da proteína onde ocorre a ligação destes metais. Esta descrição confirma a competitividade dos íons e a participação dos grupos imidazóis. Recentemente foi realizada uma tentativa de refinamento destes dados pelo grupo de cristalografia do IFQSC-USP ⁽¹¹⁾ e os resultados não foram positivos. O índice de ocupação do metal aparentemente é menor que o necessário para que se tenha uma boa resolução. Um estudo complementar da intensidade do sinal de EPR em função do volume mostrou que a difusão do íon se restringe à superfície do cristal.

Complexos de Cu^{2+} com monocristais de Mb(II) também foram estudados utilizando a técnica de EPR. O estudo de monocristais dopados, normalmente, permite obter mais informações do que os estudos com soluções congeladas, nestas últimas somente podemos obter médias dos parâmetros em estudo, o que é na maioria dos casos indesejável.

Nascimento et al. ⁽¹²⁾ observaram a existência de dois espectros de EPR isotropicos com parâmetros diferentes e três es

-pectros anisotropicos, correspondendo ã 3 tipos distintos do complexo Mb (II): Cu^{2+} . Foi também observado interação superhíperfina com um nitrogênio e os parâmetros do espectro de EPR foram determinados por um ajuste com uma Hamiltoniana de spin com simetria axial (Capítulo II) calculada até 2ª ordem. O quelato (quadrado planar) formado entre o cobre e os resíduos vizinhos proposto esta na figura 5.

Fig. 4 - Localização dos íons de Cu(II) e Zn(II) na molécula de mioglobina (ref.10)

Fig.5 - Quelato proposto para o complexo do Cu^{2+} com a Mb(II) (ref.12)

As características da MbT e MbApB

- MbApB

Apesar de não ter a sua sequência primária e nem a estrutura terciária (tridimensional) determinada os estudos bioquímicos já realizados ⁽¹³⁾ antecipam uma série de características interessantes.

Começando pelo fim, esta proteína apresenta o N-terminal bloqueado o que impede a participação deste resíduo na formação de complexos e ou interação com ligantes externos. A análise do conteúdo de aminoácidos mostrada na tabela II indica somente a existência de uma histidina. Esta deve ser a histidina proximal (His F8). Em outras proteínas onde a histidina distal (E7) está ausente, como na Mb de *Aplysia Limacina* (MbApL) e na Hb de *Chironomus Tummi*, a banda de absorção óptica na região de solet ($\lambda \sim 410\text{nm}$) é bastante alargada e com um coeficiente de extinção molar mais baixo do que nas hemoproteínas onde a His E7 está presente. Isto de fato é observado na MbApB. Como consequência desta mudança de hidrofobicidade na região da Heme o pK da transição ácida alcalina também abaixa em relação às mioglobinas que possuem a His F8, para a baleia o pK é 9,2 enquanto - para a *Aplysia Limacina* e *Brasiliana* é 7,2.

Na tabela II também estão indicados os pK's de ionização dos resíduos de aminoácidos quando isolados da proteína. A tabela III ilustra a comparação entre os grupos de aminoácidos presentes na MbApB e em outras famílias de globinas. Desta tabela fica evidente a alta porcentagem de resíduos aromáticos - presente na MbApB. Quando comparada com a MbApL a MbApB difere desta em resíduos de Alanina e na presença de Tirosina que está ausente na MbApL.

Tabela II - Composição de aminoácidos obtidos para a MbApB.

Resíduo	Razão Molar	PK dos grupos ionizáveis
Lis	13	10,0
His	1	6,0 - 7,0
Arg	4	12,0
Tri	3	-
Asp	19	4,0 - 5,0
Tre	2	-
Ser	12	-
Glu	8	4,0 - 5,0
Pro	7	-
Gli	12	-
Ala	26	-
Val	10	-
Met	3	-
Ileu	4	-
Leu	10	-
Tir	1	9,5 - 10,5
Fen	16	-

T O T A L 151 resíduos

Tabela III - Comparação do conteúdo percentual de resíduos de amino ácidos de diferentes mioglobinas.

Fonte de Mb	Ácidos (Asp+Glu)	Básicos (Lys+Arg+His)	Aromáticos (Phe+Tyr+Trp)	Hidrofóbicos (Leu+Val+Ile+Phe)
Aplysia Brasiliana	18,4	14,2	17,2	28,8
Moluscos	9,7	11,7	11,7	29,0
Insetos	9,6	12,5	12,5	30,9
Vertebrados	13,7	21,8	7,2	27,6

- MbT

A MbT foi recentemente purificada e pouca informação se tem sobre a sua composição de aminoácidos. Alguns estudos - cinéticos de ligação com o O_2 e CO foram realizados pelo grupo do Prof. MAURIZIO BRUNORI do "Istituto di Chimica", Facoltà di Medicina - Università di Roma⁽¹⁴⁾ que, sob este aspecto, revelaram uma proteína bastante similar à Mb(II) e MbApB. Os parâmetros cinéticos e termodinâmicos não sofrem influência do pH no intervalo de 5 à 8 e a reatividade em relação ao N_3^- e F^- varia de modo semelhante ao encontrado para a Mb(II).

Entretanto esta proteína possui pelo menos uma cisteína na em sua cadeia polipeptídica com um grupo SH titulável. A ocorrência de cisteínas em Mb's é um fato raro. Este grupo normalmente é muito reativo, está relacionado com a complexação de metais e podemos ligar a ele um marcador de spin específico como a N-etil maleímda, iodoacetamida ou isotiocianato.

CAPÍTULO II

ASPECTOS TEÓRICOS

II-1) A Hamiltoniana de Spin

O fenômeno de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE ou EPR*) pode ser observado em princípio para qualquer sistema de elétrons que possua um spin resultante não nulo. O caso mais simples desta situação é o de um elétron livre. O momento magnético $\vec{\mu}$ de um elétron pode ser expresso em termos de seu spin como:

$$\vec{\mu} = g\beta\vec{S} \quad (1)$$

onde β é o magneton de Bohr e g é o fator de Landé para o elétron.

Na presença de um campo magnético a energia de interação deste elétron com o campo magnético será dada pelos elementos de matriz da Hamiltoniana:

$$H = - \vec{\mu} \cdot \vec{H} \quad (2)$$

Esta Hamiltoniana descreve o efeito Zeemann e a sua solução fornece as possíveis energias para o sistema. Para um campo magnético H_0 na direção Z temos:

$$\begin{aligned} H &= -g\beta H_0 m_s \\ E(m_s) &= -g\beta H_0 m_s \end{aligned} \quad (3)$$

onde m_s são as possíveis projeções do spin ao longo do eixo de quantização Z. O diagrama de energias deste elétron é ilustrado na figura 6. A transição entre os dois níveis se dará quando uma energia $\Delta E = g\beta H_0$ for fornecida ao sistema. Esta energia faz com que o momento magnético transicione de uma

* Apesar da sigla RPE ser a forma correta em português, a forma EPR, oriunda em inglês é mais usada no trato deste fenômeno e será por nós utilizada neste trabalho.

posição paralela ao campo magnético H_0 para uma posição antiparalela a este. A energia ΔE normalmente é fornecida através da exposição do sistema a um campo de microondas de frequência fixa perpendicular ao campo H_0 que é adiabaticamente variado até que ocorra a transição. Quando ocorre a transição o sistema absorve energia do campo de microondas e esta absorção ou usualmente a sua derivada pode ser detectada por um sistema eletrônico apropriado que faz parte dos espectrômetros de EPR. A figura 6 sintetiza estas informações.

Figura 6 - O desdobramento dos níveis de energia do spin eletrônico na presença de um campo magnético, a forma da linha de absorção de energia do campo de microonda e sua derivada.

Nem todas as situações possuem este nível de simplicidade. Normalmente o spin resultante é diferente de $1/2$, está cercado por cargas elétricas e momentos magnéticos dos núcleos. A interação do spin com o campo magnético resultante (externo mais o produzido pelos núcleos vizinhos) depende do grau de mobilidade da espécie paramagnética, etc...

Devido ao fato de que nem todos os dubletos de Kramers podem ter suas transições observadas por EPR, seja devido à energia de transição demasiadamente grande ou pela baixa população, podemos atribuir um número de spin efetivo para o sistema. Este número ajusta-se ao espectro observado experimentalmente contornado assim o primeiro obstáculo. A Hamiltoniana que faz uso deste spin fictício chamamos de Hamiltoniana de spin (15). No caso mais geral terá a seguinte forma:

$$\begin{aligned}
 H = & \beta(g_x s_x H_x + g_y s_y H_y + g_z s_z H_z) + A_x I_x S_x + A_y I_y S_y + A_z I_z S_z + \\
 & + D[S_z^2 - \frac{1}{3}S(S+1)] + E[S_x^2 - S_y^2] + \dots \left[\begin{array}{l} \text{termos de potência} \\ \text{maior que 2 em S} \end{array} \right] \\
 & + \hbar \gamma \vec{h}(t) \cdot \vec{S}
 \end{aligned} \tag{4}$$

onde $\vec{S}$ é o operador de spin eletrônico, S_x , S_y e S_z seus componentes, A é o tensor de interação hiperfina, g é o tensor de interação Zeemann, β é o magneton de Bohr, I é o operador de spin nuclear, γ é a razão giromagnética, $\vec{h}(t)$ é um campo magnético estocástico gerado pelos dipolos vizinhos ao spin, D e E são os parâmetros de desdobramento de campo zero associados ao campo eletrostático ao redor do íon.

Para os íons Fe^{3+} e Cu^{2+} a Hamiltoniana de spin pode ser simplificada. Estes íons usualmente situam-se num campo com simetria axial no centro de um quadrado tendo um ligante em cada vértice e em alguns casos também nas posições axiais.

O isótopo mais abundante do Fe^{3+} não possui momento magnético nuclear o que permite simplificar a expressão (4) fornecendo:

$$H = \beta \left[g_{\parallel} S_z H_z + g_{\perp} (S_x H_x - S_y H_y) \right] + D \left[S_z^2 - \frac{1}{3} S(S+1) \right] + E (S_x^2 - S_y^2) \quad (5)$$

O Cu^{2+} não possui os termos de desdobramento de campo zero, porém possui momento magnético nuclear com $I=3/2$ o que fornece uma estrutura hiperfina de quatro linhas. A expressão - (4) (assumindo simetria axial) neste caso reduz-se a:

$$H = \beta \left[g_{\parallel} S_z H_z + g_{\perp} (S_x H_x + S_y H_y) \right] + A_{\parallel} S_z I_z + A_{\perp} (S_x I_x + S_y I_y) \quad (6)$$

No caso de espécie paramagnética ser um radical, ou mais especificamente um marcador de spin, a Hamiltoniana (4) pode ser reescrita como:

$$H = \beta (g_x S_x H_x + g_y S_y H_y + g_z S_z H_z) + A_x I_x S_x + A_y I_y S_y + A_z I_z S_z + \hbar \gamma \vec{h}(t) \cdot \vec{S} \quad (7)$$

O último termo da expressão (7) é bastante importante - pois é através dele que se pode obter informações sobre o estado de movimento do marcador e consequentemente da interação do marcador - com a sua vizinhança. Para os íons Cu^{2+} e Fe^{3+} este termo está contido na largura de linha.

II-2) O espectro do Fe^{3+}

Para $D \gg g\beta H$ a única transição possível na faixa de frequência de operação dos espectrômetros convencionais de EPR é entre o dupletto de Kramers de mais baixa energia com $m_s = \pm 1/2$ ($\Delta m_s = \pm 1$). A condição de ressonância para a Hamiltoniana 5 pode ser colocada em termos de um fator g efetivo dependente do ângulo θ entre a direção de quantização Z e o campo H ⁽¹⁶⁾, temos então

$$H = \frac{h\nu}{g(\theta)\beta} = \frac{h\nu}{\beta(g_{\parallel}^2 \cos^2 \theta + g_{\perp}^2 \sin^2 \theta)^{1/2}} \quad (8)$$

O espectro de uma amostra no estado de solução congelada é o resultado da superposição de um grande número de espectros correspondentes a cada uma das possíveis orientações do íon em relação ao campo magnético. O número de vezes que cada espectro aparece é igual ao número de orientações magneticamente equivalentes. Para um sistema completamente orientado ao acaso as orientações são equiprováveis e o número de centros magneticamente equivalentes depende somente de fatores geométricos ⁽¹⁷⁾.

A fração de íons dN que possuem um ângulo entre θ e $\theta + d\theta$ em relação ao campo magnético externo H será proporcional - ao elemento de ângulo sólido $d\Omega = 1/2 \sin\theta d\theta$, temos então:

$$dN = A(H) dH = \frac{N_0}{2} \sin\theta d\theta \quad (9)$$

onde N_0 é o número total de moléculas e $0 \leq \theta \leq \pi/2$.

Fazendo uma mudança na variável de integração da equação 9 temos:

$$A(H) = \frac{dN}{dH} = \frac{N_0}{2} \sin\theta \frac{d\theta}{dH} \quad (10)$$

o termo $\frac{d\theta}{dH}$ pode ser calculado através da expressão (8) fornecendo:

$$A(H) = \frac{N_0}{2} \frac{g_0^2 H_0^2}{H^3} \left\{ (g_{\parallel}^2 - g_{\perp}^2) \left[\left(\frac{g_0 H_0}{H} \right)^2 - g_{\perp}^2 \right]^{-1/2} \right\} \quad (11)$$

onde o valor de H para $\theta = 0$ é $H_{\max} = \frac{h\nu}{g_{\parallel}\beta}$ e para $\theta = \frac{\pi}{2}$ é $H_{\min} = \frac{h\nu}{g_{\perp}\beta}$. Os termos g_0 e H_0 tem a seguinte definição:

$$H_0 = \frac{h\nu}{g_0\beta} \quad \text{e} \quad g_0 = \frac{g_{\parallel} + 2g_{\perp}}{3} \quad (12)$$

A expressão para a absorção $A(H)$ diverge para $\theta = \pi/2$,

entretanto isto não se dá na prática pois mecanismos de alargamento de linha violam a hipótese que foi adotada ao se deduzir a expressão $A(H)$ de que as linhas de cada íon eram infinitamente estreitas.

A simulação de espectros de Cu^{2+} em moléculas biológicas permite uma precisa determinação dos parâmetros experimentais. Vanngard e Aasa determinaram uma expressão para a derivada da absorção num campo H_a que leva em conta a forma de linha (Gaussiana para sólidos e Lorentziana para líquidos) e a contribuição dos pacotes de spin vizinhos ao campo H_a . A expressão para a derivada da absorção $A(H)$ fica:

$$S(H_a) = \int \frac{dA(H)}{dH} = \int A'(H_a - H) A(H) dH \quad (13)$$

onde $A'(H_a - H)$ é a derivada da forma de linha de absorção centrada em H_a e $H = \frac{h\nu}{g\beta}$.

Na figura 7 estão ilustradas a forma de linha da absorção teórica, a forma de linha real e a derivada desta última.

É interessante notar que nem sempre temos a condição $g_{\perp} > g_{\parallel}$. Esta condição acontece para as hemoproteínas devido à grande distorção tetragonal ($D \gg g\beta H$). Isto impõe um eixo de quantização (Z) para o sistema que praticamente independe do campo magnético externo. Numa representação vetorial para o spin temos que o ângulo formado entre as direções de $m_s = \pm 1/2$ e o eixo Z é o mesmo para $H \perp Z$ e $H \parallel Z$. Entretanto a projeção de S na direção perpendicular a Z é muito maior que ao longo de Z (figura 8), isto leva a uma energia Zeemann maior para a direção perpendicular que é formalmente explicitada atribuindo-se um valor para $g_{\perp}$ maior que para $g_{\parallel}$ (18).

Figura 7 - Espectro de absorção típica de centros aleatoriamente orientados. (a) A linha contínua é o gráfico da equação 11 e a linha tracejada do sinal observado experimentalmente mostrando o alargamento de linha. Em (b) temos a derivada da absorção.

Na discussão acima o parâmetro E foi desprezado. Este termo origina-se devido a uma distorção rombica do campo cristalino que circunda o íon e leva a uma quebra de simetria no plano da Heme fazendo com que as direções x e y não sejam mais magneticamente equivalentes. Este termo normalmente é pequeno - quando comparado a D e $g\beta H$ e pode ser incluído no tratamento a

Figura 8 - A orientação do eixo de quantização na heme.

-cima como uma perturbação. Os fatores g_x e g_y vão agora ser dados pelas seguintes relações⁽¹⁹⁾:

$$\begin{aligned} g_x &= 6 - 24 \frac{E}{D} \\ g_y &= 6 + 24 \frac{E}{D} \end{aligned} \quad (14)$$

Dos fatores g no plano (x,y) (plano da Heme)) acima a relação E/D pode ser calculada dando:

$$\frac{E}{D} = \frac{g_x - g_y}{48} \quad (15)$$

Definindo um sistema de eixos adequados, de tal forma que $\frac{E}{D} \leq 0,33$, o grau de distorção rombica, ou rombicidade, - do sistema pode ser definido como⁽²⁰⁾:

$$\% \text{ Rombicidade} = \frac{g_x - g_y}{16} \cdot 100\% \quad (16)$$

II-3) O espectro de Cu^{++}

Os ligantes do íon Cu^{2+} ocupam aproximadamente os vértices de um octaedro regular, os 9 elétrons distribuem-se em ordem crescente de energia pelos orbitais 3d. Devido à distorção tetragonal deste campo octaédrico o orbital $d_{x^2 - y^2}$, de mais alta energia, fica vazio. Este íon pode então ser tratado matematicamente como possuindo um buraco de spin 1/2 com simetria axial. O cobre possui spin nuclear $I=3/2$ que desdobra o espectro em quatro linhas, dando origem à estrutura hiperfina, também com simetria axial. Admitindo que os eixos do tensor A e g são coincidentes a Hamiltoniana de spin pode ser escrita como:

$$H = \beta \left[g_{\parallel} H_z S_z + g_{\perp} (H_x S_x + H_y S_y) \right] + A_{\parallel} I_z S_z + A_{\perp} (I_x S_x + I_y S_y) \quad (17)$$

O campo de ressonância para uma componente hiperfina é dado por:

$$H = \frac{h\nu}{g\beta} - \frac{K}{g\beta} M_I \quad (18)$$

onde M_I é o número quântico de spin nuclear ($M_I = \pm 1/2, \pm 3/2$) e

$$K = (g_{\parallel}^2 A_{\parallel}^2 \cos^2 \theta + g_{\perp}^2 A_{\perp}^2 \sin^2 \theta)^{1/2} \quad (19)$$

com $A_{\parallel}$ e $A_{\perp}$ em unidades de energia. Para se ter as componentes do tensor hiperfino em unidades de campo magnético basta substituir $A_{\parallel}$ por $g\beta A_{\parallel}$ e $A_{\perp}$ por $g\beta A_{\perp}$.

Para uma previsão da forma de linha deve ser realizado um cálculo semelhante ao mostrado na secção anterior. A equação 18 fornece a seguinte equação para $\frac{dH}{d\theta}$:

$$\frac{dH}{d\theta} = \frac{\sin\theta \cos\theta}{g\beta} \left\{ h\nu (g_{\parallel}^2 - g_{\perp}^2) - M_I \left[2K (g_{\parallel}^2 - g_{\perp}^2) - K^{-1} (g_{\parallel}^2 A_{\parallel}^2 - g_{\perp}^2 A_{\perp}^2) \right] \right\} \quad (20)$$

A expressão 10 com a nova condição para $\frac{dH}{d\theta}$ fica ⁽²¹⁾:

$$A(H) = \frac{N_0}{2} \left\{ \frac{2 \cos \theta}{g^2} \left[\frac{(g_{//}^2 - g_{\perp}^2) g_0 H_0}{2g} + \frac{M_I}{\beta} \left(\frac{g_{//}^2 A_{//}^2 - g_{\perp}^2 A_{\perp}^2}{2K} - \frac{K(g_{//}^2 - g_{\perp}^2)}{g^2} \right) \right] \right\}^{-1} \quad (21)$$

Os valores extremos para o campo magnético H ocorrem para $\theta = 0$ e $\theta = \frac{\pi}{2}$ e valem:

$$H(\theta=0) = \frac{g_0 H_0}{g_{//}} - \frac{M_I A_{//}}{\beta g_{//}} \quad (22)$$

$$H(\theta=\pi/2) = \frac{g_0 H_0}{g_{\perp}} - \frac{M_I A_{\perp}}{\beta g_{\perp}}$$

Com g_0 e H_0 já definidos anteriormente.

A expressão 21 ajusta-se bem aos resultados experimentais quando a anisotropia não é muito grande. No caso desta anisotropia ser expressiva deve-se corrigir a expressão realizando um cálculo de perturbação até 2ª ordem ⁽²²⁾, quando termos em M_I^2 passam a ser importantes.

A função A(H) diverge quando $H=H(\pi/2)$ e é abruptamente truncada quando $H=H(0)$. O espectro resultante é a superposição de quatro linhas $(2M_I+1)$ do tipo ilustrado na figura 7. A figura 9 ilustra um espectro típico de cobre em solução congelada (espectro de pó). Os quatro picos de baixa intensidade estão associados com $A_{//}$ e $g_{//}$ e os mais intensos com $A_{\perp}$ e $g_{\perp}$. Geralmente nos complexos de Cu^{2+} com proteínas o fator $A_{\perp}$ é pequeno não permitindo uma boa resolução nesta região.

Podem também ocorrer interações superhiperfinas com núcleos vizinhos. O caso mais comum em proteínas é a interação isotropica com nitrogênios, esta interação pode ser incluída agregando o termo $a_N M_I^N$ de acoplamento superhiperfino à expres-

-são (18), onde a_n é o desdobramento superhiperfino e os valores M_I^N dependem do número de nitrogênios magnéticamente equivalentes de M_I .

Figura 9 - Espectro típico do Cu^{++} complexado em solução congelado. Na figura estão ilustradas os parâmetros de EPR.

II-4 - Marcadores de Spin

Os marcadores de spin mais utilizados são os nitróxidos (N-O). Estes radicais possuem grande estabilidade e a sua química de síntese está bastante desenvolvida existindo cerca de 100 tipos diferentes. A estrutura geral deste marcador está mostrada na figura 10. R_1 e R_2 são radicais convenientes para proporcionar a interação com a proteína.

O sinal de EPR provém do elétron desemparelhado do oxigênio, como o isótopo mais abundante do oxigênio não possui momento magnético nuclear o desdobramento hiperfino deve-se à inte

-ração com o nitrogênio e prótons vizinhos, sendo a interação - com o primeiro determinante visto que de 80 à 90% da função de onda do elétron está confinada no orbital $2p\pi$ do nitrogênio.

(b)

Figura 10 - Esquema do radical nitróxido (a) e definição dos eixos moleculares do radical nitróxido (b).

Resolvendo a Hamiltoniana (7) na ausência do termo $\hbar \gamma \vec{h}(E) \cdot \vec{S}$ temos um tripleto com intensidades praticamente iguais e igualmente espaçado⁽²³⁾. A figura 11 ilustra o esquema de níveis e o espectro obtido.

O espectro mostrado na figura 11 é o mesmo obtido para um radical nitroxido em um solvente pouco viscoso como água, acetona ou metanol. Entretanto quando usamos um solvente mais viscoso ou resfriamos o solvente inicial o espectro muda significativamente. A explicação para essa mudança vem do fato que - com uma baixa viscosidade o marcador roda com uma frequência suficientemente alta para mediar o campo estocástico $\vec{h}(t)$ a zero e as anisotropias do tensor $\vec{g}$ e $\vec{A}$. A medida que a viscosidade aumenta essa média vai se tornando menos efetiva e ocorrem as mudanças espectrais (figura 12). Os espectros

Figura 11 - Desdobramento dos níveis de energia do spin eletrônico $S=1/2$ e sua interação com o spin nuclear $I=1$ em função do campo magnético.

podem ser caracterizados segundo o grau de mobilidade. Na região de movimentos rápidos temos "frequências de rotação" ν_c na faixa $10^{10} \leq \nu_c \leq 5 \cdot 10^8 \text{ Hz}$ e na região de movimento lento $5 \cdot 10^8 \leq \nu_c \leq 10^7 \text{ Hz}$.

Figura 12 - Espectro de um marcador de spin em solventes com viscosidades diferentes. Pode-se observar o efeito do tempo de correlação rotacional sobre o espectro.

Mc Connell, Kivelson e Freed & Frankel, dentre outros⁽²⁴⁾, desenvolveram teorias para a região de movimento rápido. A idéia destes autores era buscar uma relação entre o tempo de relaxação spin-spin (T_2), e portanto da largura de linha, e os parâmetros microscópicos como os tensores g , A e o tempo de correlação rotacional τ_c . O significado preciso de τ_c depende do modelo adotado para descrever o movimento do marcador, mas de um modo geral é o tempo que o marcador permanece numa determinada orientação em relação ao campo magnético.

A solução da Hamiltoniana (7) leva à seguinte fórmula-

-la para T_2 :

$$\frac{T_2(0)}{T_2(M)} = 1 - \left(\frac{4}{15} b \cdot \Delta\nu \cdot H \cdot T_2(0) \cdot M + \frac{1}{8} b^2 T_2(0) \cdot M^2 \right) \tau_c \quad (23)$$

deduzida com base nas seguintes hipóteses:

- 1) o movimento é isotropico;
- 2) a anisotropia magnética $\Delta\nu$ é pequena quando comparada com a frequência ν , i.é;

$$\Delta\nu = \frac{|\beta|}{\hbar} |g_z - 1/2(g_x + g_y)| \ll \nu$$

3) todos os mecanismos de relaxação, com exceção da interação elétron-núcleo, são isotrópicos;

4) as linhas espectrais são bem resolvidas e não se superpõe;

$$5) (\pi A_{iso})^2 \tau_c^2 \ll 1 \text{ onde } A_{iso} = 1/3(A_x + A_y + A_z);$$

6) a constante hiperfina é axialmente simétrica;

$$7) \omega^{-2} \ll \tau_c^2 \ll b^{-2}, \text{ onde } b = \frac{4}{3\pi}(A_{//} - A_{\perp}) \text{ e } \omega = \frac{g\beta H}{\hbar}.$$

Estas condições definem a região de movimento rápido ($10^{-10} \text{ s} < \tau_c < 2.15 \cdot 10^{-8} \text{ s}$). A equação (23) permite o cálculo de τ_c ou ν_c . Após substituir os valores numéricos para o tensor $\vec{g}$, $\vec{A}$, a frequência de operação do espectrômetro (Banda x, $\nu \approx 9 \text{ GHz}$) e lembrando que o valor de T_2 de cada linha é inversamente proporcional ao quadrado da intensidade da linha espectral podemos calcular as frequências de rotação do marcador usando diferentes linhas do espectro ($M_I = -1, 0, +1$). As frequências ν_c calculadas - desta maneira para cada linha valem:

$$\nu_{+1} = \frac{1}{\tau_{c(+1)}} = \frac{2 \cdot 10^8}{\left(\sqrt{\frac{h_0}{h_{+1}}} - 1 \right) \Delta H_0} \quad (24)$$

$$\nu_{-1} = \frac{1}{\tau_c(-1)} = \frac{3,3 \cdot 10^9}{\left(\sqrt{\frac{h_0}{h_{-1}}} - 1\right) \Delta H_0} \text{ Hz} \quad (25)$$

$$\nu_{\pm 1} = \frac{1,2 \cdot 10^{10}}{\left(\sqrt{\frac{h_{\pm 1}}{h_{-1}}} - 1\right) \Delta H_0} \text{ Hz} \quad (26)$$

Onde ΔH_0 é a largura da linha central em gauss, h_0 , h_{+1} e h_{-1} são as intensidades das linhas e $\nu_c = \tau_c^{-1}$ é a frequência de rotação. A figura 13 define estes parâmetros.

Figura 13 - Definição dos parâmetros experimentais a serem medidos para o cálculo de ν pelas expressões 24, 25 ou 26.

Para a região de movimento lento não é possível estabelecer uma função que permita o cálculo de τ_c diretamente a partir do espectro. Neste caso o espectro experimental tem que ser comparado com o espectro simulado teoricamente. Esta simulação depende do modelo proposto para o movimento do marcador e complica-se à medida que o tempo de correlação rotacional aumenta.

Goldman, Bruno e Freed⁽²⁵⁾ propuseram o parâmetro $S = A'_z/A_z$ para caracterizar o espectro. O valor de A_z é a meia distância entre as duas linhas externas do limite de rotação rígida e A'_z é a mesma grandeza para rotações lentas do marcador, a figura 14 mostra a definição destas grandezas.

FIGURA 14 - Superposição de dois espectros mostrando a definição dos parâmetros utilizados na determinação de τ . A linha contínua representa um espectro parcialmente imobilizado e a linha tracejada completamente imobilizado.

Verificamos que S é uma função monotônica de τ_R , a figura 15 ilustra a variação de S com τ_R para os modelos de difusão rotacional contínua, de saltos não correlacionados e difusão

livre, com $A_Z = 32$ G e largura pico a pico das derivadas igual a 0,3 e 3 G. As curvas da figura 15 podem ser ajustadas pela expressão:

$$\tau_R = a (1-S)^b \quad (27)$$

A Tabela IV fornece a e b para os três modelos em função da largura de linha, o ajuste tem um erro de 2, 3 e 5% no valor de τ_R para um dado S quando o cálculo é feito nos modelos de salto, difusão rotacional e livre.

Figura 15 - Gráfico de (1-S) em função de τ_R , ver Tabela IV.

TABELA IV - Parâmetros para o ajuste de τ_R

Modelo de Difusão	δ -largura de linha (G)	a	b	Curva
DEBYE	0,3	$2,57 \cdot 10^{-10}$	-1,78	A
	3,0	$5,4 \cdot 10^{-10}$	-1,36	B
	5,0	$8,52 \cdot 10^{-10}$	-1,16	—
	8,0	$1,09 \cdot 10^{-9}$	-1,05	—
LIVRE	0,3	$6,99 \cdot 10^{-10}$		C
	3,0	$1,10 \cdot 10^{-9}$		D
SALTOS NÃO CORRELACIONADOS	0,3	$2,46 \cdot 10^{-9}$		E
	3,0	$2,55 \cdot 10^{-9}$		F

CAPÍTULO III

MATERIAIS E MÉTODOS

1) Preparação da MbApB

O molusco *Aplysia Brasiliana* foi coletado no litoral norte de São Paulo (S. Sebastião) durante o verão. O músculo radular foi extraído e conservado à baixa temperatura (4°C). A seguir o músculo foi triturado em tampão fosfato (pH = 8,0) e o homogeneizado foi mantido em repouso durante 6 horas em banho de gelo com agitação intermitente para permitir a extração da Mb do músculo. Após esse período a solução foi centrifugada e o sobrenadante, contendo a Mb e contaminantes de baixo peso molecular, foi extraído. Para a remoção parcial destes contaminantes foi efetuado um fracionamento sucessivo com 50, 60 e 65% de sulfato de amônio. O pH foi estabilizado em 7,0, pela adição de hidróxido de amônio, e a temperatura em 0°C. Após cada adição a solução permanecia em repouso por 30 minutos e o precipitado era coletado por centrifugação à 0°C por 30 minutos a 5000 rpm. A MbApB é obtida por fracionamento com sulfato de amônio à 95% de saturação e o precipitado colorido coletado por centrifugação. Este material é diluído num volume mínimo de água e dializado exaustivamente para eliminação de sal.

A MbApB assim obtida está parcialmente purificada. A MbApB assim obtida está parcialmente purificada. A seguir a amostra foi cromatografada em uma coluna de Dietilaminaetil (DEAE)-Celulose. Duas frações dominantes são obtidas à pH=8,1 e pH=7,0, exibe um padrão eletroforético de proteína pura e foi utilizada neste trabalho ⁽¹³⁾. Este procedimento de extração e purificação fornece a MbApB na forma aquo-meta (MbApB-H₂O). Para as medidas de EPR as amostras foram concentradas em polietileno-glicol (PEG) até uma concentração final de -

1mM ($E_{400\text{nm}} = 113 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ ou $E_{508} = 13,8 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$).

2) Preparação da MbT

A mioglobina da tartaruga marinha "Dermochelis coriacea" (MbT) foi extraída dos músculos esqueléticos e purificada segundo o procedimento de Rossi-Fannelli⁽²⁶⁾. Após uma purificação parcial através de precipitação com sulfato de amônio, como mostrado na secção anterior, a proteína foi convertida na forma ciano-meta (MbT-CN) pela adição de KCN. A amostra foi então exaustivamente dializada à temperatura de 4°C contra água para eliminação do sal.

Seguindo-se à dialise foi realizada uma cromatografia em DEAE-Celulose, com gradiente de pH, eluída em tampão TRIS 0,05M, pH = 9,1. A fração principal obtida em pH = 8,8 foi analisada por eletroforese e mostra uma única banda, esta fração foi utilizada neste trabalho. A titulação desta fração com p-cloromercuribenzoato (PCMB) mostra a presença de um grupo SH acessível.

Após a purificação total a amostra foi concentrada com PEG até uma concentração final de 1mM, calculada através da absorção óptica em 540nm ($E_{540\text{nm}} = 10,7 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$).

3) Redução e Oxidação da forma MbT-CN

O cianeto ligado à 6ª posição de coordenação da heme pode ser removido através da redução do átomo de ferro. Esta redução foi realizada em meio alcalino (pH = 8,5), tamponado com TRIS, adicionando ditionito de sódio numa concentração 3 vezes maior que a da proteína. Após cerca de 3 minutos de reação a proteína adquire uma cor vermelho-lilás característica da deoxi-mioglobina. A redução do ferro se dá com o cianeto ainda ligado

à 6ª coordenação. Este composto é instável e dissocia-se em deoximioglobina e cianeto. A seguir a amostra foi cromatografada - em uma coluna de sephadex G-25 sob centrifugação (para se evitar a diluição da amostra) previamente equilibrada em pH = 7,0, com tampão fosfato 50mM⁽²⁷⁾. A deoximioglobina foi oxidada pela adição de ferricianeto de potássio, sendo o excesso eliminado - por cromatografia nas mesmas condições acima.

A oxidação foi realizada com uma concentração de ferricianeto igual à da MbT para se evitar efeitos laterais como a oxidação do grupo SH presente nesta proteína⁽⁵⁾.

4) Preparação da MbT-F

A flúor mioglobina (Mb-F) foi preparada pela adição de fluoreto de sódio (NaF) à uma solução de MbT-H₂O, até uma - concentração final 3 vezes à de MbT-H₂O. A reação se processou em pH neutro e o excesso foi eliminado por cromatografia em Sephadex G-25 como na secção anterior.

5) Preparação da MbT-No

A nitrosil-mioglobina foi obtida através da reação da MbT-H₂O com o gás NO. Este gás foi produzido reagindo-se ácido nítrico (30%) com cobre metálico em vácuo. O gás NO gerado - pela reação foi passado em água deoxigenada para lavagem e posteriormente armazenado num balão de vidro. Para realizar a reação com a MbT-H₂O utilizamos um tonômetro acoplado a um tubo de quartzo de 3mm de diâmetro. A amostra era introduzida no tonômetro e a solução deaerada fazendo-se vácuo no sistema com uma - bomba mecânica (10⁻³ mmHg). O gás NO era injetado na proporção - 1:1 e agitava-se o sistema para facilitar a reação. Após alguns minutos a amostra era transferida para o tubo de quartzo, sela-

-da e congelada (-130°C) para a medida de EPR.

6) Procedimento de marcação

A MbT-CN foi marcada com um marcador de spin específico para grupos SH. O marcador utilizado foi o 2,2,6,6,-tetrametilpiperidinoxil-4-maleimido (NEM*) cuja fórmula estrutural está ilustrada a seguir:

Foram preparadas soluções estoques do marcador em acetona de ~ 10mM. O procedimento para a marcação consistia em colocar num tubo de ensaio o volume adequado para obter-se uma relação final de 1 marcador para 1 proteína e evaporar a solução de marcador através de um fluxo de nitrogênio. A seguir a MbT-CN era adicionada ao tubo e a reação realizava-se por um período de 8-12 horas à 4°C .

Para eliminar o marcador livre a amostra era cromatografada em Sephadex G-25 sob centrifugação como anteriormente.

Para melhor caracterizar os sítios de ligação do marcador a MbT-CN foi pré incubada com cianeto de sódio (Na CN O), um bloqueador de N terminal, e com N-etilmaleimida durante 1 hora à 37°C e posteriormente marcada com NEM*, como descrito acima.

7) Complexação de Cu^{2+} e Mn^{2+} com MbApB

Soluções aquosas de cobre e manganês foram prepara-

-das usando o sal cloreto na concentração de 0,1M. A complexação do Cu^{2+} com MbApB ocorreu na ausência de tampões, visto que na região de interesse os tampões existentes competem com a mioglobina na formação de complexos com o Cu^{2+} . O pH foi variado pela adição de NaOH (1M) a soluções não tamponadas e medido após o sistema ter alcançado o equilíbrio.

8) Medidas de EPR

As medidas de EPR foram realizadas num espectrômetro Varian E-109, "Century Line", equipado com uma cavidade Varian "multi purpose" (E-231). O sistema opera em Banda X e foi utilizado 100 KHZ de modulação. As medidas à temperatura variável foram feitas com o auxílio do controlador de temperatura E-257/WL 257. As amostras foram colocadas em células planas de quartzo para as medidas em forma líquida e em tubos de quartzo para os experimentos com solução congelada. As demais condições serão especificadas para cada experimento.

9) Medidas de Temperatura

A temperatura foi medida com um termopar cobre-constantan colocado em contacto junto à amostra e conectado a um termômetro digital Fluke - 2100-A.

10) Medidas de Absorção Óptica

Para as medidas de absorção óptica foram utilizados os espectrofotômetros Beckman DK-2 e Cary 17 (Varian). Para as medidas à temperatura variável foi utilizado um banho termostaticado conectado ao porta cubeta.

11) Medidas de pH

O pH foi medido à temperatura ambiente com um pH-metro Ambriex equipado com um eletrodo semi-micro que permitia a medida de até 0,1ml de solução.

12) Tampões

Para as medidas de absorção óptica foram utilizados os seguintes tampões - pH < 5.0 tampão acetato 0,2M, $6 \leq \text{pH} \leq 8,0$ tampão fosfato 0,2M, e para $8.0 \leq \text{pH} \leq 10.8$ tampão Borato 2%. A força iônica foi mantida em 0,1 pela adição de KCl.

* DEAE - Dietilaminoetil celulose.

* TRIS - TRIS (hidroximetil) amino metano.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

IV-1) A transição ácida-alcalina da MbApB

A forma aquo-meta das mioglobinas e hemoglobinas - (Mb-H₂O e Hb-H₂O) exibe uma variação espectral dependente do pH que é atribuída à mudança do ligante na 6ª posição de coordenação. A pH baixo temos a água ocupando esta posição, este é um ligante fraco o que leva a uma configuração de alto spin. Em pH alto um próton da água é deslocado e a hidroxila passa a ocupar esta posição levando a uma configuração de baixo spin visto que o OH⁻ é um ligante forte. O estudo desta transição pode revelar detalhes da vizinhança do Fe³⁺ presente na heme.

A figura 16 mostra o espectro de absorção óptica obtido para a MbApB em função do pH⁽¹³⁾, são observados 3 pontos isobésticos em 486nm e 533nm indicativos de equilíbrio térmico entre as configurações de baixo spin e alto spin. Estes pontos ocorrem em comprimentos de onda bastante próximos aos encontrados para outras proteínas como a mioglobina de baleia, de elefante e humana, o que é indicativo de que estas proteínas são homólogas.

O parâmetro α definido como:

$$\alpha = \frac{A_{pH} - A_{pH=5,0}}{A_{pH=10,0} - A_{pH=5,0}} \quad (1)$$

onde A_{pH} é a absorção óptica em 590nm num dado pH, está apresentado em função do pH na figura 17. Neste caso α representa o grau de conversão da forma de alto spin para a forma de baixo spin visto que $A_{pH=5,0}$ é proporcional à concentração total de MbApB - na configuração de alto spin e $A_{pH=10,0}$ é proporcional à concen

-tração de baixo spin.

A figura 18 mostra o espectro de EPR do Fe^{3+} na MbApB em dois pHs diferentes, um característico da forma alto spin ($\text{pH}=6,0$) e outro da forma baixo spin ($\text{pH}=10,0$). A transição ácida alcalina monitorada através de intensidade do sinal em $g_{\perp} = 5,83$ está mostrada na figura 19 e possui um $\text{pK} = 7,2$, em boa concordância com o valor encontrado através de medidas de absorção óptica ($\text{pK} = 7,5$).

É interessante observar a figura 18b com mais detalhe. Na região de $g_{\perp} = 6,0$ o sinal sofre um desdobramento característico de uma distorção rombica. A rombicidade calculada pela expressão (16) do capítulo II fornece $R = 6,3\%$ e a relação entre os parâmetros de campo zero calculada segundo a expressão (15), Capítulo II, vale $E/D = 0,021$ para $g_x = 6,27$ e $g_y = 5,26$. Na região de $g_{\parallel} = 2$ temos um espectro característico de uma configuração de baixo spin porém com uma forma de linha bastante singular. Para outras mioglobinas estudadas o espectro nesta região apresenta 3 linhas associadas a g_x , g_y e g_z , muito bem resolvidas. No caso da MbApB a resolução destas linhas é baixa e os valores de g são: $g_x = 2,70$, $g_y = 2,08$ e $g_z = 1,82$. Na tabela V estão apresentados os valores do fator g obtidos para esta mioglobina e aqueles publicados por outros autores para outras mioglobinas. Estão listados também os valores de g obtidos para a mioglobina de tartaruga discutida a seguir (Secção IV-4).

O espectro da MbApB-F está mostrado na figura 20. O Fe^{3+} exibe uma simetria axial com alto spin evidenciada pela linha em campo baixo ($g_{\perp} = 5,93$), entretanto o sinal em $g_{\parallel} = 2,00$ é bastante diferente do observado para outras mioglobinas; o dubleto que normalmente aparece nesta região devido à interação com o spin nuclear do flúor não é observado. Além disso aparecem dois sinais adicionais com $g_1 = 4,18$ e $g_2 = 3,43$.

Tabela V - Valores do fator g para várias mioglobinas

Configuração de spin	Amostra	pH	g_x	g_y	g_z
Spin Alto	MbApB	6,0	5,83		-
		10,0	6,27	5,26	-
	MbT	7,0	5,95		-
		11,0	6,79	5,18	-
	MbApL	6,0	5,80		-
		9,0	6,3	5,2	-
	Mb(II)	7,5	5,90		1,99
Spin Baixo	MbApB	10,0	2,70	2,09	1,82
	MbT	11,0	2,56	2,20	1,90
	MbApL	9,0	2,67	2,15	1,77
	Mb(II)	11,33	2,57	2,14	1,84

MbApL - referência 34

Mb(II) - referência 8

Figura 16 - Espectro Óptico de MbApB-H₂O. As amostras com pH < 6,0 estão em tampão acetato 0,1M, com 6,0 ≤ pH ≤ 8,0 em tampão fosfato 0,1M e pH > 8,0 tampão borato 0,1M, a força iônica é 0,1 com KCl. Os pontos isobêsticos estão localizados em 486nm, 533nm e 630nm. (13)

Figura 17 - Curva de titulação da transição ácida alcalina da MbApB-H₂O. O parâmetro α representa o grau de dissociação e foi medido em $\lambda = 590\text{nm}$.

Figura 18 - Espectro de EPR do Fe^{3+} na MbApB- H_2O em dois pH's diferentes. As condições de medida foram: Potência 10mW, Modulação 5G, Temperatura -140°C . O ganho em (a) é $G = 1,25 \cdot 10^4$ e em (b) $G = 2,5 \cdot 10^4$. Os valores do fator g estão indicados na figura. A concentração da proteína utilizada foi 7mM.

Figura 19 - Transição ácida alcalina da MbApB-H₂O observada através do espectro de EPR do Fe³⁺ em $g^2 = 5,83$. Os pontos em círculos representam o sinal relativo do Fe³⁺ normalizado pelo sinal I₀ em pH = 6,0 (ordenada da esquerda). Os pontos em cruz representam o logaritmo da constante de equilíbrio ($\alpha/1-\alpha$) e estão gráficos em relação à ordenada da direita. A reta foi obtida por mínimos quadrados, assumindo uma transição entre dois estados.

Figura 20 - Espectro do Fe^{3+} na MbApB-F. Os valores de g estão mostradas na figura. A potência usada foi 10mW, modulação 10G, temperatura -150°C , ganho $1,25 \cdot 10^3$, pH = 7,5. A concentração da proteína foi 1,6mM. O traçado superior mostra o espectro amplificado 4 vezes.

IV-2) Interação de MBApB com Cu^{2+}

Os complexos de MbApB foram feitos com um ou mais e quivalentes de Cu^{2+} . A mioglobina estudada estava na forma aquo-meta. Estes complexos foram realizados na ausência de tampões, visto que os tampões normalmente usados na faixa de pH de interesse formam complexos com o Cu^{2+} mais facilmente que a MbApB. A formação do complexo Cu^{2+} : tampão pode ser facilmente verificada através do espectro de EPR. O espectro à temperatura ambiente de complexos de pêso molecular alto não difere muito do espectro em solução congelada ao passo que nos complexos de baixo pêso molecular a diferença é marcante. Isto de fato é observado para os complexos com tampões o que, juntamente com os valores dos parâmetros de EPR, permite identificar se o Cu^{2+} está sendo complexado com as moléculas de tampão ou mioglobina (28). Para evitar este problema após a purificação a MbApB foi exaustivamente dialisada contra água destilada com o objetivo de eliminar o tampão TRIS utilizado durante a fase de extração/purificação.

Na figura 21 são mostrados os espectros do complexo de MbApB com um equivalente de Cu^{2+} em dois pHs diferentes. À medida que o pH é aumentado o espectro evolui da forma mostrada na figura 1a para a forma 1b, indicando uma mudança de coordenação do complexo. Este comportamento foi observado para um grande número de experimentos na faixa de pH estendendo-se de 5,0 até 12,0. O espectro à pH mais elevado exhibe claramente a interação hiperfina na região de campo baixo, direção paralela, e pode ser observada a interação superhiperfina com pelo menos 3 nitrogênios na região de campo alto, direção perpendicular.

A transição de uma forma de espectro para outra pode ser acompanhada medindo-se a intensidade de uma das linhas -

desdobradas na região de $g_{\perp}$. A figura 22 mostra a intensidade - relativa da linha em $g_{\perp}$ característica de pH alto. Esta intensidade está indicada na figura 21b. A curva contínua é um ajuste teórico dos pontos experimentais assumindo a interconversão entre duas formas de complexo, uma característica de pH baixo e outra de pH alto. O pK aparente para a conversão do complexo obtido pelo ajuste teórico é $pK_a = 11,0$.

Os parâmetros de EPR obtidos experimentalmente para o espectro a pH = 11,5 são: $A_{\parallel} = (194 \pm 4)$ G, $g_{\parallel} = (2,261 \pm 0,002)$ e $g_{\perp} = (1,928 \pm 0,002)$. Estes parâmetros foram obtidos para soluções congeladas ($T = -150^{\circ}\text{C}$). Medidas realizadas à temperatura ambiente não revelaram o espectro característico do complexo, o que se deve provavelmente ao tempo de relaxação, spin-rede T_1 que deve ser muito curto à esta temperatura (25°C) que alarga - ria excessivamente a linha de absorção impedindo a sua detecção.

A existência do complexo MbApB: Cu^{2+} à temperatura ambiente será discutida com mais detalhe conjuntamente com o complexo MbApB: Mn^{2+} .

O sinal do Fe^{3+} em $g = 6,0$ foi monitorado em presença do Cu^{2+} nos diversos pHs e não foi observado nenhum efeito sobre a largura de linha do Fe^{3+} indicando a ausência de interação dipolar e portanto uma separação entre os íons maior que $10\text{\AA}$.

A medida da absorção óptica ($\lambda = 410$ nm) ou da intensidade do sinal de EPR obtido em $g = 6,0$ para o íon Fe^{3+} presente na heme é uma maneira conveniente de acompanhar mudanças conformacionais que ocorrem nas hemoproteínas.

Com o objetivo de verificar qual o número de íons de Cu^{2+} ligadas à MbApB que mantém inalterada a sua estrutura o sinal de EPR do Fe^{3+} em $g = 6,0$ foi monitorado em função do nú

-mero de íons Cu^{2+} .

A figura 23 mostra o sinal relativo do Fe^{3+} na MbApB em função do número de íons Cu^{2+} /MbApB adicionados à solução. Foram adicionadas alíquotas de 0,5 Cu^{2+} /MbApB. A mistura reacional foi mantida à 4°C durante 24 horas para permitir o equilíbrio do sistema ⁽⁸⁾ e a seguir congelada à -150°C para as medidas de EPR. O decréscimo da intensidade do sinal do Fe^{3+} para concentrações de cobre acima de 1 Cu^{2+} /MbApB sugere que mais do que um cobre ligado por molécula de proteína produz desnaturação ou seja a proteína mantém sua estrutura nativa somente com 1 Cu^{2+} /MbApB.

Figura 21 - Espectro de EPR do Cu^{2+} complexado com MbApB à -150°C . O pH foi variado pela adição de NaOH, 1M às soluções de MbApB não tamponadas. As demais condições experimentais são: Potência 10mW, Modulação 8,0G, ganho $G = 2,0 \cdot 10^4$ e concentração de proteína 0,5mM. As setas indicam desdobramento superhiperfino produzidos por núcleos de Nitrogênios.

Figura 22 - Sinal relativo do espectro do Cu^{2+} em função do pH.
A curva contínua é um ajuste teórico com $\text{pK}_a = 11,0$.
A intensidade I utilizada para abstenção dos pontos experimentais está indicada na figura 21-b.

Figura 23 - Intensidade relativa do sinal do Fe³⁺ na MbApB em função do número de Cu²⁺ adicionados por MbApB. As demais condições são idênticas ao espectro da figura 20.

IV-3) Interação de MbApB com Mn^{2+}

A caracterização completa dos complexos de Cu^{2+} com mioglobinas, isto é, determinação da constante de associação, número de sítios de ligação, possíveis quelatos formados, etc..., é um problema bastante trabalhoso e às vezes até impossível de ser realizado. Analisando as técnicas mais empregadas para o estudo destes complexos (EPR e Óptica), verificamos que o espectro óptico da Mb é bastante intenso numa ampla faixa de comprimento de onda superpondo-se ao espectro do complexo formado o que impede que técnicas ópticas sejam usadas satisfatoriamente. No EPR temos também uma superposição do espectro devido à existência de Cu^{2+} ligado e livre o que dificulta a análise dos resultados.

Uma maneira conveniente de se obter informações adicionais sobre o complexo com o Cu^{2+} é estudar a interação da proteína com o Mn^{2+} . O Mn^{2+} quando livre em solução apresenta um sexteto ($I=5/2$) igualmente espaçado cuja intensidade é linearmente proporcional à concentração numa ampla faixa. Entretanto quando este íon liga-se à proteína o tempo de relaxação do sistema torna-se tão curto que não podemos mais observar nenhum espectro. Pela diminuição da intensidade do sinal podemos calcular a concentração de Mn^{2+} ligado e desta maneira a constante de equilíbrio e o número de sítios de ligação. Posteriormente podemos verificar se o Cu^{2+} compete com o Mn^{2+} na ligação com a proteína obtendo desta forma informações sobre a ligação do Cu^{2+} .

A reação da MbApB com o Mn^{2+} pode ser descrita pela seguinte constante de equilíbrio:

$$K_A = \frac{[Mn^{2+}]_c}{[Mn^{2+}]_\ell [B\ell]} \quad (2)$$

onde $[Mn^{2+}]_c$, $[Mn^{2+}]_\ell$ e $[B\ell]$ são a concentração de manganês com-

-plexado, a concentração de manganês livre e a concentração de sítios livres respectivamente. A concentração de sítios de ligação livres pode ser expressa como:

$$[B_\ell] = n[MbApB] - [Mn^{2+}]_c \quad (3)$$

onde n é o número de sítios de ligação para o metal na proteína e $MbApB$ é a concentração de mioglobina de *Aplysia Brasiliana*.

A equação de equilíbrio pode ser rearranjada usando a condição (3):

$$\frac{[MbApB]}{[Mn^{2+}]_c} = \frac{1}{[Mn^{2+}]_\ell} \cdot \frac{1}{K_A \cdot n} + \frac{1}{n} \quad (4)$$

Se fazemos um experimento no qual a $[Mn^{2+}]$ total é mantida constante e variamos a $[MbApB]$, podemos construir um gráfico de Hughes & Klotz (29,30) no qual a inclinação da reta será proporcional a $(K_A \cdot n)^{-1}$ e o valor da ordenada no ponto de interseção fornece n^{-1} .

A figura 24 ilustra o gráfico de Hughes & Klotz obtido para o complexo Mn^{2+} : $MbApB$. A concentração total de manganês empregado foi de $4,73 \cdot 10^{-2}$ mM e a concentração total de proteína variou de 0,095 até 1,14 mM. A constante de ligação encontrada por este método é $K_A = 8,05 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ e o número de sítios de ligação por molécula é $n = 1,52$.

Para verificar se o Cu^{2+} e o Mn^{2+} competem na ligação com a proteína realizamos um experimento no qual o Mn^{2+} inicialmente livre era complexado com a $MbApB$ resultando na redução da intensidade do espectro de EPR do Mn^{2+} e a seguir adicionamos Cu^{2+} à solução. O espectro inicial do Mn^{2+} livre em solução foi recuperado indicando que existe competição entre os íons.

A figura 25 ilustra este resultado que além de mostrar que os

sítios de ligação do Cu^{2+} e Mn^{2+} estão relacionados, prova que o complexo $\text{Cu}^{2+}:\text{MbApB}$ existe realmente à temperatura ambiente.

Figura 24 - Gráfico de Hughes & Klotz para interação de Mn^{2+} com MbApB. Os índices l e c referem-se ao Mn^{2+} livre em solução e complexado com a proteína. A concentração de Mn^{2+} livre em solução é diretamente proporcional à intensidade da derivada do sinal de EPR.

Figura 25 - Espectro do Mn^{2+} livre em solução. A linha contínua mostra o espectro do Mn^{2+} não complexado com a proteína. A linha tracejada ilustra o sinal do Mn^{2+} após a adição de Cu^{2+} à solução. Existe um aumento de 50% na intensidade do sinal do Mn^{2+} indicando competição entre os íons.

IV-4) A transição ácida alcalina da MbT

O espectro de absorção óptica para vários pHs está ilustrado na figura 26 para a forma aquometa. O conjunto de espectros exibe claramente três pontos isosbéticos em 494nm, 525nm e 620nm indicando um equilíbrio térmico entre os estados de spin. O gráfico inserido mostra o parâmetro α calculado de modo semelhante ao mostrado na secção III-1 com o pH variando entre 7,0 e 10,0. A é a absorção óptica medida em 590nm à 25°C. Este comprimento de onda foi escolhido por ser o centro de uma banda de absorção razoavelmente larga e pela absorção óptica ser menos sensível à diluições (ϵ menor) ficando a variação espectral quase exclusivamente dependente do pH. O pK da transição ácida alcalina é 8,4, da ordem de 0,5 unidade de pH menor que o encontrado para a Mb(II) ⁽⁸⁾ e similar ao da mioglobina de elefante ⁽³¹⁾.

A figura 27 mostra o espectro de EPR do Fe^{3+} para a MbT-H₂O nos pHs 7,0(a), 9,3(b) e 11,0(c). Os valores de g estão listados na tabela V em comparação com os valores previamente publicados por outros autores para a mioglobina de baleia ⁽³²⁾.

O espectro em pH = 7,0 é característico de uma configuração de alto spin ($S = 5/2$) num campo cristalino com simetria axial. À medida que o pH é elevado o sinal em $g = 5,95$ diminui em intensidade e é desdobrado em dois sinais, um com valor de g maior que 5,95 e outro com g menor. Estes sinais aparecem à medida que o sinal em $g = 5,95$ diminui sugerindo uma interconversão de espécies. A ocorrência destes dois sinais na região de campo baixo pode ser explicada pela existência de duas populações de spin. O sinal em $g_{\perp} = 5,95$ é característico de uma configuração de alto spin num campo cristalino axial sem distorção. Já os sinais que aparecem em $g_x = 6,79$ e $g_y = 5,18$ po-

-dem ser atribuídos à uma quebra de simetria no plano da heme devido à uma distorção rombica do campo cristalino. Este sinal ainda é proveniente da configuração de alto spin ($g \approx 2S+1$) e a terceira componente do espectro aparece em $g_z = 2,12$ em $\text{pH}=11,0$. Além das duas espécies de alto spin (uma com simetria axial e outra distorcida) o espectro em $\text{pH} = 9,3$ exibe na região de campo alto (região de $g = 2$) um conjunto de linhas típico de uma configuração de baixo spin. Em $\text{pH} = 11,0$ a espécie de alto spin com simetria axial desaparece completamente dando lugar a duas populações com spin alto e baixo num campo cristalino com distorção rombica. A linha central do espectro na região de campo alto mostrada na figura 27c está desdobrada em duas linhas; uma com $g_{yb} = 2,20$ e outra com $g_{za} = 2,12$, os índices "b" e "a" referem-se às populações de baixo e alto spin respectivamente.

Usando as fórmulas (15) e (16) do Capítulo II temos $E/D = 0,034$ e 10% de rombicidade.

O espectro da nitrosil mioglobina (MbT-NO) em $\text{pH}=7,0$ é mostrado na figura 28. Este espectro é similar ao da Mb(II)-NO e das cadeias β da hemoglobina humana (Hb A). Nesta figura temos também o espectro do flúor-mioglobina (MbT-F) em $\text{pH} = 7,0$. Este espectro também é semelhante ao da Mb(II)-F e HbA-F exibindo uma configuração de alto spin com simetria axial; o doubleto que aparece na região de $g = 2,0$ é devido à interação do spin efetivo ($S = 1/2$) do elétron do Fe^{3+} com o spin nuclear do Flúor ($I = 1/2$), sendo que o desdobramento de 44 Gauss é igual ao observado para outras Mb's e Hb's.

Na figura 29 o sinal relativo em $g_{\perp} = 5,95$ e $g_{\parallel} = 2,19$ foi graficado em função do pH , extendendo-se de pH s ácidos até pH s alcalinos menores que 11,0, isto porque acima de $\text{pH} = 11,0$ o sinal em $g_{\parallel}$ é desdobrado. (Ver figura 27). A altura do pico

na região de campo baixo ($g_{\perp} = 5,95$) é proporcional à concentraação de spins com simetria axial e a altura do pico central na região de campo alto ($g_{//} = 2,19$) corresponde à soma das concentrações das espécies com distorção rombica de alto spin e baixo spin.

Figura 26 - Espectro Óptico de MbT-H₂O em função do pH. Os tampões utilizados são os mesmos citados na figura 16. Os pontos isosbéticos estão situados em 494nm, 525nm e 620nm. O gráfico inserido mostra a curva de titulação da transição ácida-alcalina com um pK = 8,4.

Figura 27 - O espectro de EPR do Fe^{3+} para $\text{MbT-H}_2\text{O}$, em vários pHs. (a) $\text{pH}=7,0$, (b) $\text{pH}=9,3$ e (c) $\text{pH}=11,0$. A potência foi 10mW, modulação 40G, temperatura -150°C . Os valores de g estão indicados nos espectros.

Figura 28 - Espectro de EPR do Fe^{3+} na MbT-F e da MbT-NO ambos à -150°C e $\text{pH}=7,0$. Os valores de g estão indicados na figura, pode-se observar para a MbT-F o aparecimento do dubleto com $g = 2,02$ devido à interação do elétron com o spin nuclear do flúor, a separação das linhas do dubleto é 44G.

Figura 29 - Sinal relativo da linha de EPR do Fe^{3+} na MbT- H_2O em função do pH. Os pontos cheios mostram o sinal em $g_{\perp}$ e os círculos em $g_{\parallel}$. A normalização foi feita usando o espectro obtido a pH = 7,0.

IV-5) Mudanças conformacionais induzidas termicamente na MbT

O espectro de EPR da mioglobina de tartaruga na forma cianometo (MbT-CN) marcada com o marcador de spin derivado da maleimida (NEM*) é mostrado na figura 30a. Este marcador liga-se covalentemente à proteína e o espectro mostra a existência de duas populações de radicais com diferentes graus de mobilidade, o fragmento espectral associado à fração de radicais mais imobilizada aparece nos extremos do espectro, sendo que a inserção mostra essa região com um ganho maior para uma melhor análise.

O marcador NEM* liga-se preferencialmente aos grupos SH da proteína e tem sido utilizado como uma sonda estrutural, entretanto outros grupos podem reagir com este marcador. No caso da mioglobina de baleia este marcador liga-se tanto às histidinas quanto ao N-terminal, uma vez que esta proteína não possui cisteínas. A MbT possui uma cisteína, provavelmente deve possuir histidinas e o N-terminal pode estar livre. O grupo SH da cisteína é bastante acessível de maneira que é razoável supor que o NEM* está ligado a este resíduo. Com o objetivo de testar esta hipótese e obter informações adicionais sobre a fração mais livre do espectro foram realizados alguns experimentos controles.

Na figura 30b e 30c são mostrados os espectros da MbT previamente tratada com o cianato de sódio (NaCNO) e N-etil maleimida. Na condições em que foram realizadas estes experimentos o NaCNO bloqueia o N-terminal e o NEM os grupos SH. Das figuras pode-se observar que o pré-tratamento com cianato não altera o sinal enquanto que no caso do NEM o sinal imobilizado é bastante reduzido.

A figura 31a mostra o espectro da Mb(II) marcada com NEM* nas mesmas condições que a MbT-CN. Neste espectro, regis -

-trado à mesma temperatura que as da figura anterior, não é observada a fração imobilizada.

Titulando-se o grupo SH na MbT pelo método de Boyer⁽³³⁾ verificamos que o SH no caso da MbT-NEM e MbT-CN-NEM* está bloqueado.

Estes resultados sugerem que o sinal mais imobilizado está associado ao grupo SH e o mais livre ao marcador ligado em histidinas. Os resultados do pré-tratamento com o NaCNO permitem inferir que o N-terminal não interage com o NEM*.

Com o objetivo de verificar as acessibilidades das diferentes espécies de radicais foi realizado um experimento de redução do sinal de EPR por ácido ascórbico. O espectro de EPR da fração imobilizada e livre foi monitorado em função do tempo. Ambos os sinais decrescem em função do tempo na presença de 0,1mM de ácido ascorbico, pH = 7,0, com a mesma taxa inicial de decaimento $K = 2,33 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, indicando que a acessibilidade é a mesma para ambos os radicais (livre e imobilizado). O pré-tratamento com NaCNO ou NEM não altera este resultado.

Para detectar possíveis mudanças conformacionais induzidas pela temperatura foi estudada a variação térmica do espectro da MbT-CN-NEM* (Ver figura 31b). A frequência de rotação ν foi calculada para a região livre do espectro segundo a expressão (26), para a região do espectro ligada ao marcador mais imobilizado foi medido o parâmetro $2A_{\text{máx}}$ que está ligado ao tempo de correlação rotacional desta espécie de marcador. Na figura 32 temos a dependência da frequência ν com a temperatura para uma amostra em pH = 7,0. Existe uma transição à temperatura de 30°C, as energias de ativação foram calculadas nas faixas abaixo e acima desta transição. Experimentos semelhantes foram realizados para outros pHs e os dados são mostrados na tabela VI.

O parâmetro $2A_{\text{máx}}$ mostrado na figura 33 para a mesma amostra também exibe uma transição com $T_c = 21^\circ\text{C}$, os dados para outros pHs para a espécie imobilizada também estão na tabela VI. Os dados desta tabela obtidos através de ν e $2A_{\text{máx}}$ indicam que o pH de máxima estabilidade para a proteína é 8,5.

Na figura 34 são apresentados os resultados da desnaturação térmica monitorada pela absorção óptica do Fe^{3+} na MbT-CN nativa para o pH de máxima estabilidade (pH = 8,5). O parâmetro α é definido como:

$$\alpha = \frac{A(T_{\text{min}}) - A(T)}{A(T_{\text{min}}) - A(T_{\text{máx}})}$$

onde $A(T)$ é a absorção óptica em 409nm em função da temperatura. Como $A(T_{\text{min}})$ é proporcional à concentração de proteína nativa e $A(T_{\text{máx}})$ à concentração de proteína desnaturada este parâmetro é a fração de proteína convertida do estado nativo para o estado desnaturado. A entalpia do processo calculada pelo gráfico de Van't Hoff (figura 35) está listada na Tabela VI e a temperatura de transição é $T_{1/2} = 64^\circ\text{C}$.

Figura 30 - Espectro de EPR da MbT-CN marcada com NEM*. (a) mioglobina nativa. O ganho foi aumentado 5 vezes nos extremos para melhor resolução do sinal imobilizado. (b) mioglobina pré tratada com cianato de sódio por 1 hora à 37°C e depois marcada. (c) mioglobina pré tratada com N-etilmaleimida por 1 hora e depois - marcada. Todos os espectros foram registrados à temperatura ambiente (25°C).

Figura 3la - Espectro de EPR da mioglobina de baleia (Mb(II)) marcada com NEM* à temperatura ambiente (25°C).

Figura 3lb - Espectro de EPR da MbT-CN-NEM* em diferentes temperaturas, também são mostrados as regiões de campo alto e baixo amplificadas

Figura 32 - Dependência da frequência de rotação com a temperatura para MbT-CN-NEM* em pH = 7,0. Este parâmetro está associado à fração livre do sinal de EPR.

Figura 33 - Dependência térmica do parâmetro $2A_{\text{máx}}$ para a MbT-CN-NEM* em $\text{pH} = 7,0$. Este parâmetro está associado à fração imobilizada do espectro.

Figura 34 - Dependência térmica do parâmetro α , fração de proteína desnaturada, obtido pela medida da absorção óptica em 409nm para a MbT-CN em pH = 8,5.

Figura 35 - Gráfico de Van't Hoff para a obtenção da entalpia ΔH . Como α é fração de proteína desnaturada - $\alpha/(1-\alpha)$ é constante de equilíbrio do sistema, admitindo um modelo de 2 estados. Este gráfico foi - construído a partir dos dados da figura 34.

Tabela VI

Temperaturas críticas e energias de ativação obtidas para a MbT-CN a partir de experimentos de EPR e Óptica em diferentes pH's.

pH	$T_c(2A_{\max})$, °C	$T_c(\nu)$, °C	$T_{1/2}(\alpha)$, °C	$E_a(\nu)$, Kcal/mol	$\Delta H(\alpha)$, Kcal/mol
7,0	21	30	-	4.4 ^a 2.1 ^b	-
8,0	20	40	-	5.1 ^a 1.3 ^b	-
8,5	28	44	64	5.3 ^a 2.7 ^b	40.0
9,2	20	33	-	6.1 ^a 1.8 ^b	-

a - acima da transição

b - abaixo da transição

CAPÍTULO V

DISCUSSÃO

V-1) A Transição Ácida Alcalina da MbApB.

O espectro de absorção óptica da MbApB-H₂O comporta-se de maneira análoga ao de outras mioglobinas. Quando o pH aumenta o espectro na região de Soret diminui de intensidade enquanto que na região de 590nm (banda α) temos um aumento de intensidade com o aumento do pH. Isto permite determinar o pK da transição ácida-alcalina; este pK para a MbApB é 7,5 bastante próximo ao encontrado para Aplysia Limacina (MbApL) que é pK = 7,6⁽⁵⁾. Esta transição também pode ser monitorada pelo espectro de EPR do Fe³⁺ presente na heme. O valor do pK da transição ácida alcalina obtido pelo sinal de EPR em g = 5,83 é 7,2, semelhante ao encontrado nas medidas de óptica. É interessante notar que o espectro de EPR é medido à temperatura de -150°C, uma temperatura bastante diferente das encontradas nos seres vivos, e o espectro de absorção óptica à temperatura ambiente (25°C), que é próxima da temperatura fisiológica. Entretanto neste caso em particular o parâmetro relevante (pK) exhibe o mesmo valor - (dentro do erro experimental) quando medido pelas duas técnicas o que aumenta a significancia dos resultados de EPR obtidos à baixa temperatura.

Esta mudança do valor do pK da transição ácida alcalina em relação a Mb(II) era esperada para a MbApB pois à semelhança da MbApL, esta mioglobina não possui a histidina distal (E7) o que muda significativamente a hidrofobicidade do meio onde está inserida a heme. No caso da Mb(II) este pK é 8,99 indicando que uma alta concentração de hidroxilas é necessário para remover o próton da água e deixar o OH⁻ ligado à 6ª coordena

-ção do Fe^{3+} . Para a MbApB esta concentração é bem menor. Esta facilidade para remover o próton no caso da MbApB é explicada pela ausência da His distal, pois no caso da Mb(II) a água forma ponte de hidrogênio com esta histidina.

O espectro de EPR do Fe^{3+} a $\text{pH} = 6,0$ (figura 18a) exibe uma simetria axial com $g_{\perp} = 5,83$, spin alto. O sinal de baixa intensidade que aparece em $g = 4,24$ é devido a uma pequena fração de proteína no estado desnaturado ⁽⁸⁾. O sinal na região de $g = 2,00$ normalmente é pouco intenso e difícil de ser detectado. Para a Mb(II) praticamente não temos absorção nesta região enquanto que a MbApL possui uma linha alargada nesta região com uma relação de intensidade de 1/5 quando comparada com a intensidade da linha em $g_{\perp}$ ⁽³⁴⁾, semelhante à existente no espectro mostrado na figura 18a.

Em $\text{pH} = 10,0$ (figura 18b) o espectro do Fe^{3+} exibe na região de campo baixo um sinal característico de spin alto com distorção rombica. Esta distorção é igual à encontrada para a MbApL e vem da ausência da His E7 que provoca uma quebra de simetria do campo cristalino no plano da heme.

Na transição ácida-alcalina da Mb(II) o sinal do Fe^{3+} diminui com o aumento do pH na região de $g = 6,00$, permanecendo a pH alto somente um sinal residual, desenvolvendo-se um sinal na região de $g = 2,00$ com valores de g_x , g_y e g_z nitidamente definidas onde a separação dos picos extremos é $\Delta g_{xz} = g_x - g_z = 0,73$.

Para a MbApB o sinal existente em $g_{\perp} = 5,83$ é completamente convertido em dois sinais em $g_{xa} = 6,27$ e $g_{ya} = 5,26$, com intensidade considerável, característico de alto spin e um sinal de baixo spin com valores de g pouco resolvidas na região de campo alto.

O sinal de baixo spin (pH alto) observado para a MbApL possui um conjunto de 3 linhas mais largas que a Mb(II) com valores $g_x = 2,67$, $g_y = 2,15$ e $g_z = 1,77$, a separação entre os picos extremos é $\Delta g_{xz} = 0,90$ indicando também uma maior separação das linhas. Para a MbApB temos na configuração baixo spin $g_x = 2,70$, $g_y = 2,08$ e $g_z = 1,87$, neste caso $\Delta g_{xz} = 0,88$ é semelhante ao encontrado para a MbApL, porém o sinal é bem mais alargado.

Este alargamento de linha pode ser explicado através da diminuição do tempo de relaxação spin-rede (T_1) do Fe^{3+} , entretanto se este fosse o mecanismo de alargamento dominante o sinal de alto spin (Δ pequeno) deveria ter sua linha mais alargada que o sinal de baixo spin o que não é observado. Uma outra possibilidade para explicar este fenômeno é supor uma distribuição dos valores de g devido às flutuações no posicionamento do plano da heme. Esta hipótese foi testada com sucesso para cristais da azido e meta mioglobina de baleia para explicar a variação da largura de linha em $g = 6,0$ do sinal do Fe^{3+} (35). Como a MbApB não possui a histidina distal, que no caso da forma aquo-meta forma uma ponte de hidrogênio com a água "ancorando" - juntamente com a histidina proximal a heme, esta possibilidade de existência de fatores g variando de uma proteína para outra ganha mais subsistência. Esta hipótese parece indicar também que a água exerce um papel estabilizante no posicionamento da heme.

O espectro 18b mostra a coexistência de duas populações de spin (alto e baixo) que pode ser explicado supondo-se - que o desdobramento de campo zero Δ é da mesma ordem de grandeza que a energia de intercâmbio dos spins. Este assunto será - tratado com mais detalhes na discussão da transição ácida-alcalina da MbT.

A mudança do campo cristalino na região da heme também é evidenciada pelo espectro da MbApB-F (figura 20). Normalmente o elétron desemparelhado do Fe^{3+} se delocaliza sobre o F^- e observamos um desdobramento do sinal na região de $g_{\parallel}$ devido à interação com o spin nuclear do flúor ($I = 1/2$). Neste espectro o elétron parece estar pouco localizado sobre o flúor, isto pode ser entendido supondo-se que a região distal da heme possui um arranjo de cargas que repele a nuvem eletrônica em direção à região proximal.

Os resultados obtidos para a MbApB-NO⁽³⁶⁾ mostram um espectro com interação hiperfina com dois nitrogênios magneticamente equivalentes. Um dos nitrogênios é o presente no fragmento N-O e o outro é o N_{ϵ} da histidina proximal, produzindo portanto uma interação superhiperfina. Estes resultados vão de encontro com a hipótese proposta para explicar o espectro da MbApB-F.

O sinal presente em $g = 4,18$ pode ser atribuído a proteína desnaturada e o sinal em $g = 3,43$ não tem até o presente uma explicação consistente.

V-2) Interação de Cu^{2+} e Mn^{2+} com MbApB

Os espectros do complexo de Cu^{2+} com a MbApB estão mostradas na figura 21. O espectro à $\text{pH} = 6,0$ não exhibe claramente a interação hiperfina devida ao fator $A_{\parallel}$, provavelmente as linhas associadas a este termo devem ser largas e o desdobramento é grande. À $\text{pH} = 12,0$ a resolução do sinal é melhorada e os parâmetros de EPR podem ser medidos diretamente do espectro. Na região de $g_{\perp}$ é observada a interação com pelo menos 3 nitrogênios.

A melhora da resolução para o espectro à $\text{pH} = 12,0$ está associada aos parâmetros A e g que agora possuem valores convenientes e ao tempo de relaxação do sistema que agora deve ser diferente devido à mudanças nos ligantes que formam o quelato.

Analisando a tabela II verificamos que à pH ácido - vários grupos podem participar do complexo com Cu^{2+} , à pH básico além dos aminoácidos listados temos os grupamentos amina da cadeia polipeptídica. Propor um quelato nestas condições - para o Cu^{2+} na MbApB é uma tarefa muito difícil. A única coisa que pode ser dita com certeza é que pelo menos três nitrogênios participam do complexo formado à pH alto. Por outro lado o ajuste teórico dos pontos experimentais obtidos através da titulação do complexo permite estabelecer que somente dois tipos de complexo são formados.

A estrutura da proteína mantém a forma nativa quando somente um íon Cu^{2+} é complexado com a mioglobina, sendo que quando mais de 1 Cu^{2+}/Mb está presente na solução a proteína - desnatura-se.

O estudo da interação com o Mn^{2+} permite obter in-

-formações sobre o complexo de MbApB com o Cu^{2+} e Mn^{2+} . A constante de complexação do Mn^{2+} é $8,05 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ está constante é característica de um complexo intermediário. O fato de não termos um complexo forte, isto é, a constante de complexação é baixa, não permite um cálculo do número de sítios com muita precisão. O valor encontrado através do gráfico da figura 24 deve ser criticamente analisado. Um cálculo do desvio padrão, fornece um valor da mesma ordem de grandeza que o encontrado para a intersecção com a ordenada. Portanto assumir o valor para $n=1$ é bastante razoável. Além disso o espectro com o Cu^{2+} é bastante claro e não exibe superposição de modo que a hipótese de 1 sítio por proteína é válida.

O experimento de competitividade com o Cu^{2+} indica que a estabilidade do complexo $\text{Cu}^{2+}:\text{MbApB}$ é maior que a do complexo $\text{Mn}^{2+}:\text{MbApB}$. A adição de Cu^{2+} à solução de MbApB complexado com Mn^{2+} provoca uma liberação de Mn^{2+} do complexo para a solução que aumenta a intensidade do sinal em 50%. Na figura 25 temos o registro do espectro antes (linha contínua) e após a adição do Cu^{2+} (linha tracejada) mostrando este incremento da concentração de Mn^{2+} livre em solução. Esta experiência assegura que o cobre realmente está complexado com a MbApB à temperatura ambiente e não é observado somente pelo fato da relaxação ser excessivamente curta.

V-3) A Transição Ácida Alcalina da MbT

Os espectros de absorção óptica obtidos para a MbT-H₂O na região visível do espectro (figura 26) são bastante semelhantes aos obtidos para outras Mb's como a de baleia, humana e elefante. Os pontos isosbéticos são quase idênticos aos obtidos para estas proteínas. Isto é uma evidência de grande homologia entre estas Mb's. Entretanto sabemos que a MbT possui algumas características interessantes como a existência de um grupo SH facilmente titulável. Este fato motivou-nos a estudar com um pouco mais de detalhe outras regiões da estrutura proteica.

O pK da transição ácida alcalina é 8,4, ligeiramente menor que o pK da mesma transição para a Mb(II) e semelhante ao pK da Mb de elefante⁽³¹⁾. Esta variação do pK pode ser explicada por mudanças na hidrofobicidade do bolso onde está inserida a heme e ou por mudanças na distribuição de cargas na região distal da heme. Isto de fato foi confirmado pelas medidas de EPR.

O Fe³⁺ na heme está num campo cristalino octaédrico com possibilidades de distorção tetragonal e rombica. O espectro a pH = 7,0 é característico de uma configuração de alto-spin com simetria axial e os valores do fator g são muito próximos dos já publicados para essa configuração em outras Mb's. (veja Tabela V e figura 27). À medida que o pH é aumentado o espectro evolui de uma maneira diferente daquela observada para a Mb(II). Além do aparecimento de um sinal na região de campo alto correspondente a uma configuração de baixo spin temos a formação de um espectro na região de campo baixo característico de uma população de alto spin com distorção rombica.

O desdobramento do sinal na região de campo baixo a-parece devido ao fato que a simetria axial, que tornava as direções x e y magnéticamente equivalentes, deixa de existir. Isto pode ser explicado através de uma distorção rombica do campo - cristalino descrita na Hamiltoniana (5) pelo termo E. Várias hemoproteínas exibem esta distorção na região da heme. As possí - veis causas para esta quebra de simetria são a substituição dos aminoácidos nas posições distal da heme e ou posicionamento não axial do resíduo distal. Como exemplo do primeiro caso temos a mioglobina de *Aplysia Limacina*⁽³⁴⁾ que não possui a histidina - distal ou a HbM Saskatoon que tem a histidina E-7 substituída - por uma tirosina. Para a segunda situação temos as cadeias α da HbA que possuem os mesmos aminoácidos na região da heme que as cadeias β mas têm a histidina distal ligeiramente inclinada em relação ao eixo de simetria, isto leva a um espectro de EPR desdobrado na região de $g \approx 6,0$ para as cadeias α que não é obser - vado para as cadeias β ⁽³⁷⁾.

Wickman et al⁽³⁸⁾ realizaram um estudo detalhado do Fe^{3+} no Ferrichromo A. Os cálculos dos níveis de energia da Ha - miltoniana de spin apresentados por esses autores permitem pre - ver os possíveis valores do fator g e consequentemente interpre - tar o espectro de EPR quando distorções tetragonal e rombica estão presentes no campo cristalino. De um modo geral para o du - bleto de Kramers de mais baixa energia ($S = \pm 1/2$) quando a rela - ção E/D aumenta o espectro na região de $g_{\perp}$ se desdobra com fato - res g_x e g_y , sendo que g_x diminui com o aumento de E/D e g_y au - menta, o fator $g_{\parallel} = g_z$ diminui com o aumento da relação E/D .

Este modelo pode ser usado em nosso caso. O espectro de EPR observado em $pH = 11,0$ apresenta na sua região de campo baixo um comportamento exatamente como o descrito por Wickman et al., enquanto que na região de campo alto temos um espectro

característico de uma configuração de baixo spin, semelhante à observada para a transição ácida-alcalina medida por EPR para a Mb(II) ⁽⁸⁾. A figura 27 mostra claramente esta sequência de conversão das diferentes configurações de spin. A coexistência das duas configurações de spin à pH alto não deixa de ser um fato - interessante pois pode ser explicada pela presença de uma conformação proteica na qual o desdobramento de campo cristalino Δ é da mesma ordem de grandeza da energia de intercâmbio entre os elétrons o que permite que as configurações de alto spin e baixo spin ocorram simultaneamente.

Outra possibilidade para explicação deste efeito é a presença de diferentes tipos de hemes coexistindo em solução como ocorre com as hemoglobinas de alto peso molecular como a eritrocruorina de minhoca ⁽³⁹⁾. Aparentemente este não é o caso pois os espectros da MbT-F e MbT-NO são bastante semelhantes aos da Mb(II)-F e Mb(II)-NO.

O gráfico da intensidade relativa do sinal de EPR em $g_{\parallel}$ e $g_{\perp}$ em função do pH pode ser associado à concentração de moléculas na configuração de baixo e alto spins. O pK da transição obtido através deste gráfico é 8,3, que está em excelente acordo com o valor obtido pela medidas de óptica.

V-4) Mudanças Conformacionais Induzidas Termicamente na MbT

Um dos problemas fundamentais quando grupos ou sondas extrínsecas tais como íons de transição, marcadores de spin, cromofóros, etc... são utilizados para investigar mudanças conformacionais em proteínas é a localização do sítio de ligação e a identificação dos grupos ou resíduos de aminoácidos envolvidos na interação com estas sondas. O marcador de spin NEM* pode ligar-se facilmente ao grupo SH em pH = 7,0 e também ao NH₂-terminal e aos resíduos de histidina. Geralmente o grupo SH é tão reativo que em proteínas onde este grupo está presente a reação do NEM* com outros aminoácidos é pouco efetiva. Os resultados apresentados na figura 30 sugerem fortemente que o sinal imobilizado é devido ao marcador de spin ligado à cisteína presente na MbT. É interessante comparar os resultados obtidos neste trabalho para a mioglobina de tartaruga com aqueles obtidos para a hemoglobina humana e mioglobina de baleia. No caso da HbA o NEM* reage com o grupo SH da cisteína β 93⁽⁴⁰⁾ dando um sinal fortemente imobilizado. Na Mb(II), que não possui grupos SH, a reação se processa com histidinas. Porém a reatividade deste resíduo é tão baixa que um tempo mais longo de incubação é necessário (~ 48 horas) para permitir que a reação se complete. Estes dois exemplos nos mostram que no caso da HbA a reação com o grupo SH é tão efetiva que não existem outros grupos envolvidos na reação com o NEM*, entretanto para a Mb(II) a reação ocorre com certa dificuldade e envolve as histidinas. No caso da MbT é evidente que o NEM* reage com os grupos SH dando um sinal imobilizado. Este sinal não é tão fortemente imobilizado como na HbA - indicando que na MbT o grupo SH deve estar mais exposto que na HbA. Por outro lado o sinal livre observado na MbT aparece independentemente da temperatura de reação sugerindo que este ocor-

-re sempre conjuntamente com o sinal imobilizado.

Este sinal livre pode ser explicado de duas maneiras. Uma primeira hipótese é a de que ele corresponde a um marcador que está ligado ao mesmo grupo SH que fornece o espectro imobilizado mas numa conformação diferente da proteína. Neste caso o espectro composto da figura 30 representa um equilíbrio entre dois estados conformacionais do grupo SH. A segunda hipótese é que o marcador realmente se liga a dois resíduos diferentes, neste caso o sinal imobilizado corresponde à cisteína enquanto que o sinal livre à histidina.

O experimento de redução do sinal com ácido ascórbico revelou que as acessibilidades são iguais para o sinal livre e imobilizado. Este dado aparentemente vai de encontro à hipótese de existência de um equilíbrio conformacional entre dois estados para o grupo SH, entretanto esta experiência não é conclusiva pois podemos ter dois sítios diferentes (SH e His) igualmente acessíveis ao ácido ascórbico.

No caso da segunda hipótese ser a verdadeira a MbT-CN possui além de um grupo SH acessível pelo menos uma histidina - bastante reativa, provavelmente exposta, que deve ser responsável pelo sinal livre observado no espectro. Os dados de EPR somente não são suficientes para decidir entre uma hipótese e outra. Esta é uma questão que deve aguardar algum tempo até que a estrutura primária desta proteína esteja determinada para ser elucidada.

Os experimentos realizados para se estudar as mudanças conformacionais induzidos pela temperatura na MbT-CN estão sumarizados nas figuras 32, 33 e 34. Nas figuras 32 e 33 temos os parâmetros ν e $2A_{\text{máx}}$ associados à fração livre e imobilizada do marcador NEM* em função da temperatura. Na figura 34 temos o

parâmetro α (fração de proteína desnaturada) obtido através da absorção óptica do Fe^{3+} em função também da temperatura no pH de máxima estabilidade (8,5) para a proteína.

O estudo da desnaturação térmica de proteínas tem sido dirigido nos últimos anos para a detecção de estados, intermediários entre a forma nativa e a desnaturada. Os modelos teóricos existentes para o tratamento dos dados de desnaturação baseiam-se na hipótese de existência de dois estados conformacionais (nativo e desnaturado). Entretanto técnicas cinéticas como o "T-Jump" e medidas em equilíbrio térmico como o espectro de NMR de alta resolução em função da temperatura tem revelado que a transição da forma nativa para a desnaturada se dá através de etapas.

Investigar este processo com detalhe para diversas proteínas com o objetivo de desvendar o mecanismo de empacotamento que leva à estrutura terciária da proteína é uma importante tarefa da biofísica molecular.

Os vários mecanismos propostos admitem que alguns sítios na estrutura primária funcionariam como centros de nucleação promovendo a organização da estrutura proteica a partir de uma forma aleatória.

Os nossos resultados sumarizados na Tabela VI mostram que o comportamento geral já observado para outras proteínas, a temperatura de transição tanto para o sinal livre quanto para o imobilizado é dependente do pH decrescendo para pH's abaixo e acima de um valor de pH de máxima estabilidade. O valor deste pH para a MbT é 8,5. Esta variação de T_c em função do pH está relacionada com a exposição de grupos hidrofóbicos que é modulada pelo pH. A dependência de T_c com o pH já foi observada para a Mb(II) através da medida de absorção óptica do Fe^{3+} (41).

No pH de máxima estabilidade (8,5) foram obtidas as variações térmicas dos parâmetros experimentais $2A_{\text{máx}}$, ν e α . Estes parâmetros fornecem informações sobre a vizinhança do grupo SH, possivelmente da histidina marcada e do Fe^{3+} na heme. Da Tabela VI fica claro que um aumento da temperatura leva primeiramente a uma transição do parâmetro $2A_{\text{máx}}$ ($T_c = 28^\circ\text{C}$), depois do parâmetro ν ($T_c = 44^\circ\text{C}$) e finalmente do parâmetro α ($T_{1/2} = 64^\circ\text{C}$).

Estes resultados sugerem fortemente que quando aumentamos a temperatura ocorre um sequenciamento de eventos que leva à desnaturação da proteína. É interessante comparar as energias envolvidas nos diferentes processos. A energia de ativação pode ser calculada para a frequência de rotação ν (veja referência 24, página 126), a variação de energia devido à transição é da ordem de 3Kcal/mol . Para o parâmetro α a variação de entalpia associada é 40Kcal/mol . Estes dados nos dão uma idéia do quão sutil são as mudanças conformacionais observados à mais baixa temperatura. As mudanças conformacionais observadas na faixa de $30-50^\circ\text{C}$, dependentes do pH, tem sido descritas como uma pré desnaturação e foram observadas para Mb(II) ⁽¹²⁾, Mb de golfinho ⁽⁴²⁾ e MbApB ⁽⁴³⁾.

Podemos então concluir que os eventos que levam à desnaturação da proteína consistem de uma sequência de etapas onde primeiramente o marcador mais imobilizado (com movimentos mais restritos) sofre uma transição, a seguir o marcador mais livre que já estava bastante exposto ao solvente detecta uma mudança conformacional e finalmente a mudança ocorre no centro ativo como é relevado pela medidas de óptico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) BRESLER, S.E. - Sov.Phys.Usp. 18(1), 62-73 (1975).
- 2) A Base Molecular da Vida, Vários Autores, Ed.Polígono (1971).
- 3) HOPFIELD, J.J. - "Nobel Symposia on Collective Properties of Physical Systems" (1973).
- 4) LEHNINGER, A.L. - Bioquímica, Ed.Edgard Blücher (1976).
- 5) ANTONINI, E. and BRUNORI, M. - "Hemoglobin and Myoglobin in their Reactions with Ligands", North Holland Publ. Co. (1971).
- 6) BRILL, A.S. - "Transition metals in Biochemistry", Springer Verlag (1977).
- 7) BRESLOW, E; GURD, F.R.N. - J.Biol. Chem., 238,1332(1963).
- 8) GURD, F.R.N.; FALK, K.E.; MALMSTRÖM, B.G.; VÄNNGARD, T. - J.Biol.Chem. 242(24), 5724-5730 (1967).
- 9) GURD, F.R.N.; FALK, K.E.; MALMSTRÖM, B.G.; VÄNNGARD, T. - J.Biol.Chem. 242(24), 5731-5735 (1967).
- 10) BANASZAK, L.J.; WATSON, H.C.; KENDREW, J.C. - J.Mol.Biol. 12,13 (1965).
- 11) CASTELLANO, E.E.; NASCIMENTO, O.R.; MASCARENHAS, Y.P. - Acta Cryst. A-37, supplement (1981)
- 12) NASCIMENTO, O.R.; COSTA RIBEIRO, S.; BEMSKI, G. - FEBS Letters 53(2), 190-192(1975).
- 13) SAY, J.C. - Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP (1980).
- 14) ASCENZI, P.; CONDÔ, S.G.; BANNISTER, J.V.; GIARDINA, B.; BRUNORI, M. - "Società Italiana di Biofisica e Biologia Molecolare - XVIII - Convegno Scientifico Nazionale (1981).

- 15) PAKE, G.E.; "Paramagnetic Resonance", W.A.Benjamin Inc.(1962)
- 16) KIRKPATRIK, E.S.; MULLER, K.A.; RUBINS, R.S. - Phys.Rev.135,
86 (1964).
- 17) POOLE, C.P.; "Electron Spin Resonance", Wiley, New York
(1967).
- 18) FEHER, G.; "Electron Paramagnetic Resonance with Application
to Selected Problems in Biology", Gordon and Breach, Science
Publ. (1970).
- 19) WATARI, H.; "Magnetic Resonance in Biological Samples", ed.
A.Ehremberg, B.G.Malmstrom e T.Vanngard, Pergamon, Oxford
(1967) pag.149.
- 20) PEISACH, J.; BLUMBERG, W.E.; OGAWA, S.; RACHMILEWITZ, E.A.
and OLTZIK, R. - J.Biol.Chem. 246(10), 3342-3355 (1971).
- 21) NEIMAN, R. and KIVELSON, D. - J.Chem. Phys. 35(1), 156-161,
(1961).
- 22) ABRAGAM, A. and BLEANEY, B.; "Electron Paramagnetic Resonance
of Transition Ions", Cap.38 pág.175, Claredon Press - Oxford
(1970).
- 23) BERLINER, L.J. (Editor) "Spin Labeling - Theory and Applications"
Academic Press (1976).
- 24) Apud - LIKHTENSHTEIN, G.I.; "Spin Labelling Method in Molecular
Biology" J.Willey & Sons (1976) pag.5.
- 25) GOLDMAN, S.A.; BRUNO, G.V.; FREED, J.H. - J.Chem.Phys. 76,
1858-1860.
- 26) ROSSI-FANELLI in "Methods in Enzymology" Vl.76, Academic
Press N.Y. (1981).
- 27) PERUSSI, J.R. - Tese de Mestrado, IFQSC (1983)
- 28) COLOMBO, M.F. - Tese de Mestrado, IFQSC (1982).

- 29) GERSONDE, K. and NETTER, H. - J.Mol.Biol. 22, 211-221 (1966).
- 30) CHANG, S.S., Li, N.C. and PRATT, D.W. - J.Mag. Res. 18, 117-122 (1975).
- 31) BARTNICKI, D.E.; MIZUKAMI, H.; ROMERO-FERRERE, A.E. - J.Biol. Chem. 258(3), 1599-1602 (1983).
- 32) BRUNORI, M.; AMINCONI, G.; ANTONINI, E.; WYMAN, J.; ZITO, R. ROSSI-FANELLI, A. - Biochem. Biophys. Acta 154, 315 (1968).
- 33) BOYER, P.D. - J.Am.Chem.Soc. 76, 433 (1954).
- 34) ROTILIO, G.; CALABRESE, L; GIACOMETTI, G.M; BRUNORI, M. - Biochem.Biophys. Acta 236, 234-237 (1971).
- 35) EISEMBERGER, P.; PERSHAN, P.S. - J.Chem.Phys. 47(9), 3327-3333 (1967).
- 36) CARACELLI, I.; SAY, J.C.; MEIRELLES, N.C.; BAFFA, O.; TABAK, M; NASCIMENTO; O.R. - "XIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica (1984).
- 37) PEISACH, J.; BLUMBERG, W.E.; WITTENBERG, B.A.; WITTENBERG, J.B. and KAMPA, L. - Proc.Natl.Acad.Sci. U.S., 63(1969)934.
- 38) WICKMAN, H.H.; KLEIN, M.P. and SHIRLEY, D.A. - J.Chem.Phys. 42(6), 2113-2117 (1965).
- 39) DESIDERI, A.; VERZILI, D.; ASCOLI, F.; CHIANCONE, E. and ANTONINI, E. - Biochem. Biophys. Acta 708, 1-5 (1982).
- 40) OHNISHI, S., BOYENS, J.C.A. and McCONNEL, H.M. - Proc.Natl. Acad.Sci. U.S., 56, 809 (1966).
- 41) ACAMPORA, G. and HERMANS Jr., J. - J.Amer.Chem.Soc. 89, 1543, (1967).
- 42) ATANOSOV, B.P. - Nature 233 - 560-561 (1971).
- 43) TABAK, M.; NASCIMENTO, O.R. and SAY, J.C., - Febs Letters 40(2), 241-244 (1982).