ESTUDOS DA ENZIMA CLOROCATECOL 1,2-DIOXIGENASE POR EPR CONVENCIONAL E DA ESTRUTURA DINÂMICA DE BIOMEMBRANAS POR EPR PULSADA BIDIMENSIONAL

ANTONIO JOSÉ DA COSTA FILHO

Tese apresentada ao Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências "Física Básica"

Orientador: Prof. Dr. Otaciro Rangel Nascimento

USP/IFSC/SBI

8-2-001428

São Carlos – São Paulo
2001

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO

Costa Filho, Antonio José da

"Estudos da Enzima Clorocatecol 1,2-Dioxigenase por EPR Convencional e da Estrutura Dinâmica de Biomembranas por EPR Pulsada Bidimensional"/ Antonio José da Costa Filho – São Carlos, 2001

Tese (Doutorado) – Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2001 – páginas: 146
Área: Física Básica
Prof. Dr. Otaciro Rangel Nascimento

1. EPR, 2. Pulsada, 3. Dinâmica de Biomembranas

I. Título

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Instituto de Física de São Carlos

Caixa Postal 369
13560-970 São Carlos, SP
Av. Trabalhador São-carlense, 400,
13566-590 São Carlos, SP

Fone/Fax 16 273 9777
www.if.sc.usp.br
wladerez@if.sc.usp.br

MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA TESE DE DOUTORADO DE *ANTONIO JOSÉ DA COSTA FILHO*, APRESENTADA AO INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS, UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, EM 06-11-2001.

COMISSÃO JULGADORA:

Prof. Dr. OTACIRO RANGEL NASCIMENTO (Orientador e Presidente) – IFSC / USP

Prof. Dr. JOSÉ PEDRO DONOSO GONZALEZ – IFSC / USP

Prof. Dr. CLÁUDIO JOSÉ MAGON – IFSC / USP

Prof. Dr. AMANDO SIUITI ITO – IF / USP

Prof. Dr. MARIO ENGELSBERG – UFPE

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes em minha vida: minha Preticulica, minha mãe e meu pai, que não se cansam de me fazer feliz.

AGRADECIMENTOS

Ao Otaciro, que sempre fez questão de assim o ser, apenas o Otaciro, a quem agradeço por tudo ao longo de minha curta carreira científica, por todas as chances, motivação, ensinamentos (técnicos ou não) e pelos anos de convivência edificante. Que sejam muitos mais!

Ao Prof. Jack Freed, pelo excelente período em Cornell e pela oportunidade de trabalhar com projetos da fronteira científica em nossa área.

Ao Claudio Magon, presença diária em nosso laboratório, pelos ensinamentos e discussões, pelo apoio e pela convivência sempre alegre.

À Leila e Paula, pelo apoio ao longo dos últimos anos.

A todos os membros do Freed Group (Cornell University): Joe, Keith, Petr, Liang, Betsey, Diane, e em particular, Drs. Richard Crepeau e Mingtao Ge, sem os quais meu trabalho em Ithaca não teria se realizado.

Aos amigos do IFSC em São Carlos: Bel, Beto, Sueli, Andressa, Susana, Ciça, Cris Nordi, pH, Stéfano, Patrícia, Nalva, Maria, Ceará, Queite, Cléber.

Aos amigos de toda hora e todos os momentos, Nandim e CB Gordão.

My best buddy in Ithaca Alexsi-enna-Nevzorov who made my life easier in the basement and taught me a whole bunch of things about magnetic resonance, vodka, barbecues and etc; also Dr. Peer Pescador who inherited the basement spell, and Pieter and Kathleen, good friends forever.

My friends at the Cornell Outdoor Education (Lindseth Climbing Wall), Mike and Tina who were always there waiting for me to go climbing. Climb hard!!!

Aos queridos Ane e Ítalo (Minerim), Denise e Cleibe, Fernanda e Rodrigo, Adriana e Maurício, Rose e Zeki, Célia e Gérzo, Ana Paula e Hilário, pela amizade verdadeira e toda ajuda. Em especial ao Ítalo pelas festas, hospedagem e boa comida mineira!!!

Aos meus irmãos, Felipe e Valéria, novamente me apoiando e incentivando em todas as horas.

Aos amigos da Luso-Brazilian Student Association (LUBRASA) de Cornell, que me deixaram ser o DJ de todas as festas brasileiras em Ithaca.

Novamente, à turma do CMF, cuja amizade vai ficando mais velha e melhor.

Às agências CNPq, FAPESP, NIH, e Cornell Graduate School pelo apoio financeiro recebido.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS i

LISTA DE TABELAS v

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS vi

RESUMO viii

ABSTRACT ix

INTRODUÇÃO 1

ESTUDOS DA ENZIMA CLOROCATECOL 1,2-DIOXIGENASE POR EPR CONVENCIONAL

CAPÍTULO I.1. INTRODUÇÃO - DIOXIGENASES 7

CAPÍTULO I.2. MATERIAIS E MÉTODOS 13

I.2.1. Expressão e Purificação da Clorocatecol 1,2-Dioxigenase de *Pseudomonas putida* 13

I.2.1.1 "Over-expression" da Clorocatecol 1,2-Dioxigenase 6His 13

I.2.1.2 Purificação da Clorocatecol 1,2-Dioxigenase 6His 14

I.2.1.3 Caracterização da massa molecular 16

I.2.1.4 Resultados Parciais da Purificação 17

I.2.1.5 Clivagem do flagelo de histidinas da CCD6His 18

I.2.2. Métodos em EPR de Fe(III) 20

I.2.2.1 Íon Ferro: Química e Propriedades Magnéticas 20

I.2.2.2 Hamiltoniano de Spin 22

I.2.2.3 Desdobramento de Campo Zero 26

I.2.2.4 Gráfico de Scatchard 29

I.2.3. Experimentos de Dicroísmo Circular e EPR-CW 30

I.2.3.1 Dicroísmo Circular 30

I.2.3.2 Ensaio Enzimático 31

I.2.3.3. Ressonância Paramagnética Eletrônica 32

CAPÍTULO I.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 36

I.3.1. Dicroísmo Circular (CD) e Atividade Enzimática 36

I.3.2. Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR) 45

ESTUDOS DA ESTRUTURA DINÂMICA DE BIOMEMBRANAS POR EPR PULSADA BIDIMENSIONAL

CAPÍTULO II.1. INTRODUÇÃO – EPR PULSADA E O ESTUDO DE MEMBRANAS DE INTERESSE BIOLÓGICO 59

CAPÍTULO II.2. MATERIAIS E MÉTODOS 66

II.2.1. Materiais 66

II.2.2. Preparação de Amostras 67

II.2.3. Métodos em 2D-FT-EPR 69

II.2.4. Medidas de 2D-FT-EPR 79

II.2.5. Simulações de Espectros de 2D-FT-EPR 81

CAPÍTULO II.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 91

II.3.1. Estrutura Dinâmica de Membranas Modelo 91

II.3.1.1 Estado de Líquido Cristalino (Lc) vs Líquido Ordenado (Lo) 92

II.3.1.2 Misturas de DPPC/Chol: Estudos em Função da Temperatura e da Concentração de Colesterol 109

II.3.2. Estrutura Dinâmica de Membranas Bleb 118

II.3.3. Interações Lipídios-Peptídeos: Lipídios "Boundary" vs "Bulk" em Membranas contendo Gramicidina A' 123

CONCLUSÃO 133

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 140

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I.1. INTRODUÇÃO – DIOXIGENASES

Figura I.1.1: Esquema mostrando os três modos como pode ocorrer a fissão do anel aromático 8

Figura I.1.2: Enzimas da família das dioxigenases intradióis e as respectivas reações por elas 9

Figura I.1.3: Estrutura dimérica $(\alpha Fe^{3+})_2$ da dioxigenase Ac 1,2-CTD. Na figura, pode ser 11

Figura I.1.4: Ligação do substrato catecol ao sítio ativo da enzima Ac 1,2-CTD. 11

CAPÍTULO I.2. MATERIAIS E MÉTODOS

Figura I.2.1: Frações eluídas a partir da cromatografia em Ni-NTA. Proteínas visualizadas 17

Figura I.2.2: Frações eluídas a partir da cromatografia em Ni-NTA. Proteínas visualizadas 18

Figura I.2.3: Acompanhamento da clivagem da CCD6His com trombina. 19

Figura I.2.4: Níveis de energia para os elétrons *d* e suas distribuições para íon Fe. 21

Figura I.2.5: Valores efetivos de *g* descritos nas eqs. I.2.5 26

CAPÍTULO I.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura I.3.1: Espectros de dicroísmo circular obtidos por Araújo *et al* (2000). 38

Figura I.3.2: Atividade específica da CCD clivada e CCD6His em função do pH. 39

Figura I.3.3: Espectros de dicroísmo circular da CCD e CCD6xHis. 40

Figura I.3.4: Espectros de CD para a enzima CCD clivada em função da temperatura, pH=7,2. 41

Figura I.3.5: Espectros de CD para a enzima CCD6xHis em função da temperatura, pH=7,2. 41

Figura I.3.6: Atividade específica das enzimas CCD e CCD6His como função da temperatura. 44

Figura I.3.7: Espectros da CCD em bandas X e Q, mostrando uma linha isotrópica em torno de g=4,3. 46

Figura I.3.8: Simulação do espectro da enzima CCD medido a 4 K obtida através do program Simphonia – Bruker. 47

Figura I.3.9: Curva de saturação para a enzima CCD obtida a 4 K. 48

Figura I.3.10: Dependência com a temperatura do sinal de EPR em g=4,3. A linha sólida foi obtida através da eq. (I.2.8) para λ=1/3 e D=(1,3±0,2) cm^{-1}. 50

Figura I.3.11: Espectros da: (A) CCD; (B) BBPPN; (C) BBPEN e (D) Transferrina bovina usados para a quantificação do número de íons Fe(III) por molécula de CCD. 51

Figura I.3.12: Efeito da adição de concentrações crescentes de substrato à solução da enzima. 54

Figura I.3.13: Gráfico de Scatchard para a CCD construído a partir dos experimentos de titulação. 56

Figura I.3.14:Dependência do sinal de RPE com a variação do pH da solução de CCD. 58

CAPÍTULO II.2. MATERIAIS E MÉTODOS

Figura II.2.1: Seqüências de pulsos usadas em medidas de 2D-ESR: (a) ELDOR, (b) SECSY e (c) COSY. 70

Figura II.2.2: Componentes da magnetização ***M*** em experimento de 2D-ELDOR. 75

Figura II.2.3: Influência dos mecanismos de relaxação na formação de picos cruzados em espectros de 2D-ELDOR de radicais nitróxidos. 78

Figura II.2.4: Espectro magnitude de 2D-ELDOR no domínio temporal do marcador de spin 16-PC em membranas de DPPC a 50°C. 81

Figura II.2.5: Sistemas de eixos usados nas simulações de espectros de 2D-FT-ESR para os marcadores de spin 16-PC, DPPTC e CSL. 89

Figura II.2.6: Estrutura geral das dispersões usadas nas medidas de 2D-ELDOR 90

CAPÍTULO II.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura II.3.1: Curvas de contorno dos espectros de 2D-ELDOR do marcador de spin 16-PC em amostras de DPPC, DPPC/Chol (1/1), SM, SM/Chol (1/1), e do marcador CSL em DPPC e DPPC/Chol (1/1). 94

Figura II.3.2.: Espectros de 2D-ELDOR do marcador de spin 16-PC em amostras de DPPC, DPPC/Chol (1/1), SM, SM/Chol (1/1), e do marcador CSL em DPPC e DPPC/Chol (1/1). 95

Figura II.3.3: Espectros experimentais (2D-ELDOR S_{c-}) e respectivas simulações do marcador de spin 16-PC em dispersões de DPPC puro. 98

Figura II.3.4: Espectros experimentais (2D-ELDOR S_{c-}) e respectivas simulações do marcador de spin 16-PC em dispersões de DPPC/Chol (1/1). 99

Figura II.3.5: Espectros experimentais (2D-ELDOR S_{c-}) e respectivas simulações do marcador de spin 16-PC em dispersões de SM pura. 100

Figura II.3.6: Espectros experimentais (2D-ELDOR S_{c-}) e respectivas simulações do marcador de spin 16-PC em dispersões de SM/Chol (1/1). 101

Figura II.3.7: Espectros experimentais (2D-ELDOR S_{c-}) e respectivas simulações do marcador de spin CSL em dispersões de DPPC puro. 102

Figura II.3.8: Espectros experimentais (2D-ELDOR S_{c-}) e respectivas simulações do marcador de spin CSL em dispersões de DPPC/Chol (1/1). 103

Figura II.3.9: Espectros experimentais (2D-ELDOR Sc-) e respectivas simulações do marcador de spin DPPTC em dispersões de DPPC puro. 104

Figura II.3.10: Espectros experimentais (2D-ELDOR S_{c-}) e respectivas simulações do marcador de spin DPPTC em dispersões de DPPC/Chol (1/1). 105

Figura II.3.11: Espectros experimentais (2D-ELDOR S_{c-}) e respectivas simulações do marcador de spin 16-PC em dispersões de DPPC puro a T=35°C. 111

Figura II.3.12: Espectros experimentais (2D-ELDOR S_{c-}) e respectivas simulações do marcador de spin 16-PC em dispersões de DPPC/Chol (1/1) a T=35°C. 112

Figura II.3.13: Variação com a temperatura de $R_{\perp}$ (R_{prp}) e S_0 do marcador de spin 16-PC em dispersões de DPPC puro e de DPPC/Chol (1/1). 113

Figura II.3.14: Diagrama de fase para misturas de DPPC/DLPC/Chol a T=24°C. 115

Figura II.3.15: Gráficos de contorno dos espectros de 2D-ELDOR S_{c-} do marcador 16-PC em dispersões de DPPC/Chol com diferentes concentrações de colesterol. 116

Figura II.3.16: Variação com a temperatura de $R_{\perp}$ (R_{prp}), S_0 e S_2 do marcador de spin 16-PC em dispersões de DPPC/Chol para várias concentrações de colesterol. 117

Figura II.3.17: Espectros experimentais (2D-ELDOR S_{c-}) e respectivas simulações do marcador de spin 16-PC em membranas bleb não estimuladas a T=28°C. 120

Figura II.3.18: Espectros experimentais (2D-ELDOR S_{c-}) e respectivas simulações do marcador de spin 16-PC em membranas bleb estimuladas a T=28°C. 121

Figura II.3.19: Variação com a temperatura de $R_{\perp}$ (R_{prp}) e S_0 do marcador de spin 16-PC em membranas bleb não estimuladas e estimuladas. 122

Figura II.3.20: Espectros experimentais (2D-ELDOR S_{c-}) do marcador de spin 16-PC em membranas de DPPC puro (alto à direita) e GA/DPPC (1/1) para T_m=50, 400, 1600 ns. 124

Figura II.3.21: Esquema resumindo os efeitos de moléculas de GA nas propriedados de biomembranas. 126

Figura II.3.22: Espectros de 2D-ELDOR do marcador 16-PC e simulações (y-ordem para lipídio "boundary") nos modos SECSY (painéis superiors) e S_{c-} (painéis inferiors) para os lipídios "bulk"e "boundary" em membranas de GA/DPPC (1/1). 128

Figura II.3.23: Espectros de 2D-ELDOR do marcador 16-PC e simulações (z-ordem para lipídio "boundary") nos modos SECSY (painéis superiors) e S_{c-} (painéis inferiors) para os lipídios "bulk"e "boundary" em membranas de GA/DPPC (1/1). 129

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela I.3.1: Estimativa de conteúdo de estrutura secundária baseada em espectros de CD para a CCD e CCD6His recombinantes. Resultados obtidos por Araújo *et al.* (2000). 37

Tabela I.3.2: Estimativa de conteúdo de estrutura de secundária baseada em espectros de CD para a CCD e CCD6His recombinantes, pH=7,2 e em alguma temperaturas. 42

Tabela I.3.3: Quantificação do número de íons Fe(III) por molécula de CCD. 52

CAPÍTULO II.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela II.3.1: Parâmetros obtidos para os marcadores 16-PC, CSL e DPPTC em amostras de DPPC puro e DPPC/cholesterol (1/1) a 50°C. 97

Tabela II.3.2: Parâmetros obtidos para o marcador 16-PC em amostras de DPPC puro e DPPC/cholesterol (1/1) em várias temperaturas. 112

Tabela II.3.3: Parâmetros obtidos das simulações NLSPMC para lipídios "boundary" e "bulk" em dispersões de GA/DPPC (1/1) a 71°C. 130

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

EPR – Ressonância Paramagnética Eeltrônica

CD – Dicroísmo Circular

CCD - Clorocatecol 1,2 Dioxigenase

LB - Meio de cultura Luria-Bertani [1% bacto-triptona;0,5% extrato de levedura; 1% NaCl]

IPTG - Isopropil β-D-Tiogalactopiranosida

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Pressão

SDS - Lauril Sulfato de Sódio

PAGE - Gel Eletroforético de Poliacrilamida

NTA - Ácido Nitrilotriacético

PMSF - Fenilmetilsulfonil Fluorida

BL21(DE3)pETCLCA - Bactéria *E. coli* com o plasmídeo de expressão pETCLCA o qual contem o gene *clcA* que codifica a CCD

2D-FT-EPR – EPR de Transformada de Fourier Bidimensional

ELDOR – Electron electron double resonance

COSY – Correlation Spectroscopy

SECSY – Spin echo correlation spectroscopy

DPPC – 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-fosfatidilcolina

DLPC – dilaurilfosfatidilcolina

SM – esfingomielina

Chol - colesterol

GA – peptídeo Gramicidina A′.

16-PC – marcador de spin: 1-palmitoil-2-(16-doxil stearoil) fosfatidilcolina

CSL – marcador de spin 3β-doxil-5α-colestane (estrutura análoga à do colesterol)

DPPTC – marcador de spin na região polar do fosfolipídio: dipalmitoilfosfatidil tempo (2,2,6,6,-tetrametil-1-oxi) colina

T_m – tempos de mistura em experimentos de 2D-ELDOR

$R_\perp$ e $R_{//}$ - taxas de difusão rotacional perpendicular e paralela a um determinado eixo

S_0 e S_2 – parâmetros de ordem do marcador de spin

NLSPMC – pacote de programas de simulação usado para experimentos de 2D-FT-EPR

Δ_g – alargamento inomogêneo gaussiano

RESUMO

Neste trabalho, usamos a técnica de Ressonância Paramagnética Eletrônica em seu modo convencional para o estudo da enzima clorocatecol 1,2-dioxigenase e em seu modo pulsado para o estudo da estrutura dinâmica de biomembranas. Clorocatecol 1,2-dioxigenase é uma enzima que catalisa a clivagem de estruturas aromáticas, como a do clorocatecol, via a a ativação e incorporação de uma molécula de oxigênio, e que possui em seu sítio ativo um íon Fe(III). Nossos resultados de CD e atividade enzimática mostram o intervalo de temperaturas entre 20-25 °C como aquele no qual a enzima apresenta atividade máxima. A maior contribuição para sua estrutura secundária vem de folhas β anti-paralela. A quantificação do número de spin feita por EPR indicou a presença de um íon Fe(III) por molécula de CCD, estando esse íon em estado de spin alto e simetria rômbica, como se depreende da linha estreita em g=4,3. Os parâmetros de desdobramentos de campo zero foram determinados pela medida em função da temperatura da linha em g=4,3, fornecendo $\lambda=E/D=1/3$ e $D=(1{,}3\pm0{,}2)$ cm^{-1}. O gráfico de Scatchard construído a partir dos espectros de EPR quando da titulação da enzima com o substrato catecol indicou a presença de um único sítio ligante de catecol, em acordo com a quantificação anterior do metal, e cuja constante de afinidade enzima-substrato é $k=(2{,}7\pm0{,}1)\times10^{-6}$ M. No que tange a EPR pulsado, foram utilizadas as chamadas técnicas modernas de EPR, com ênfase em 2D-ELDOR, para a investigação de diversos aspectos em membranas de interesse biológico. Primeiramente, investigamos a diferenciação entre a fase de líquido ordenado (Lo) e a de líquido cristalino (Lc) em membranas modelo de lipídio puro e lipídio/colesterol (1/1) contendo diferentes marcadores de spin (16-PC, CSL e DPPTC). Aí mostramos que é possível distinguir-se diferentes fases lipídicas apenas por simples inspeção visual dos espectros de 2D-ELDOR de um determinado marcador de spin incorporado à membrana. Além disso, realizamos simulações através do pacote de programas NLSPMC e determinamos as diferenças quantitativas entre as fases lipídicas: o estado de líquido ordenado apresenta maior fluidez e ordenamento na região das cadeias acílicas, ao passo que, na região da cabeça polar, mostra menor ordenamento. Em seguida, estudamos o efeito da presença de colesterol em alta concentração sobre o comportamento da membrana como função da temperatura. Nesse caso, o colesterol atua de maneira a manter a membrana em uma fase altamente ordenada e fluída dentro do intervalo de temperaturas medido, abolindo a transição gel-Lc do lipídio DPPC. Uma tentativa de aplicação de nossa metodologia ao estudo de membranas biológicas foi feita ao estudarmos membranas bleb que são ricas em colesterol. Estas mostram comportamento semelhante àquele observado para as membranas modelo com alta concentração de colesterol, um indicativo da existência de domínios Lo naquelas membranas biológicas. Por fim, estudamos o efeito da presença do peptídeo Gramicidina A′ (GA) sobre a estrutura da membrana de DPPC. Os resultados de 2D-ELDOR mostram claramente a presença de duas populações de lipídios ("boundary" e "bulk"). As simulações desses espectros foram as primeiras feitas com espectros contendo duas componentes e com os dados nas formas S_c- e Secsy. Essas mostram que os lipídios "bulk" são pouco afetados pela presença de moléculas de GA, ao passo que os lipídios "boundary" têm suas cadeias acílicas dobradas na porção terminal em torno das moléculas de GA, mecanismo que suporta a formação de domínios em fase H_{II} na membrana.

ABSTRACT

In this work, EPR-CW and 2D-FT-EPR are used to study the enzyme chlorocatechol 1,2-dioxygenase and the dynamic structure of biological relevant membranes, respectively. Chlorocatechol 1,2-dioxygenase (CCD) is a non-heme Fe(III) enzyme that catalyses the ring cleavage of aromatic compounds like chlorocatechol. The structure stability as a function of the temperature was determined via circular dichroism and catalytic activity assays. The enzyme has its maximum activity at 20-25 oC. The main contribution to its secondary structure comes from antiparallel β-sheets. The iron content was determined by EPR measurements, indicating the presence of one Fe(III) per molecule. The Fe(III) ion shows a very narrow line at g=4.3 indicating a high spin state in a rhombic symmetry with $\lambda=E/D=1/3$ and $D=(1,3\pm0,2)$ cm^{-1}. The Scatchard plot based on EPR spectra suggests the existence of one site for substrate binding with a binding constant $k=(2,7\pm0,1)\times10^{-6}$ M. As for 2D-FT-EPR, the so-called modern EPR techniques, like 2D-ELDOR, were used to investigate several aspects of biologically relevant membranes. Firstly, we determined the differences between the liquid-ordered (Lo) and the liquid-crystalline (Lc) phases in model membranes of pure lipid and of lipid/cholesterol (1/1) mixtures containing different spin labels (16-PC, CSL, and DPPTC). In this case, we show how 2D-ELDOR makes possible the differentiation between Lo and Lc phases just by a pattern recognition scheme. We also performed simulations of those spectra and the results are: the Lo phase shows higher fluidity and ordering in the acyl chain region, whereas it shows lower ordering in the headgroup polar region. After that the membrane behaviour as s function of temperature was studied. We showed that cholesterol maintains the membrane in a highly ordered and fluid structure over the entire range of temperatures, abolishing the gel-Lc phase transition of the lipid DPPC. The biological membrane bleb was the first attempt to apply our methodology to real membranes. The 2D-ELDOR results for bleb membranes indicate the existence of Lo domains in the structure of those membranes. Finally, we studied the effects of the peptide Gramicidin A′ (GA) on the lipid organization of DPPC membranes. The 2D-ELDOR results show very clear two-component spectra (assigned to bulk and boundary lipids), which were simulated by the NLSPMC programs. This is the first time that 2D-FT-EPR multi-component spectra are simulated using both the S_c- and Secsy format. The simulations indicate that the GA molecules do not significantly affect the bulk lipid, whereas the boundary lipids present the end portion of their acyl chain bent towards the GA molecule. This mechanism is probably responsible for the local formation of the H_{II} phase in the membranes.

INTRODUÇÃO

A espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR) tem vivido um momento de ressurgimento nos últimos anos tanto através do aparecimento de novas metodologias em EPR convencional, como a técnica de "site-directed spin labeling" (Altenbach *et al.*, 1989), quanto pela sua extensão ao regime de muito altas freqüências (Budil *et al.*, 1989) e às técnicas resolvidas no tempo (Kevan & Bowman, 1990). Estas últimas e suas aplicações a membranas de interesse biológico constituem um dos objetivos a serem aqui apresentados. Revisões sobre os outros temas podem ser encontradas nos trabalhos de Hubbell *et al.* (1998, 2000) e Freed *et al.* (2000, 2001).

A técnica de EPR em seu regime de onda contínua (CW) vem sendo aplicada ao estudo de sistemas de interesse biológico há muitos anos, sendo as contribuições daí provenientes bastante diversas (capítulos I.1-I.3). Estas vão desde a caracterização de sítios de ligação de metais em estruturas de proteínas, passando por estudos da estrutura e dinâmica de membranas biológicas e chegando ao acompanhamento de processos reacionais e de transferência de elétrons. Grande parte de tais aplicações encontra-se descrita nos vários volumes da série *Biological Magnetic Resonance*, editada por L.J. Berliner (Plenum, New York), na qual os trabalhos ali relacionados cobrem vários aspectos da contribuição de EPR-CW ao estudo de sistemas biológicos, principalmente em relação à metaloproteínas. O presente trabalho tem

uma de suas vertentes relacionada ao uso de EPR-CW exatamente para o estudo de uma metaloproteína: a enzima clorocatecol 1,2-dioxigenase (capítulos I.1-I.3), uma enzima caracterizada pela presença de um íon Fe(III) em grupamento não-heme, cuja função tem importância biotecnológica e, portanto, constitui um problema interessante para a espectroscopia de EPR.

Em termos de experimentos resolvidos no tempo, pode ser afirmado que praticamente todas as formas de espectroscopia se beneficiaram com a introdução de técnicas de Transformada de Fourier (FT), mas talvez nenhuma tenha tido maior avanço do que a Ressonância Magnética Nuclear (NMR). O desenvolvimento das técnicas de FT-NMR proporcionou uma total revolução tanto em termos de instrumentação quanto em recursos experimentais disponíveis. Embora NMR e EPR tenham tido um nascimento e desenvolvimento inicial comum, problemas tecnológicos fizeram com que EPR não se desenvolvesse concomitantemente com a sua "técnica irmã" NMR.

Tanto NMR quanto EPR se basearam, originalmente, em experimentos realizados no regime de resposta linear através da medida da absorção de radiação monocromática aplicada continuamente à amostra, enquanto era variado o campo magnético. Essa abordagem de onda contínua (CW) tem duas limitações principais: (1) para um espectro com linhas bem resolvidas, a medida da linha de base é responsável pela maior parte do experimento; (2) o espectro é o resultado de todas as interações e processos de relaxação presentes na amostra. Assim, é muito comum não se conseguir separar todas as interações que contribuem para o espectro CW, problema este suplantado pelas técnicas de resolvidas no tempo (FT-NMR e FT-EPR).

Espectroscopia resolvida no tempo, isto é, a obtenção de espectros no domínio das frequências através do uso da Transformada de Fourier do decaimento do sinal medido após a aplicação de pulsos de radiofreqüência, tornou-se factível a partir da década de 60 e, hoje em dia, praticamente todos os experimentos em NMR são baseados nesse princípio. O desenvolvimento de técnicas pulsadas em EPR exigiu muito mais tempo: a física do sistema de spins é, essencialmente, a mesma, mas a escala de tempo característica para o decaimento da magnetização associada ao spin eletrônico é muito mais curta do que aquela para os spins nucleares, o que leva à necessidade do uso de uma tecnologia mais sofisticada para a realização dos experimentos, uma vez que se necessita de eletrônica suficientemente rápida para o processamento de sinais com escala temporal da ordem de dezenas ou centenas de nanosegundos.

Os primeiros desenvolvimentos em EPR pulsado tiveram início em estudos de sólidos a baixas temperaturas realizados principalmente por Mims *et al.* (1961, 1989) e Salikhov & Tsvetkov (1979). Avanços mais recentes nessa área foram realizados por Schweiger e colaboradores (Schweiger, 1993; Wiler *et al.*, 1998; Jeschke & Schweiger, 1996), Thomann & Bernardo (1990), Hoffman *et al.* (1996) e muitos outros (Kevan & Bowman, 1990; Kevan & Schwartz, 1979; Hoff, 1989). Em todos esses casos foram tratados regimes de tempos de relaxação longos (microsegundos, normalmente atingidos com baixas temperaturas de trabalho), o que torna possível a utilização de seqüências extensivas de pulsos com o intuito de atender aos objetivos específicos de cada pesquisador. Nos últimos anos, enorme progresso tem sido conseguido em termos de desenvolvimento instrumental, levando EPR pulsado a deixar de ser uma atividade limitada a poucos laboratórios onde

fabricava-se praticamente tudo que era preciso, para tornar-se uma técnica bem difundida e com espectrômetros disponíveis comercialmente.

A conseqüência natural da maior disseminação das técnicas pulsadas de EPR foi a sua extensão à investigação de sistemas biológicos. Ainda assim e ao contrário de NMR, que praticamente aboliu a metodologia de onda contínua, a maioria das pesquisas em EPR pulsado passa por uma etapa inicial de medidas convencionais. Em termos de materiais biológicos, a determinação das condições ideais de medida através de EPR-CW é um passo fundamental para o sucesso posterior dos experimentos resolvidos no tempo. Além disso, a escolha de um problema biológico que se adeqüe com a infra-estrutura experimental de EPR disponível em cada laboratório constitui um fator a ser levado em consideração quando da definição de um projeto de pesquisa. Por isso, as principais aplicações de EPR pulsado em sistemas de interesse biológico têm envolvido o estudo de metaloproteínas.

No entanto, além de proteínas contendo íons metálicos, EPR pulsado é uma ferramenta bastante conveniente para o estudo de problemas associados a estrutura e dinâmica de membranas de interesse biológico. Neste caso, faz-se uso de moléculas conhecidas como marcadores de spin (geralmente radicais nitróxidos), cujo espectro de EPR é muito sensível ao ambiente no qual estão inseridos. A anisotropia das interações Zeeman eletrônico e hiperfina vem da anisotropia espacial em torno do centro paramagnético. O movimento molecular, por sua vez, reflete-se no espectro de EPR através da média de tais interações para as diferentes direções principais dos tensores $\boldsymbol{g}$ e hiperfino.

Assim, espectros de EPR mudam dramaticamente à medida que o movimento do marcador torna-se mais lento ou mais rápido, assim possibilitando grande sensibilidade às propriedades físico-químicas do meio onde está localizado. Isto é

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO

diferente para espectros de NMR, onde o movimento molecular leva a uma média quase completa dos termos dependentes do movimento no hamiltoniano de spin. Os seus efeitos residuais são refletidos apenas nos tempos de relaxação T_1 e T_2 e podem ser calculados via teoria de perturbação ("Redfield perturbation theory"). Entretanto, os termos equivalentes em EPR são muito maiores, frequentemente levando a efeitos muito drásticos sobre o espectro para serem determinados por teoria de perturbação. Assim, é usado um método baseado na equação estocástica de Liouville, conhecido como "slow-motional theory" (Freed, 1976; Schneider & Freed, 1989), o qual mostra que as grandes mudanças no espectro são particularmente sensíveis aos detalhes microscópicos da dinâmica do sistema.

Esses métodos de análise permitem um estudo quantitativo dos espectros de EPR em termos de taxas de movimento do radical nitróxido e das restrições ao movimento impostas pela estrutura em torno do mesmo. Tais taxas de movimento e restrições levam a um tensor de difusão rotacional e a um parâmetro de ordem, respectivamente. Além disso, elétrons desemparelhados de diferentes radicais (na mesma ou em diferentes moléculas) interagem fracamente através de interações dipolares magnéticas de longo alcance e fortemente através de interações de troca de curto alcance. Em fluídos, essas interações podem ser usadas para monitorar a dinâmica translacional das moléculas marcadas.

As técnicas pulsadas servem para aumentar a resolução dos espectros de membranas que estão microscopicamente ordenadas mas macroscopicamente desordenadas (efeito MOMD), separando os alargamentos inomogêneos dos homogêneos através do uso do eco do spin. Técnicas pulsadas bidimensionais de EPR, em muito semelhantes àquelas encontradas em 2D-NMR, têm sido usadas em tais estudos (Freed, 2000) e uma delas tem tido papel de destaque: 2D electron-

electron double resonance (2D-ELDOR) (Gorcester & Freed, 1988). Aqui, são utilizadas as técnicas de 2D-FT-EPR, em particular 2D-ELDOR, para o estudo de problemas relacionados à estrutura dinâmica de biomembranas. Tais problemas visam tanto a caracterização das propriedades de membranas lipídicas em função de parâmetros como a temperatura e a composição das mesmas, quanto o estudo da interação de lipídios com peptídeos (capítulos II.1-II.3).

Estudos da enzima clorocatecol 1,2-dioxigenase por EPR convencional

Capítulo I.1

Introdução - Dioxigenases

A função biológica das dioxigenases como a clorocatecol 1,2-dioxigenase (CCD) justifica o interesse pelo seu estudo: a clivagem de hidrocarbonetos sintéticos. Estes compostos, utilizados pela indústria moderna, são liberados continuamente no meio ambiente, atuando como agentes poluentes de vários ecossistemas. A sua eliminação natural é realizada por populações microbianas presentes no solo e na água (Neilson *et al.*, 1992), estando os genes responsáveis pela degradação total ou parcial dessas substâncias localizados em plasmídeos bacterianos.

Os genes bacterianos mais importantes na mineralização de compostos organoclorados são encontrados em dois principais gêneros de bactérias de solo conhecidos como *Pseudomonas e Alcaligenes* (Don *et al.*, 1985). Dentre esses genes, os mais interessantes são aqueles presentes em plasmídeos naturais dessas bactérias e que são responsáveis diretos pela síntese de enzimas que compreendem as vias do α e β-cetoadipato (Perkins *et al.*, 1990). Ambas as vias catabolizam hidrocarbonetos aromáticos na forma de fenol, benzoato ou seus análogos clorados, através de uma série de reações enzimáticas. Cada uma dessas vias tem um passo enzimático crucial

envolvendo a abertura do anel benzênico, uma importante etapa para a detoxificação desses compostos, desempenhada pela enzima clorocatecol 1,2-dioxigenase.

Quando compostos como o catecol são clivados por uma dioxigenase, a fissão do anel pode ocorrer por três vias (Nozaki *et al.*, 1970): (a) clivagem da ligação entre os átomos de carbono onde estão ligados os grupos hidroxilas (clivagem intradiol), (b) clivagem da ligação entre os carbonos das posições 2 e 3 (clivagem extradiol, proximal) e (c) clivagem da ligação entre os carbonos das posições 1 e 6 (clivagem extradiol, distal) (**Figura I.1.1**). Isto faz com que as enzimas dioxigenases possam ser divididas em duas classes: intradióis e extradióis.

Estruturas cristalográficas de várias enzimas extradióis já foram obtidas: 2,3-dihidroxibifenil dioxigenase (Han *et al.*, 1995; Senda, Mitsui & 1996; Vaillancourt *et al.*, 1998), catecol 2,3-dioxigenase (Kita *et al.*, 1999) e protocatecoato 4,5-dioxigenase (Sugimoto *et al.*, 1999). Estas enzimas têm um íon ferroso [Fe(II)] como cofator, que está ligado a dois resíduos de histidina e a um grupo carboxilato.

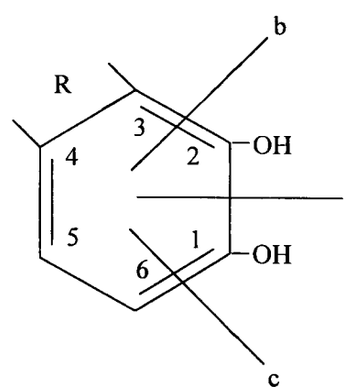


Figura I.1.1: Esquema mostrando os três modos como pode ocorrer a fissão do anel aromático: a – clivagem intradiol, b – clivagem extradiol proximal, c – clivagem extradiol distal. *R* representa os vários radicais que podem ser ligados à molecula, tais como íon cloro.

Já a classe de dioxigenases que clivam catecolatos de maneira intradiol podem ser subdivididas em duas famílias: protocatecoato 3,4-dioxigenase (3,4-PCDs) e catecol 1,2-dioxigenases (1,2-CTDs). Ambas são enzimas bacterianas portadoras de um sítio não-heme férrico [Fe(III)] e que catalizam a adição de ambos os átomos da molécula de oxigênio ao 1,2-diidroxibenzeno (catecol) ou seus derivados, com subseqüente clivagem do anel aromático (**Figura I.1.2**).

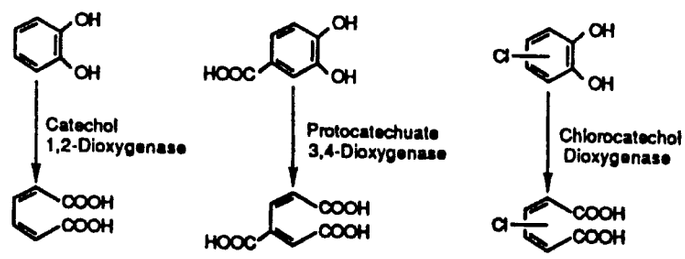


Figura I.1.2: Enzimas da família das dioxigenases intradióis e as respectivas reações por elas catalizadas. (adaptada de Broderick & O'Halloran, 1991)

As enzimas intradiol do tipo 3,4-PCD têm o composto hidroxibenzoato como substrato e são tipicamente compostas por duas sub-unidades homólogas, mas não idênticas $[\alpha\beta Fe^{3+}]_2$. Duas estruturas tridimensionais de membros dessa classe são conhecidas: uma de *Pseudomonas putida* (Ohlendorf *et al.*, 1988; Ohlendorf *et al.*, 1994) e outra de *Acinetobacter* sp. ADP1 (Vetting *et al.*, 1994; D'Argenio *et al.*, 1999). Vários estudos espectroscópicos foram realizados sobre enzimas do tipo 3,4-PCDs de diferentes fontes: *P. putida* (Que *et al.*, 1976; Que *et al.*, 1977; True *et al.*, 1990), *Burkholderia cepacia* (Walsh & Ballou, 1983) e *Brevibacterium fuscum* (Whittaker & Lipscomb, 1984; Siu *et al.*, 1992). Tais estudos mostraram que o ferro contido no sítio ativo encontra-se coordenado por duas tirosinas, duas histidinas e um grupamento hidróxido. Além disso, o íon ferro nessas enzimas 3,4-PCD tem se

mostrado no estado de oxidação Fe(III) tanto na enzima nativa quanto nos vários complexos enzima-substrato e enzima-intermediários.

As enzimas intradióis 1,2-CTDs, por sua vez, podem ser classificadas em várias sub-categorias de acordo com os seus substratos específicos: catecol, clorocatecol e hidroxiquinol. Todos os membros conhecidos da família das 1,2-CTD são homodímeros $[\alpha Fe^{3+}]_2$, com exceção apenas da 1,2-CTD de *Pseudomonas arvilla*. A primeira estrutura de uma enzima do tipo 1,2-CTD foi recentemetne determinada: 1,2-CTD de *Acinetobacter calcoaceticus* ADP1 (Ac 1,2-CTD) (Vetting & Ohlendorf, 2000). A Ac 1,2-CTD é uma molécula dimérica alongada, em forma de bumerangue e com três domínios: dois catalíticos e um domínio de ligação (**Figura I.1.3**). Os íon de Fe(III) estão a uma distância superior a 40 Å e, por isso, é sugerido que sejam considerados como estruturalmente e cataliticamente independentes. Foram encontrados um íon por monômero, estando cada íon coordenado por quatro resíduos (Tyr200, His226, Tyr164, His224) e uma molécula de água em simetria bipiramidal trigonal (**Figura I.1.4A**). A ligação do substrato catecol ou 4-metilcatecol faz com que o resíduo Tyr200 e a molécula de água saiam da esfera de coordenação do ferro. Um grupamento hidroxila do substrato liga-se na posição *trans* ao resíduo His226 e o outro OH liga-se na posição axial a Tyr164 (**Figura I.1.4B**). O resíduo His224 não é ocupado e se postula como sendo o lugar de ligação da molécula de oxigênio.

Uma diferença marcante é observada entre as catecol dioxigenases (1,2-CTD) e as clorocatecol dioxigenases por nós estudadas (CCD) quando são comparadas suas especificidades por substrato e suas eficiências catalíticas. Ao contrário de enzimas como a 1,2-CTD e 3,4-PCD, a CCD oxigena um intervalo bastante grande de

derivados de catecol tão bem quanto o faz com seus substratos naturais, os clorocatecóis.

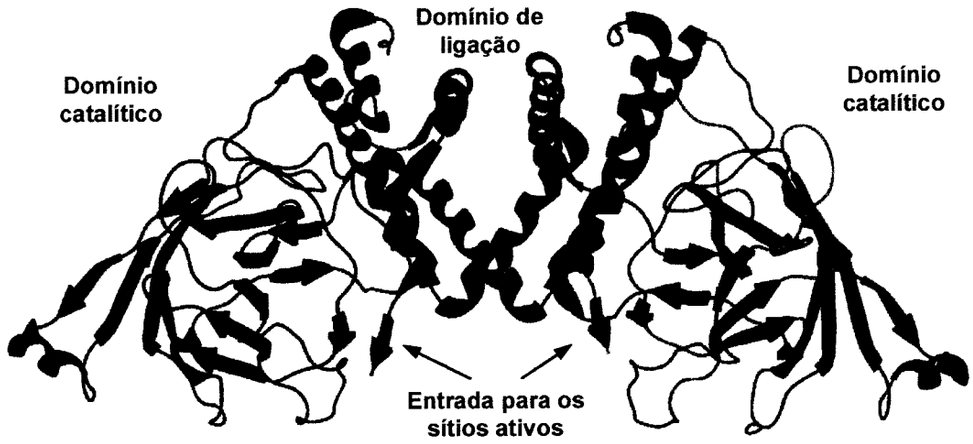


Figura I.1.3: Estrutura dimérica $(\alpha Fe^{3+})_2$ da dioxigenase Ac 1,2-CTD. Na figura, pode ser vista a localização dos domínios catalíticos e de ligação, bem como a entrada de acesso aos sítios ativos. (adaptada de Vetting & Ohlendorf, 2000).

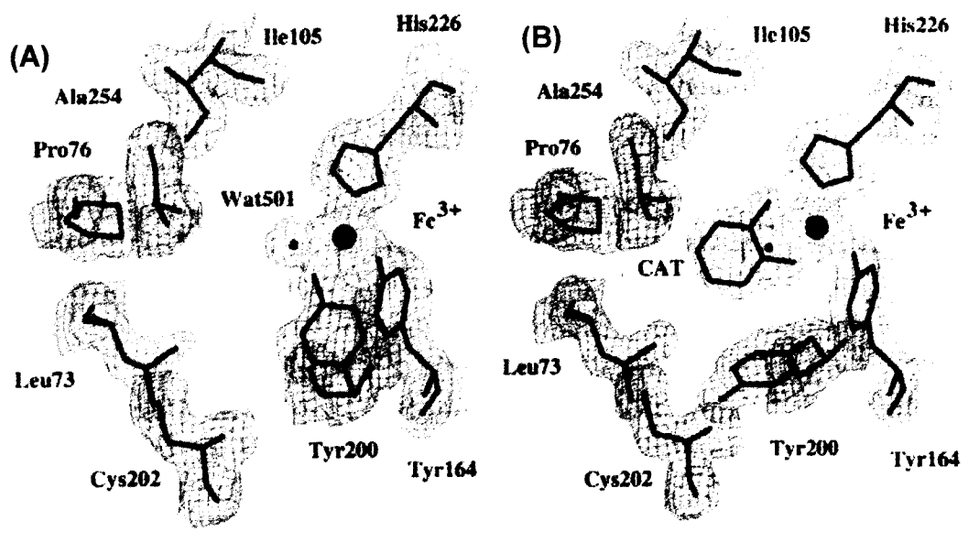


Figura I.1.4: Ligação do substrato catecol ao sítio ativo da enzima Ac 1,2-CTD: **(A)** antes da ligação do catecol, o íon Fe(III) está coordenado pelos resíduos His224 (não vista), His226, Tyr 200, Tyr 164 e H_2O; **(B)** com o catecol na estrutura, o Fe(III) passa a ser coordenado apenas pelas hidroxilas do substrato e pelos resíduos His226 e Tyr164. (adaptada de Vetting & Ohlendorf, 2000)

A intrigante diferença entre as propriedades catalíticas da CCD e as demais dioxigenases indica uma mudança fundamental no bolso que contém o sítio ativo da CCD e onde está localizado o íon Fe(III). As referidas diferenças entre clorocatecol 1,2-dioxigenase e catecol 1,2-dioxigenase relativas à especificidade e eficiência catalítica levaram Broderick & O'Halloran (1991) e Vetting & Ohlendorf (2000) a propor diferenças fundamentais no sítio ativo da clorocatecol 1,2-dioxigenase. Pode-se supor que o sítio de ligação do substrato das clorocatecol 1,2-dioxigenases deva apresentar as características estéricas e eletrônicas compatíveis com a acomodação do átomo de Cl do substrato. Isto também foi sugerido por Bhat *et al.* (1993), a partir de resultados obtidos com a 3,5-diclorocatecol 1,2-dioxigenase de *Pseudomonas cepacia*. Em ligações não totalmente covalentes ou iônicas de Cl em proteínas, observa-se distâncias interatômicas típicas, indicando que o bolsão de ligação deste átomo deve ser amplo o bastante para permitir seu ajuste. Este bolsão poderia, assim, acomodar outros substituintes hidrofóbicos, como o grupo metil em metilcatecol. Já nas catecol 1,2-dioxigenases, o seu sítio ativo não estaria seletivamente adaptado à ligação de Cl, sendo, portanto, mais compacto e inacessível aos substratos halogenados.

Nesta primeira parte, portanto, é proposto o estudo da enzima clorocatecol 1,2-dioxigenase (CCD) de *Pseudomonas putida* através de técnicas espectroscópicas diversas, com uma ênfase na Ressonância Paramagnética Eletrônica convencional (EPR-CW), e com o principal intuito de obter informações estruturais a respeito do sítio ativo da mesma.

Capítulo I.2

Materiais e Métodos

No presente capítulo é, primeiramente, descrita a metodologia utilizada para a obtenção da enzima clorocatecol 1,2-dioxigenase de *Pseudomonas putida* (seção I.2.1). Em seguida, passa-se à apresentação dos métodos de EPR-CW utilizados no estudo daquela enzima (seção I.2.2), para, então, descrever-se a maneira pela qual foram realizados os experimentos e tratados os dados de EPR-CW, dicroísmo circular e atividade enzimática da clorocatecol 1,2-dioxigenase (seção I.2.3).

I.2.1. Expressão e Purificação da Clorocatecol 1,2-Dioxigenase de *Pseudomonas putida*

I.2.1.1 "Over-expression" da Clorocatecol 1,2-Dioxigenase 6His

A enzima clorocatecol 1,2-dioxigenase de *Pseudomonas putida* expressa ao ser empregado o procedimento aqui discutido tem em seu N-terminal um flagelo, comumente chamado de "cauda", constituído por 6 resíduos de Histidina. Essa opção é feita para a utilização posterior de uma coluna de cromatografia de afinidade, o que facilitou enormemente o processo de purificação. Portanto, a enzima obtida deve ser chamada de clorocatecol 1,2-dioxigenase 6His (ou CCD6His).

Para a expressão da CCD6His é feito um inóculo, partindo de um estoque mantido em glicerol à -80°C,em meio LB sólido, contendo 25 μg/mL de canamicina, o qual é incubado à 37°C por no máximo 24 horas. A partir da cultura obtida, faz-se um pré-inóculo em 10 mL de meio LB líquido com 25 μg/mL de canamicina. Este é, então, incubado "overnight" à 37°C, sob agitação (200 rpm).

Prepara-se 500 mL de meio LB líquido, divididos em 2 frascos de cultura com capacidade para 1 litro, aos quais são adicionados 25 μg/mL de canamicina e, em seguida, 5 mL do pré-inóculo. A incubação é realizada à 37°C, sob 200 rpm de agitação, até que $D.O._{600nm}$ atingisse valores entre 0,6-0,8, para então ser adicionado 0,4 mM de IPTG. A temperatura de incubação é imediatamente diminuída para 20°C, mantendo-se a agitação como antes, por um período médio de 15 horas.

Após o período de incubação, a cultura é centrifugada à 4°C, 4.000g, por 20 minutos. Descarta-se o sobrenadante e as células são mantidas à -20°C até o início da purificação.

I.2.1.2 Purificação da Clorocatecol 1,2-Dioxigenase 6xHis

Todas as etapas de purificação são conduzidas à 4°C, exceção feita às cromatografias em HPLC. Estas são realizadas à temperatura ambiente, cuidando-se para que as frações coletadas sejam transferidas imediatamente para banho de gelo. Durante todas as etapas de purificação, se acompanha a estabilidade da enzima CCD através de ensaios de atividade enzimática (Nakazawa & Nakazawa, 1970) e separação em SDS-PAGE 15%.

Cromatografia de Afinidade

Cromatografia é a separação diferencial de componentes da amostra entre uma fase móvel e uma fase estacionária. Na maior parte das aplicações, a fase estacionária consiste de partículas esféricas, as quais são empacotadas numa coluna. Uma mistura de proteínas para ser separada é introduzida na fase móvel, sendo permitida sua migração através da coluna. Aquelas proteínas que tiverem maior atração pela fase estacionária migrarão mais lentamente do que aquelas proteínas mais atraídas pela fase móvel.

A resina utilizada para cromatografia neste procedimento é a Ni-NTA [ácido nitrilotriacético com níquel imobilizado]. O NTA ocupa 4 dos 6 sítios de ligação na esfera de coordenação do íon níquel, deixando dois sítios livres para interagirem com o flagelo de 6 histidinas.

A resina Ni-NTA (5 mL) empacotada, antes de receber a amostra, é equilibrada com: (a) 5 volumes de água; (b) 10 volumes de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 8,0 contendo 1 mM de PMSF, 1 μM de pepstatina, 1 μM de leupeptina e 5 mM de imidazol. O fluxo é ajustado para 1 mL/minuto, sendo as frações coletadas a cada 3 minutos. A eluição pode ser feita por vários métodos, porém optou-se pelo uso do imidazol, um competidor que se liga à Ni-NTA, provocando o deslocamento da proteína de interesse.

Gel Filtração

Coluna Superdex 200 *prep grade* [1,6cm x 60cm (Phamarcia)]

O fluxo é calibrado em 30mL/hora e a coluna equilibrada com 2 volumes de tampão Tris-HCl 20 mM pH 8.4; contendo 150 mM de NaCl, 2,5 mM de $CaCl_2$ e 1 mM de PMSF antes da aplicação da amostra.

Purificação

As células de BL21(DE3)pETCLCA congeladas à -20°C são inicialmente resuspensas em 25 mL tampão fosfato de sódio♦, contendo 5 mM imidazol e 1 g/mL de lisozima. A suspensão é incubada por 30 minutos em banho de gelo e as células rompidas em um sonicador (5 pulsos de 50 a 60 mA, com duração de 20 segundos cada, em intervalos de 30 segundos), sempre em banho de gelo. Os resíduos celulares e o material insolúvel são removidos por centrifugação a 20.000g, por 30 minutos.

O sobrenadante (~24 mL) é aplicado a uma coluna de afinidade Ni-NTA previamente equilibrada e em seguida a coluna foi lavada com:

(a) 4 volumes de tampão fosfato de sódio♦; contendo 5 mM de imidazol;

(b) 8 volumes de tampão fosfato de sódio♦; contendo 40 mM de imidazol;

A proteína é eluída através de um gradiente linear de 0,5 M de imidazol em tampão fosfato de sódio♦, seguidos de mais 4 volumes do mesmo tampão♦, contendo 0,5 M de imidazol;

I.2.1.3 Caracterização da massa molecular

A fim de se estimar a massa molecular da CCD expressa, aplica-se na coluna Superdex 200 um padrão contendo proteínas conhecidas. A cromatografia dos padrões é realizada sob condições idênticas àquelas usadas para a enzima (fluxo 30 mL/hora, tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8,4; 150 mM NaCl, 2,5 mM de $CaCl_2$). A padronização é feita com: 1 mg de *Blue Dextran* (2.000.000 Da) e 1 mg de Riboflavina (376 Da), para marcar os limites de exclusão, e 2,5 mg de Soro-albumina Bovina (66.000 Da).

♦ [fosfato de sódio 50 mM pH 8.0, 300 mM NaCl, 1 mM PMSF, 1 μM leupeptina, 1 μM pepstatina]

I.2.1.4 Resultados Parciais da Purificação

O resultado do protocolo de purificação descrito acima é a obtenção da enzima CCD6His em quantidade e grau de pureza suficientes para as medidas espectroscópicas. Nas **Figuras I.2.1** e **I.2.2**, são apresentados os géis eletroforéticos das várias frações de proteína cromatografada, evidenciando a existência da enzima CCD6His em quantidade (banda larga) e pura (ausência de outras bandas contaminantes na coluna) nas frações 65, 70, 75 e 84 da cromatografia de afinidade. Estas frações têm, então, sua concentração estimada pelo método de Bradford (1976), para em seguida terem o flagelo de histidinas removido. Para uma estimativa da massa molecular da CCD6His é colocado o padrão de massa molecular visto na primeira coluna de cada um dos géis apresentados. A massa molecular da CCD6His fica em torno de 33 kDa.

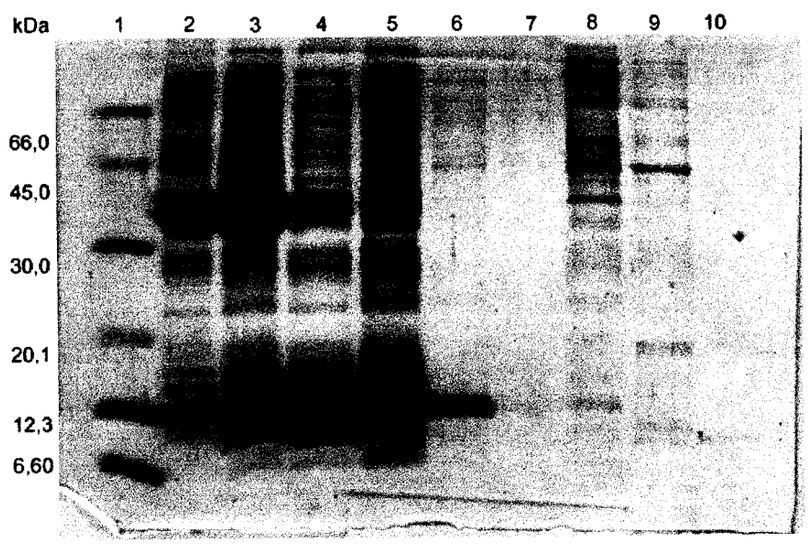


Figura I.2.1: Frações eluídas a partir da cromatografia em Ni-NTA. Proteínas visualizadas em SDS-PAGE 15%, coradas com Comassie. Colunas: (1) marcadores de massa molecular; (2) e (3) precipitado e sobrenadante (amostra cromatografada), respectivamente, obtidos após lise celular bacteriana e centrifugação (20000g, por 30 minutos); (4) a (10) amostras obtidas durante a lavagem e eluição com solução 40mM de imidazol, correspondentes às frações 5, 15, 20, 25, 30, 35 e 40, respectivamente.

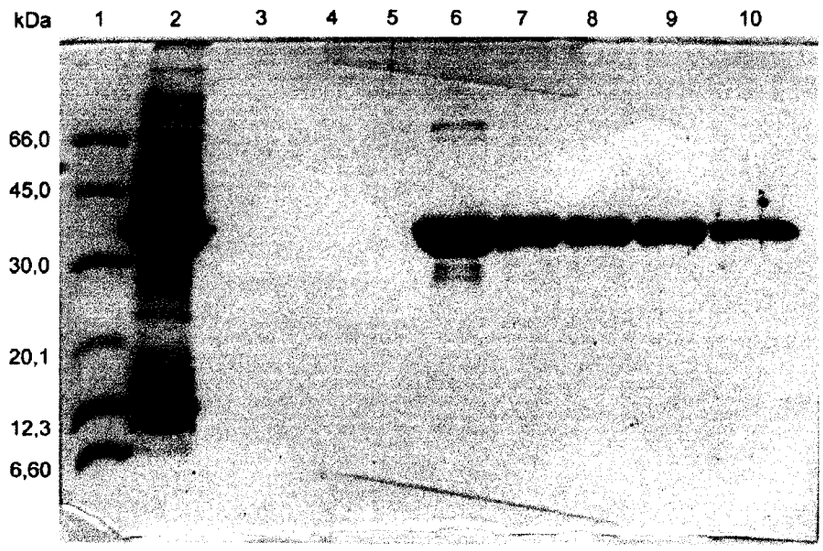


Figura I.2.2: Frações eluídas a partir da cromatografia em Ni-NTA. Proteínas visualizadas em SDS-PAGE 15%, coradas com Comassie. Colunas: (1) marcadores de massa molecular; (2) sobrenadante (amostra cromatografada obtida após a lise celular bacteriana e centrifugação); (3) a (10) amostras eluídas através de gradiente linear de imidazol (40 a 500mM), correspondentes às frações 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 e 84, respectivamente.

I.2.1.5 Clivagem do flagelo de histidinas da CCD6xHis

As frações da CCD6His purificadas são agrupadas e dialisadas contra o tampão de clivagem (Tris-HCl 20 mM, pH 8,4, a 25°C, NaCl 150 mM e $CaCl_2$ 2,5 mM). Após diálise, a concentração protéica é determinada através do método de Bradford (1976) e adiciona-se 1 unidade (v. seção I.2.3.3) de trombina por miligrama de proteína. A temperatura de incubação é mantida em 18°C a fim de otimizar a clivagem, e o período de incubação é de 72 horas. Acompanha-se a atividade da CCD6His por medidas espectrofotométricas durante todo o processo de clivagem. O processo de clivagem é também acompanhado por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS-Tricina (**Figura I.2.3**).

Após a clivagem são necessários mais alguns passos cromatográficos para a retirada da trombina, de peptídeos originários da clivagem, bem como de proteína não clivada. Depois de clivada, a amostra (~30 mL) é novamente aplicada na coluna de afinidade Ni-NTA e, em seguida, eluída com 4 volumes do tampão de clivagem, porém contendo 1 mM de PMSF, de modo a separar a proteína clivada daquela não clivada. As frações ativas são agrupadas e concentradas (CENTRIPREP 10) até 2 mL, os quais são aplicados na coluna Superdex 200. Em seguida, a eluição é realizada aplicando-se 3 volumes do tampão de equilíbrio (tampão de clivagem+PMSF). As frações eluídas que apresentam maior atividade são agrupadas e a concentração final da CCD é medida espectrofotometricamente.

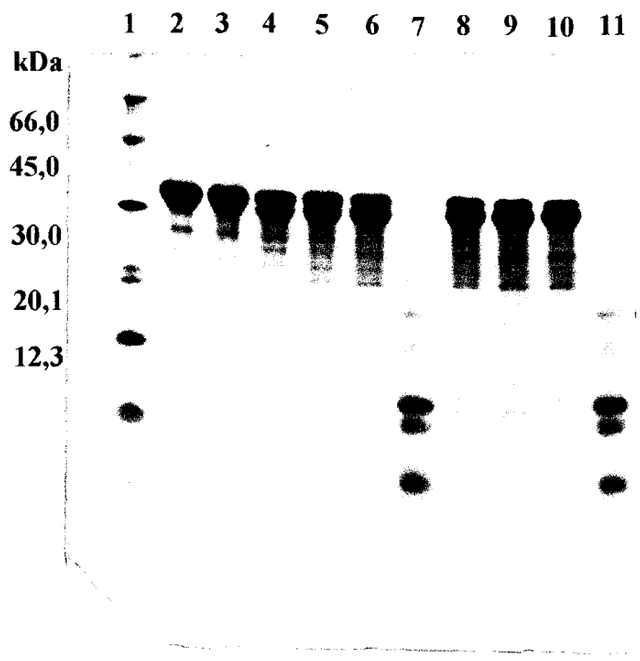


Figura I.2.3: Acompanhamento da clivagem da CCD6His com trombina. Frações retiradas ao longo do processo, com as proteínas visualizadas em gel de poliacrilamida-SDS-Tricina. Colunas: (1) marcadores de massa molecular; (2) alíquota da CCD6His no início da clivagem (tempo zero); (3) após diálise sem trombina; (4) após t=18 horas de clivagem; (5) após t=25h; (6) após 42h; (7) fragmento de mioglobina (padrão massa); (8) após t=50h; (9) após t=66h; (10) após t=72h; (11) fragmento de mioglobina. A divisão da banda em torno de 45kDa indica o início do processo de clivagem, com posterior aumento da parte inferior da mesma (aumento da quantidade de CCD clivada).

I.2.2. Métodos em EPR de Fe(III)

Na presente seção, descrevem-se os métodos utilizados para a obtenção dos parâmetros de EPR-CW a partir dos experimentos descritos na seção I.2.3.

I.2.2.1 Íon Ferro: Química e Propriedades Magnéticas

Íon ferro ocorre em, pelo menos, três estados de oxidação em biologia: Fe(II) com a configuração eletrônica d^6 (ferroso), Fe(III) d^5 (férrico), e Fe(IV) d^4 (ferril). Desses, apenas Fe(III) tem um número ímpar de elétrons, o que implica em níveis eletrônicos de energia degenerados que podem ter tal degenerescência levantada pela aplicação de um campo magnético e, consequentemente, medidos por EPR. Os outros estados podem ser magnéticos, mas normalmente o desdobramento dos níveis de energia é muito maior do que o *quantum* de microonda $h\nu$ e, assim, o espectro de EPR não pode ser detectado.

O estado de spin dos íons de Fe tem grande influência no espectro de EPR (**Figura I.2.4**). Cada elétron *d* apresenta spin S=1/2 e podem estar distribuídos em cinco orbitais. Devido à repulsão eletrostática, haverá uma tendência para que eles ocupem diferentes orbitais, resultando no chamado estado de spin alto. Assim, para Fe(III), os cinco elétrons ocupariam diferentes orbitais, dando um spin líquido de S=5/2. Para Fe(II), dois dos seis elétrons emparelham-se, resultando em um spin líquido S=2. Entretanto, interações com o campo ligante promovem uma separação dos níveis *d* de energia. Se o campo ligante é forte o suficiente, os elétrons preferirão estar emparelhados nos níveis d de energias mais baixas, levando ao estado de spin baixo (S=1/2 e S=0 para Fe(III) e Fe(II), respectivamente). Um estado de spin intermediário S=3/2 é possível mas muito raro.

A magnitude do desdobramento devido ao campo ligante, Δ, determina o estado de spin e depende do tipo de ligantes e de sua geometria. Ferro em uma simetria tetraédrica está sempre no estado de alto spin. Em corrdenação octaédrica, caso das hemoproteínas, o íon Ferro pode estar tanto em alto quanto baixo spin, dependendo do tipo de ligantes axiais. Para Fe(III) spin alto, os cinco elétrons d desemparelhados são acoplados resultando em três dubletos com S=±5/2, ±3/2, ±1/2. A população de cada um desses níveis depende do desdobramento de campo zero entre eles e da temperatura.

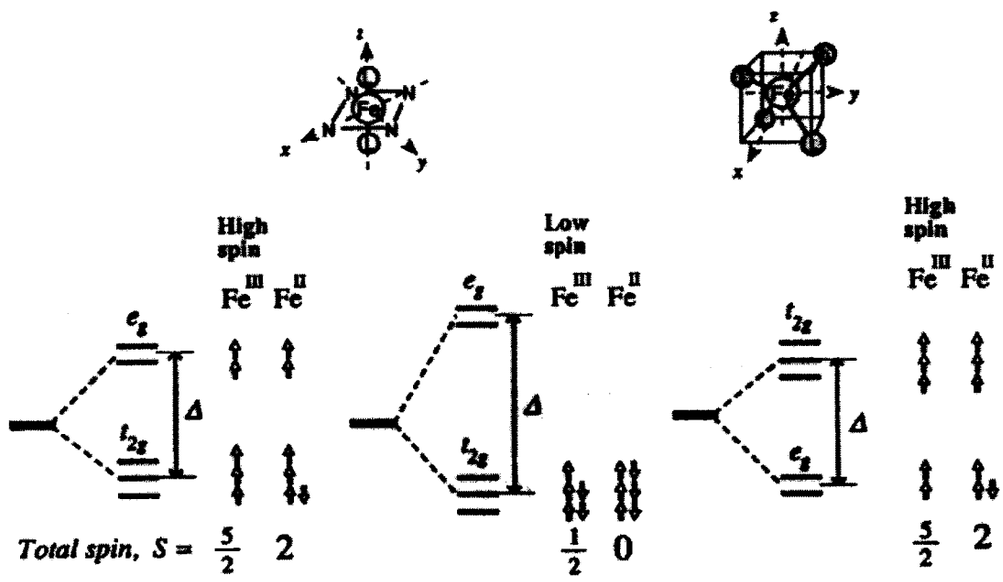


Figura I.2.4: Níveis de energia para os elétrons *d* e suas distribuições para íon Fe em simetria octaédrica e tetraedrica.

Como o íon Fe(III) tem momentum angular orbital zero no átomo livre, seria esperada a presença de uma ressonância centrada em g=2 (valor para o elétron livre) com possíveis alargamentos da linha devido aos ligantes, como observado

usualmente em sais paramagnéticos de Fe(III) (Ingram, 1955). No lugar disso, são observadas linhas centradas em valores de g indo desde, aproximadamente, 10 até 1.

Existem duas razões pelas quais o valor do fator *g* pode diferir do seu valor para o elétron livre: (1) o movimento orbital pode contribuir para o momento magnético total. Em átomos livres, esse fato leva ao fator *g* de Landè. Em sólidos, o momento orbital é, frequentemente, anulado através do "quenching" induzido pelo campo cristalino. (2) Mesmo na ausência de um campo magnético estático, o spin pode preferir alinhar-se paralelo a uma dada direção cristalina. Tal efeito pode ter sua origem tanto no acoplamento spin-órbita quanto dipolo-dipolo entre spins do íon paramagnético se a nuvem eletrônica não for esfericamente simétrica. Se os spins preferirem alguma direção cristalina, eles não precessionarão livremente em um campo estático, levando a um fator *g* aparente diferente de 2. No caso de Fe(III) nos sistemas de interesse, acredita-se que a segunda razão deve ser a responsável pelos diferentes valores de *g*.

I.2.2.2 Hamiltoniano de Spin

Em termos gerais, o hamiltoniano de spin de um sistema contém termos referentes às interações magnéticas com o campo estático e termos descrevendo a preferência do spin do elétron em estar alinhado com uma dada direção cristalina. Apesar de usualmente os termos referentes à essa última interação serem expressos fenomenologicamente como uma série de potências nas coordenadas de spin, uma dedução para a sua expressão pode ser encontrada em Slichter (1990), que parte da interação dipolar magnética usual até chegar no respectivo termo do hamiltoniano:

$$H = g_0 \beta B S_z + D S_z^2 + E(S_x^2 - S_y^2) \qquad (I.2.1)$$

onde D e E são constantes (desdobramento de campo zero), S_x, S_y, S_z são as componentes de spin ao longo de um sistema de eixos cristalinos, z é a direção de aplicação do campo magnético B, e g_0 é o fator g esperado se D e E fossem zero. O valor de g_0 seria 2, exceto por efeitos do tipo (1) descritos acima. Efeitos do tipo (2) causariam o aparecimento de D e E. Para Fe(III), o momentum angular orbital é zero, o que nos leva a tomar g_0=2.

O primeiro ponto a ser notado é que se os termos cristalinos (D e E) são pequenos, pode-se tratá-los por teoria de perturbação e os seis níveis são desdobrados pelo campo magnético com energias $2\beta mB$ (m=5/2,...,-5/2). Em primeira ordem, a freqüência da transição m=-1/2 para m=+1/2 não é alterada. Consequentemente, essa transição não é perturbada e, ainda, obteremos uma linha com g=2 se o campo cristalino é fraco. A ausência de uma ressonância em g=2 prova que aqueles termos não são fracos.

Castner *et al.* (1960) procuraram por uma solução para a eq. (I.2.1) no caso de íons Fe(III) spin alto com as seguintes aproximações $2\beta B \ll D$ ou $2\beta B \ll E$. Os casos de D=0 e E=0 são analisados e uma boa descrição dos espectros concernentes a essas situações extremas é obtida, como por exemplo, a previsão das linhas em g=6 e g=2 no caso de simetria axial (E=0, hemoglobina) e da linha em g=4,3 para D=0 (vidros). Já no trabalho de Wickman *et al.* (1965) é desenvolvido um cálculo de maneira a se prever as situações intermediárias entre aquelas descritas por Castnet *et al.* (1960). O hamiltoniano da eq. (I.2.1) é, portanto, diagonalizado sem nenhuma aproximação e seus autovalores e autovetores usados para obtenção dos possíveis valores de g para cada valor do parâmetro $\lambda=E/D$. Ambos os procedimentos são sumarizados abaixo, inicialmente refazendo as contas de Castner *et al* por teoria de perturbação, para, em seguida, ser feita a diagonalização da eq. (I.2.1) em função do parâmetro λ através do

programa Maple V. Os cálculos são reproduzidos em parte para, em seguida, discutir-se os resultados obtidos que explicam a origem das linhas de EPR-CW observadas para a enzima CCD e dão uma descrição completa do que pode ou não se esperar em relação a novos sinais, desdobramentos de linhas e simetria.

Assume-se, então, que os termos de campo cristalino na eq. I.2.1 são comparáveis ao termo Zeeman. Escreve-se, então, o hamiltoniano, mas agora com uma pequena modificação: a inlcusão do termo $S(S+1)$ para manter o centro de gravidade do espectro constante. Assim,

$$\begin{aligned} H &= D[S_z^2 - \frac{1}{3}S(S+1)] + E(S_x^2 - S_y^2) + g\beta \boldsymbol{B}\cdot\boldsymbol{S} \\ H &= H_0 + g\beta \boldsymbol{B}\cdot\boldsymbol{S} \end{aligned} \qquad (I.2.2)$$

Diagonalizando H_0 na base definida pelos níveis J=5/2 do Fe(III) $3d^5$, obtemos três dubletos de Kramer $\psi_i^{\pm}$, dados na representação $|J_z\rangle$ por

$$\psi_i^{\pm} = a_i\left|\pm\frac{5}{2}\right\rangle + b_i\left|\pm\frac{3}{2}\right\rangle + c_i\left|\mp\frac{1}{2}\right\rangle \ (i=1,2,3) \qquad (I.2.3)$$

Os coeficientes a_i, b_i, c_i são funções do parâmetro λ e o intervalo de valores fisicamente distintos de λ está restrito a $\lambda \leq 1/3$. Além disso, apenas valores positivos de λ precisam ser analisados. Tais simetrias são mais facilmente evidenciadas com o hamiltoniano H_0 na forma

$$H_0 = AS_x^2 + BS_y^2 + CS_z^2 \qquad (I.2.4)$$

com $A+B+C=0$. Escolhe-se um sistema de coordenadas tal que $|C| \geq |B|, |A|$, e é sempre possível tomar $B>A$. Nesse sistema, H_0 assume a forma convencional após as substituições: $C=2D/3$, $B=E-D/3$, $A=-E-D/3$. Assim, $\lambda=E/D=(B-A)/3C$ ou $|\lambda|\leq 1/3$, já que $|B-A|\leq|C|$. Com aquela escolha de A, B, C temos que E assume sempre valores positivos, ficando o sinal de D determinado pelo sinal de λ. A diagonalização de H_0

para valores positivos de λ no intervalo $0 \leq \lambda \leq 1/3$ leva à obtenção de todos os autovalores e autovetores distintos para $D \geq 0$. Para $D \leq 0$ é preciso apenas inverter os níveis de energia. Um valor positivo de D indica que no limite $\lambda=0$, o estado $S_z=\pm 1/2$ fica como o estado de mais baixa energia.

Após a diagonalização de H_0 na base $J=5/2$, são obtidos os valores principais de g pela atuação do operador $2\beta BS_j$ referente à interação Zeeman nas direções j=x,y,z. Isto leva a:

$$\begin{aligned} g_{x,i} &= g_J(3b_i^2 + 2\sqrt{5}a_i c_i + 4\sqrt{2}b_i c_i) \\ g_{y,i} &= (-1)^{i+1} g_J(3b_i^2 + 2\sqrt{5}a_i c_i - 4\sqrt{2}b_i c_i) \\ g_{z,i} &= (-1)^{i+1} 2g_J(\frac{5}{2}a_i^2 + \frac{1}{2}b_i^2 - \frac{3}{2}c_i^2) \end{aligned} \qquad \text{(I.2.5).}$$

Os índices x,y,z denotam os eixos de coordenadas; i=1,2,3 referem-se aos três dubletos e é tomado $g_J=g_S=g_{5/2}=2{,}00$. A **Figura I.2.5** apresenta a variação com λ desses valores principais de g para os três dubletos de Kramer considerados separadamente como tendo spins efetivos 1/2.

A partir da **Figura I.2.5**, se observa que a variação de g do nível superior é pequena no intervalo $0 \leq \lambda \leq 1/3$. No nível intermediário os valores de g variam desde muito anisotrópicos até isotrópicos à medida que λ cresce de 0 até 1/3, chegando aí ao valor g=4,3. Para o nível de mais baixa energia no mesmo intervalo de λ há uma variação considerável dos respectivos valores de g que assumem, quando λ=1/3, os valores iguais àqueles obtidos do nível superior no mesmo ponto, exceto por uma renomeação dos eixos.

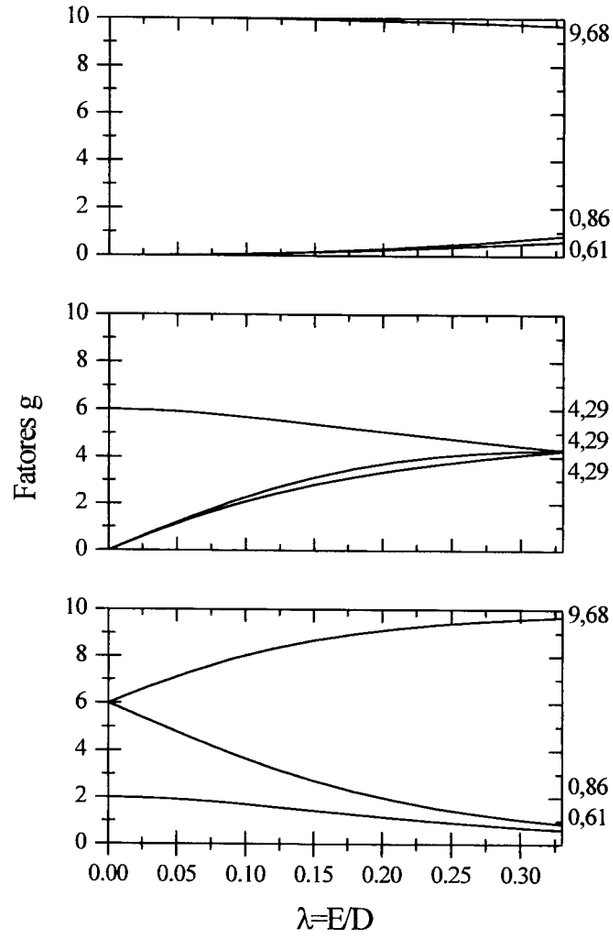


Figura I.2.5: Valores efetivos de *g* descritos nas eqs. (I.2.5) e obtidos a partir da diagonalização do hamiltoniano de spin na eq. (I.2.4) como função dos desdobramentos de campo zero *D* e *E*.

Assim, a resolução do problema segundo descrito acima nos provê como resultado um entendimento bastante claro a respeito das linhas de ressonância que podem ser observadas em sistemas do tipo Fe(III) spin alto.

I.2.2.3 Desdobramento de Campo Zero

Em proteínas contendo um único grupamento não-heme a simetria do íon é abaixada e, muito usualmente, passa de tetragonal para rômbica (E/D=1/3). Neste caso, os dubletos de Kramer estão igualmente espaçados em energia, sendo a sua

separação igual a $4\sqrt{7}D/3$, valor este também obtido a partir da diagonalização de H_0 para λ=1/3 (Castner *et al.*, 1960; Peisach *et al.*, 1971). Para o dubleto de Kramer intermediário, os valores efetivos de g nessa situação são todos iguais a 30/7 (aproximadamente 4,3), ao passo que para os dubletos inferior e superior temos valores de g iguais a 9,7;0,9 e 0,6 (**Figura I.2.5**), oriundos de cada uma das direções principais.

Se é possível chegar-se a temperaturas suficientemente baixas (em torno de 1,5 K) e quando o desdobramento de campo zero é maior do que a energia de interação Zeeman, a principal característica do espectro de EPR-CW deve ser uma linha próxima a g=9,7. À medida que a temperatura é aumentada, a intensidade desse sinal diminui mais rápido do que seria esperado se houvesse uma dependência segundo a Lei de Curie (Blumberg & Peisach, 1973; Deligiannakis *et al.*, 1997). Além disso, é observado um aumento da amplitude do sinal em g=4,3 que, acima de determinada temperatura, se aproxima de um crescimento ditado pela Lei de Curie.

Em uma dada temperatura e em condições de não-saturação, a população de qualquer dos dubletos de Kramer pode ser obtida pela medida da intensidade da respectiva linha multiplicada pela temperatura absoluta. Para a medida da intensidade é suficiente usarmos a amplitude pico-a-pico do sinal desde que a linha não sofra alargamentos com a temperatura. Como o sinal em g=4,3 provém apenas do dubleto intermediário, sua intensidade será proporcional à população desse dubleto. De acordo com a estatística de Boltzmann, essa será determinada pela temperatura na qual o experimento foi realizado e pela separação em energia entre os três dubletos. Para um conjunto de três estados, a população de cada estado i é proporcional a

$$\frac{\exp(-\Delta E_i / kT)}{1+\exp(-\Delta E_1 / kT)+\exp(-\Delta E_2 / kT)} \qquad \text{(I.2.6)}$$

onde o dubleto inferior foi escolhido como tendo energia zero, ΔE_1 é a energia do dubleto intermediário e ΔE_2 é a energia do dubleto superior. A energia do dubleto do meio, ΔE_1, é definida como desdobramento de campo zero. A razão $\Delta E_2/\Delta E_1$ é determinada pelo parâmetro de simetria λ e pelo sinal de D.

A interação Zeeman desdobra os dubletos em dois níveis e a ressonância será observada quando esses dubletos estiverem separados pelo quantum de microonda $h\nu$. A intensidade da ressonância será tambem proporcional à diferença em população entre esses dois níveis, como dado pela expressão $1-\exp(h\nu/kT)$. A intensidade total será, então, dada por:

$$I = A[1-\exp(-h\nu/kT)]\left(\frac{\exp(-\Delta E_1/kT)}{1+\exp(-\Delta E_1/kT)+\exp(-\Delta E_2/kT)}\right) \qquad (I.2.7)$$

onde A é uma constante de proporcionalidade dependente de ajustes instrumentais, tamanho da amostra e concentração. Considerando $1\text{-}\exp(h\nu/kT) \approx h\nu/kT$, temos:

$$I \times T = A'\left(\frac{\exp(-\Delta E_1/kT)}{1+\exp(-\Delta E_1/kT)+\exp(-\Delta E_2/kT)}\right) \qquad (I.2.8).$$

O ajuste da eq. (I.2.8) aos dados experimentais através do método de mínimos quadrados fornece, então, os valores de ΔE_1 e ΔE_2. De posse do valor de λ determinado a partir dos valores de g associados à linha de ressonância, esses valores de energia podem ser relacionados ao parâmetro D através dos autovalores do hamiltoniano H_0. Fica, assim, determinada a magnitude de D e, conseqüentemente, de E para a amostra em questão.

I.2.2.4 Gráfico de Scatchard

A titulação de uma solução da enzima CCD com o substrato catecol e o levantamento do respectivo gráfico de Scatchard através de EPR-CW permitem a determinação do número de sítios idênticos e independentes existentes na CCD, bem como o cálculo da constante de associação entre a enzima e o substrato catecol durante o primeiro passo da série de reações químicas que levam à abertura do anel aromático do substrato. O gráfico de Scatchard possibilita, portanto, a determinação do número de sítios para o substrato catecol existentes na CCD e a determinação da constante de afinidade enzima–substrato (reação mostrada na **Figura I.1.4**).

O procedimento analítico descrito por Cantor & Schimmel (1980) é uma representação bastante útil da relação entre o número de ligantes livres e ligados para diferentes situações. Estas englobam os casos de sítios idênticos e independentes, classes múltiplas de sítios independentes, sítios interagentes e sítios com ligação de dois ligantes diferentes. O caso de sítios idênticos e independentes é empregado no estudo das interações enzima-substrato para o caso CCD-catecol, já que sabe-se da existência de um ou dois sítios idênticos na proteína CCD para o seu substrato.

Uma maneira simples de se deduzir a equação de Scatchard é concentrar-se no equilíbrio de ligação enzima–substrato de um sítio *i*. Considerando a saturação fracionária do sítio *i* como:

$$\begin{aligned}\Theta_i &= (\text{Sítio } i \text{ Ligado})/[(\text{Sítio } i \text{ Livre}) + (\text{Sítio } i \text{ Ligado})] \\ &= \frac{(\text{Sítio } i \text{ Livre})[(\text{Sítio } i \text{ Ligado})/(\text{Sítio } i \text{ Livre})]}{(\text{Sítio } i \text{ Livre})[1 + (\text{Sítio } i \text{ Ligado})/(\text{Sítio } i \text{ Livre})]}\end{aligned} \tag{I.2.9}$$

onde (Sítio *i* Livre) e (Sítio *i* Ligado) significam concentração de sítio i sem substrato e com substrato ligado, respectivamente. Como

(Sítio *i* Ligado)/(Sítio *i* Livre) = (Ligante Livre)/*k*, onde *k* é a constante de associação enzima-substrato (neste caso, CCD-catecol), vem que:

$$\Theta_i = \frac{c/k}{1+c/k} \qquad \text{(I.2.10)},$$

onde *c* é a concentração de ligante livre. Somando para *N* sítios *i* idênticos:

$$\frac{n}{c} = \frac{N}{k} - \frac{n}{k} \qquad \text{(I.2.11)}$$

onde *n* é a razão molar ligante ligado/proteína ($n = \sum_i \Theta_i$). Vê-se, portanto, que o comportamento de *n*/*c* da eq. I.2.11 é linear em relação a *n*, com coeficientes linear e angular dados por *N*/*k* e −1/*k*, respectivamente. Portanto, a intersecção da curva com o eixo das abscissas fornece o valor de *N*. Claramente, esse tipo de análise provê uma maneira simples e conveniente de obtermos os dois parâmetros que caracterizam o equilíbrio da ligação enzima-substrato.

I.2.3. Experimentos de Dicroísmo Circular e EPR-CW

I.2.3.1. Dicroísmo Circular

Os espectros de dicroísmo circular (CD) foram medidos no espectropolarímetro Jasco J-720, em um intervalo de 195 a 240nm, sendo os espectros gerados por uma média entre 16 leituras consecutivas. As medidas foram feitas em amostras CCD6His e CCD clivada com concentrações de 0,18 e 0,20 mg/mL em tampão fosfato, respectivamente, colocadas em cubetas de quartzo de 1 mm de caminho óptico.

A estabilidade das proteínas CCD6His e CCD foi estudada como função da temperatura, sendo esta variada de 6° a 70°C. Uma alíquota de 200 μL de proteína foi colocada na cubeta de quartzo, para ser, então, submetida à variação de temperatura.

Estimativa de Estrutura Secundária

Apesar de não ter sido abordado em detalhes no que concerne aos aspectos teóricos que lhe servem como base, um método de análise dos espectros de CD em termos de conteúdo de estrutura secundária foi empregado, para com isso ser possível uma comparação dos atuais resultados com aqueles já existentes. Para tanto, foi utilizado o programa SELCON-2 (*Self-Consistent Method*), que se utiliza de um método para desconvolução das curvas de CD obtidas em suas componentes puras [α-hélice, folha β antiparalela, folha β paralela, voltas e outras (estruturas não-ordenadas, contribuições de resíduos aromáticos e pontes dissulfetos)], baseado em um banco de dados de 17 proteínas cujo conteúdo de estruturas secundárias é conhecido (Greenfield, 1996).

I.2.3.2. Ensaio Enzimático

Acompanhando as medidas de CD, foram realizados ensaios enzimáticos nas diferentes temperaturas medidas e para cada proteína, no sentido de estabelecer relações entre estrutura secundária e atividade enzimática.

O ensaio enzimático consistiu de medidas espectrofotométricas, realizadas nas mesmas condições existentes para cada medida de CD e baseadas nas mudanças da absorbância em 260 nm devido à formação de ácido *cis-cis*-mucônico, produto da reação CCD+catecol. O método foi adaptado de Nakazawa & Nakazawa (1970). Uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade que catalisa a

formação de 1 μM de produto, no caso ácido *cis-cis*-mucônico, por minuto a 24°C. Atividade específica é definida como o número de unidades de enzima por miligramas de proteína (Nakai *et al.*, 1988). Os ensaios foram realizados em espectrofotômetro Hitachi U-2001, usando cubetas de quartzo de 1 mL (1 cm de caminho óptico) e solução 200 μM de catecol como substrato. A reação foi iniciada pela adição da enzima (diluída em tampão de purificação) na cubeta contendo tampão e catecol, sendo monitorada ao longo de 3 minutos.

I.2.3.3. Ressonância Paramagnética Eletrônica

As medidas de EPR-CW foram realizadas no espectrômetro Bruker-ELEXSYS, que opera tanto em modo de onda contínua (CW) quanto pulsado e está equipado com ponte de microondas em banda X (9,5 GHz). Para as medidas em questão utilizamos, ainda, cavidade retangular e campo de modulação de 100kHz. O controle de temperatura foi realizado através do sistema criogênico Oxford, modelo ITC503, que permitiu a realização de experimentos à temperaturas tão baixas quanto 4 K.

Os experimentos visaram a caracterização físico-químca da enzima CCD através da técnica de EPR-CW. Para tanto, buscamos: (A) a determinação dos valores dos parâmetros de campo zero *D* e *E*, (B) quantificação do número de íons Fe(III) existente por proteína e (C) caracterização do sítio ativo da proteína através do levantamento do respectivo gráfico de Scatchard.

Em todos os experimentos, uma alíquota de 50 μL de solução da enzima era colocada em tubo de quartzo, congelada previamente no vapor de um "dewar" contendo nitrogênio líquido e somente então usada para as medidas de EPR-CW.

Desdobramento de Campo Zero

O primeiro passo para o cálculo dos valores de D e E foi a realização de experimentos com variação da potência de microonda aplicada, de maneira a termos estabelecida a potência mais alta possível sem que ocorresse a saturação do sinal em g=4,3. Para isso a proteína foi medida a 4 K para valores de potência indo desde 0,063 até 64,07 mW. Em seguida, a intensidade do sinal foi graficada contra a raiz quadrada da potência, para termos a curva de saturação da enzima CCD.

Na seqüência para a determinação dos valores de D e E, foram realizados experimentos com variação de temperatura desde 2,5 K até 70 K, com variação mais lenta em temperaturas mais baixas. Primeiramente, simulamos o espectro medido a 2,5 K utilizando o programa WinEPR – Simfonia Versão 1.25 da Bruker. Este software permite a simulação de espectros de amostras policristalinas e em solução, a partir de um hamiltoniano no qual constam termos referentes à interação Zeeman e ao desdobramento de campo zero. O objetivo de tal simulação foi a determinação dos valores de g em torno da região de 4,3 para, assim, obtermos o valor do parâmetro λ por uma comparação com os valores de g fornecidos ao diagonalizarmos o hamiltoniano H_0 (**Figura I.2.5**).

De posse do valor de λ, é possível determinarmos a energia dos três dubletos em campo zero (0, ΔE_1, ΔE_2) através do ajuste dos dados experimentais à função definida na eq. (I.2.8).

Quantificação do Íon Fe(III)

O método da comparação é, sem sombra de dúvida, aquele mais usado para a determinação do número de spins que contribuem para uma determinada linha de EPR-CW. Ele está baseado na comparação do espectro da amostra sob investigação

com aquele de uma amostra referência. A área sob a curva de absorção de um sinal de EPR é diretamente proporcional ao número de spins. Como os espectros são normalmente adquiridos como primeira derivada da curva de absorção, tudo que é necessário é a integração do espectro uma vez para obtermos a curva de absorção e, em seguida, integrar-se novamente para termos a área de um determinado pico. Correções de linha de base devem ser sempre cuidadosamente executadas. Essa área é, então, comparada àquela de uma amostra padrão medida sob condições experimentais idênticas às da amostra de interesse. As medidas devem ser realizadas sob condições de não-saturação das amostras. Além disso, é sempre desejável a utilização de padrões que apresentem o mesmo tipo de sinal de EPR-CW que a amostra de interesse. Padrões bastante convenientes para proteínas contendo Fe(III) spin alto em simetria axial ($E/D \approx 0$) e simetria rômbica ($E/D \approx 1/3$) são a metahemoglobina e transferrina, respectivamente, e complexos de baixo peso molecular, cuja preparação, em geral, é mais rápida e eficiente.

No caso da CCD, a concentração de spins foi determinada ao compararmos o seu espectro com aqueles oriundos de dois complexos de Fe(III) em simetria rômbica: $[Fe(bbppn)]PF_6$ (Hexafluorfosfato de N,N'-bis(2-hidroxibenzil)-N,N'-bis(2-metilpiridil)-1,3-propanodiamina ferro(III)) e $[Fe(bbpen)]ClO_4$ (Perclorato de N,N'-bis(2-hidroxibenzil)-N,N'-bis(2-metilpiridil)etilenodiamina ferro(III)), e com o da proteína transferrina. Os dois primeiros são compostos novos sintetizados e sob investigação no grupo da Prof. Sueli Drechsel Erthal do Departamento de Química - UFPR. A transferrina bovina é comprada comercialmente da empresa Sigma e, posteriormente, purificada e saturada com Fe(III), tendo sido este protocolo desenvolvido pelo Prof. Richard Garrat (Laboratório de Cristalografia-IFSC-USP).

Todas as amostras foram medidas sob as mesmas condições experimentais e em uma potência de microondas que não saturasse as linhas de nenhum dos compostos.

Titulação com o Substrato

A titulação com o substrato catecol foi realizada adicionando-se à enzima CCD um volume de 50 μL de substrato preparado em várias concentrações, de maneira a termos várias alíquotas de 100 μL formando um gradiente da relação enzima:substrato. Após a mistura, um tempo de 30 segundos era esperado, durante o qual era a feita a homogeinização da solução final. Assim, dispunhamos de um volume total sempre igual a 100 μL, também congelado antes das medidas de EPR. A manutenção do volume constante durante a titulação mostrou-se importante para a minimização de erros oriundos de tempos de congelamento diferentes para volumes distintos. Os espectros foram adquiridos sempre sob as mesmas condições. Uma vez de posse dos espectros para várias razões proteína:ligante, procuramos construir o gráfico de Scatchard, utilizando como concentrações de ligante ligado, ligante livre e enzima as razões entre as áreas do pico em g=4,3 do espectro obtido para cada concentração de substrato.

Variação do pH

Foram realizados, ainda, experimentos nos quais medimos alíquotas de 50 μL da proteínas em 150 μL de tampão mantido a diferentes pH's. A amostra foi incubada em banho de gelo durante 10 minutos, congelada e, então, medida.

Capítulo I.3

Resultados e Discussão

Os resultados, assim como a sua discussão, são apresentados no presente capítulo, onde primeiramente são analisados os dados obtidos por dicroísmo circular e medidas de atividade enzimática, para em seguida, se entrar na parte referentes às medidas por EPR-CW.

I.3.1. Dicroísmo Circular (CD) e Atividade Enzimática

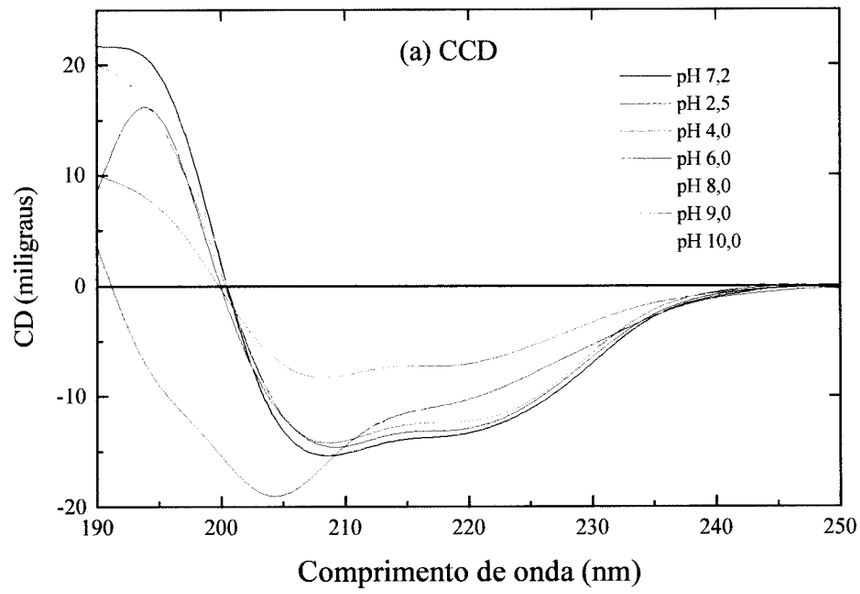
Os resultados obtidos com as medidas de dicroísmo circular e atividade enzimática são analisados conjuntamente nesta seção, objetivando, com isso, estudar a estabilidade da estrutura da enzima CCD com e sem o flagelo de histidinas como função da temperatura de medida. Além disso, visando comparar estes resultados com aqueles obtidos anteriormente para o mesmo sistema, são também apresentados os resultados de CD com variação de pH obtidos por Araújo *et al.* (2000).

As medidas de CD realizadas na CCD e na CCD6His, à temperatura ambiente, por Araújo *et al.* (2000) utilizaram soluções das duas proteínas que eram

incubadas em tampões específicos, de maneira a ser obtido um intervalo de valores de pH indo de 2,5 até 10,0. Os espectros para as duas proteínas em função do pH estão colocados na **Figura I.3.1** e as medidas da atividade das duas enzimas também feitas paralelamente são mostradas na **Figura I.3.2**. A forma dos espectros de CD obtidos para ambas as proteínas é característica de proteínas que contêm elementos helicoïdais em sua estrutura. A enzima CCD clivada apresenta discretas alterações estruturais detectáveis nos espectros de CD na faixa de pH entre 5,0 e 10,0 (**Figura I.3.1a**). Porém, sua atividade enzimática é acentuadamente afetada à medida que o pH é deslocado para extremos básicos ou ácidos, mostrando modificações drásticas, tais como diminuição da intensidade dos mínimos e máximos e completa perda de atividade enzimática. A enzima CCD6His mostrou maior estabilidade para pH's ácidos (em torno de 4,0), com estrutura e atividade ideais também no intervalo de pH indo de 5,0 até 9,0 (**Figuras I.3.1a** e **I.3.2**). A atividade específica da CCD foi sempre superior à da CCD6His, com uma maior diferença em pH=7,2 (5 vezes) (**Figura I.3.2**). As estimativas do conteúdo de estrutura secundária feitas por Araújo *et al.* (2000) forneceram para as medidas em pH 7,4, no qual as proteínas apresentaram maior atividade específica, o seguinte resultado:

Tabela I.3.1: Estimativa de conteúdo de estrutura secundária baseada em espectros de CD para a CCD e CCD6His recombinantes. Resultados obtidos por Araújo *et al.* (2000).

Proteína	α-hélice (%)	folhas β (%)	voltas (%)	Outras (%)
CCD	13	37	25	25
CCD6His	18	35	25	22



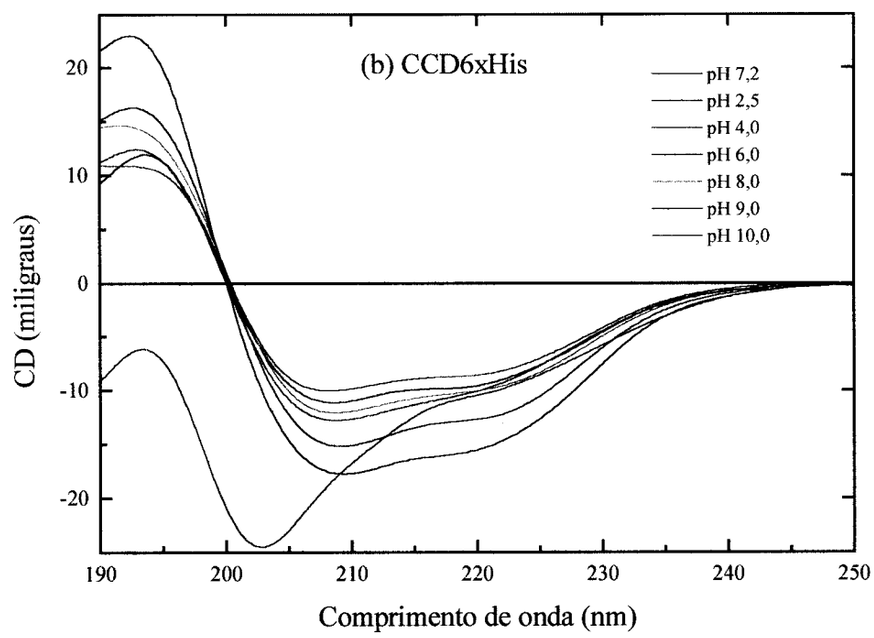


Figura I.3.1: Espectros de dicroísmo circular obtidos por Araújo *et al.* (2000), à temperatura ambiente, para a CCD e CCD6His em função do pH: (a) CCD; (b) CCD6His. (adaptada de Araújo, 1998, comunicação pessoal)

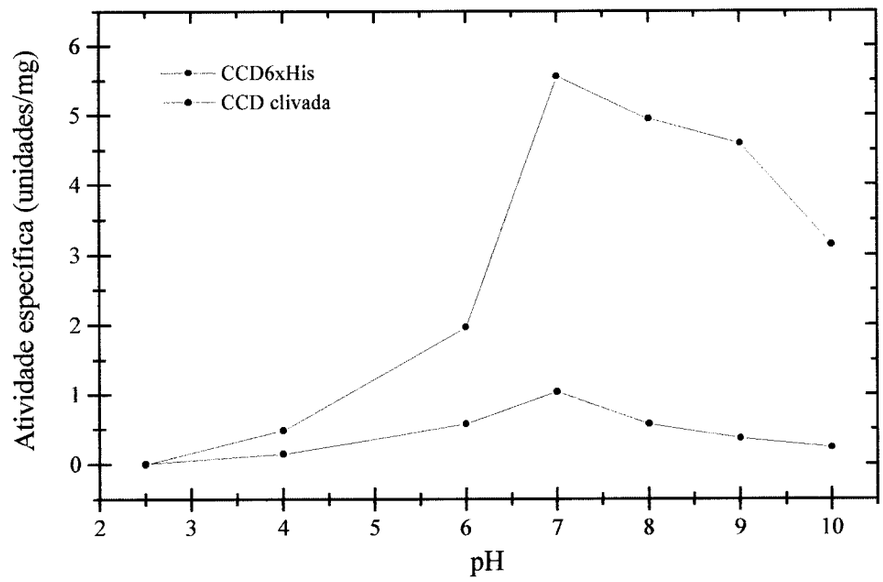


Figura I.3.2: Atividade específica da CCD clivada e CCD6His em função do pH medida via absorção ótica por Araújo *et al.* (adaptada de Araújo *et al.*, 2000).

Com base nos resultados obtidos por Araújo *et al.* (2000), foi escolhido o pH em torno de 7,0 para a realização das medidas com variação de temperatura, visto que aí ambas as proteínas estão em sua forma ativa, apresentando seus máximos de atividade enzimática. Assim, soluções da CCD e da CCD6His em tampão fosfato pH=7,0 foram submetidas às medidas de CD e de atividade enzimática, desta feita variando-se a temperatura.

Os espectros de dicroísmo circular de ambas as proteínas foram primeiramente filtrados via transformada de Fourier, para posterior utilização do programa de avaliação do conteúdo de estrutura secundária SELCON-2. Na **Figura I.3.3** estão os espectros filtrados das enzimas CCD e CCD6His, pH=7,0, em meio com baixa força iônica (5 mM tampão fosfato) para a temperatura de 25°C. Os espectros de CD para as várias temperaturas medidas são mostrados nas **Figuras**

I.3.4 e **I.3.5** para a CCD clivada e CCD6His, respectivamente. Esses espectros apresentam características similares no intervalo de temperaturas de 10oC até cerca de 40oC com dois mínimos em torno de 207-209 nm e 215-220 nm, um máximo (não mostrado nas curvas) em torno de 195 nm e passagem de valores de CD negativos para positivos em torno de 200 nm. Além disso, a presença de estruturas helicoidais confere ao espectro características específicas (duas bandas negativas em torno de 220 e 208nm e uma banda positiva em 195nm) (Toumadje *et al.*, 1992; Nakanishi *et al.*, 1994; Fasman, 1996). Esse tipo de estrutura apresenta maior intensidade em espectros de DC, mesmo estando em menor porcentagem, já que se trata do tipo de estrutura que melhor satisfaz as regras de seleção pertinentes ao dicroísmo circular (Cantor & Schimmel, 1980, cap. 8-1).Os espectros dentro daquele intervalo de temperaturas são similares àqueles de Araújo *et al.* (2000) na **Figura I.3.1** (pH's entre 5,0 e 10,0).

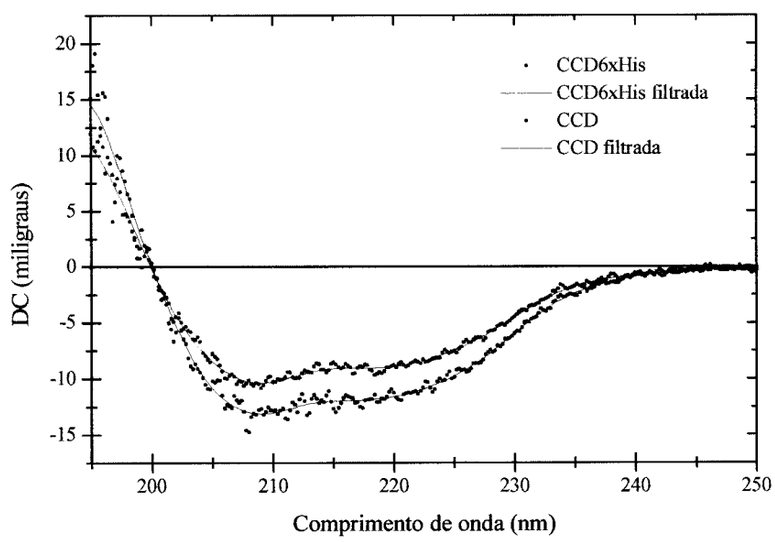


Figura I.3.3: Espectros de dicroísmo circular da CCD e CCD6His com os respectivos resultados após filtragem via Transformada de Fourier. Os espectros apresentados correspondem à temperatura de 25°C, pH=7,2.

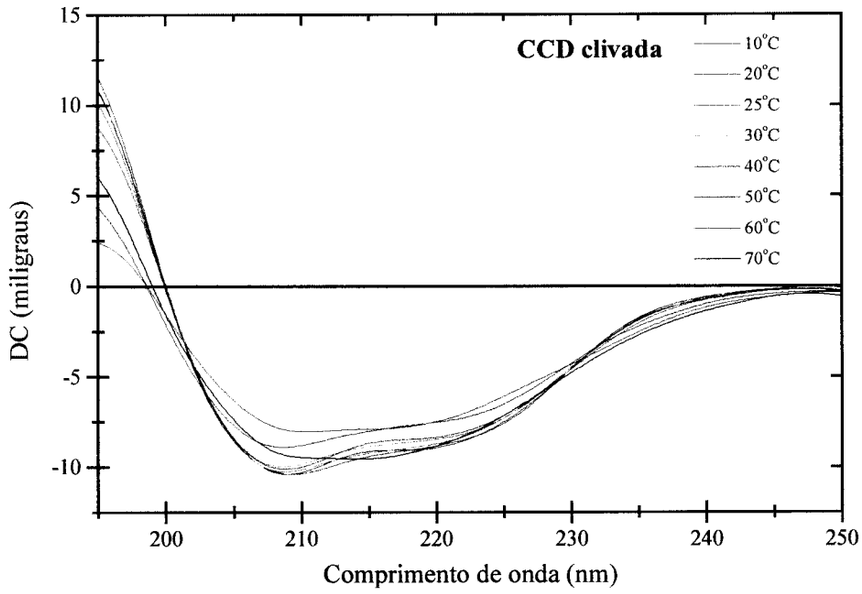


Figura I.3.4: Espectros de CD para a enzima CCD clivada em função da temperatura, pH=7,2.

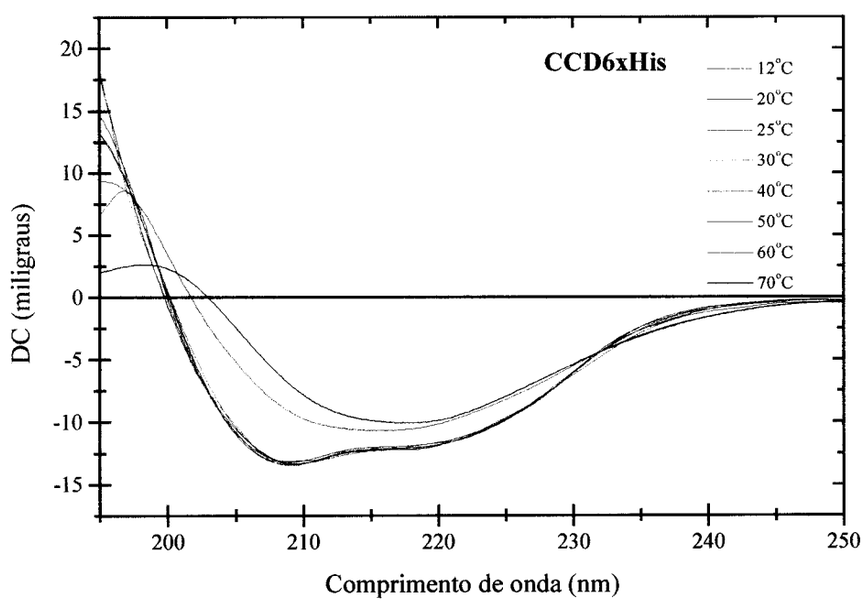


Figura I.3.5: Espectros de CD para a enzima CCD6His em função da temperatura, pH=7,2.

O conteúdo de estrutura secundária obtido com base nos espectros de CD foi estimado para as duas proteínas e a tabela abaixo apresenta os resultados:

Tabela I.3.2: Estimativa de conteúdo de estrutura de secundária baseada em espectros de CD para a CCD e CCD6His recombinantes, pH=7,2 e em alguma temperaturas.

Proteína	T(°)	α-hélice (%)	folha β anti-paralela (%)	folha β paralela (%)	Voltas (%)	outras (%)
CCD	10	12	37	5	24	22
CCD	20	12	36	6	24	22
CCD	25	12	36	6	24	22
CCD	65	16	28	8	25	23
CCD6His	10	21	29	1	26	23
CCD6His	20	20	29	2	26	23
CCD6His	25	21	28	2	26	23
CCD6His	65	20	23	8	24	25

Como há intervalos de temperatura nos quais os espectros não sofrem mudanças significativas, são apresentados os conteúdos de estrutura secundária apenas para algumas temperaturas representativas. As estimativas de conteúdo de estrutura secundária podem ser analisadas comparativamente aos resultados obtidos por Araújo *et al.* (2000) e à estrutura cristalográfica da sub-unidade β da protocatecoato 3,4-dioxigenase de *Pseudomonas putida* (Ohlendorf *et al.*, 1988). Tanto em um caso quanto em outro, há predominância de folhas β (cerca de 37% em Araújo *et al.* (2000) e 27% na protocatecoato), assim como obtido para o intervalo de

temperaturas aqui apresentados. O conteúdo de α-hélices para a CCD6His é ligeiramente superior ao da CCD devido provavelmente à presença do flagelo de histidinas na primeira, que deve assumir uma conformação helicoidal.

Tanto a CCD quanto a CCD6His não apresentam mudanças estruturais significativas em um intervalo de temperaturas de 10 até 40°C, como pode ser depreendido de seus espectros de CD e dos valores para os conteúdos de estrutura secundária, que permanecem praticamente constantes. Para temperaturas superiores a 40°C, ambas as enzimas perdem em parte o espectro característico, com maior mudança para a CCD6His acima de 60°C, que têm seus conteúdos de folha β anti-paralela diminuídos, com conseqüente aumento na porcentagem de estruturas não-ordenadas ("outras").

Nos experimentos de atividade enzimática foi tomado o cuidado de sempre serem feitas medidas a partir da mesma solução da proteína (mantendo-se concentração igual em todas as temperaturas) e com as mesmas quantidades de enzima e substrato, de maneira a serem eliminados aumento ou diminuição de atividade oriundos apenas da existência de mais ou menos quantidade de proteína ou substrato. Portanto, em relação à atividade enzimática, ambas as proteínas mostraram atividade específica crescente com a temperatura até cerca de 25°C. Acima desse valor, a atividade diminui, caindo bastante para temperaturas maiores que 40°C (**Figura I.3.6**). As medidas mostram que a atividade específica da CCD é maior que a da CCD6His para qualquer temperatura, com a maior diferença em torno de 25°C (cerca de 5 vezes), o que também está em acordo com resultados anteriores (Araújo *et al.*, 2000). Este fato sugere que o hexapeptídeo de histidinas reduz a atividade da CCD6His, provavelmente pela sua interferência no sítio ativo.

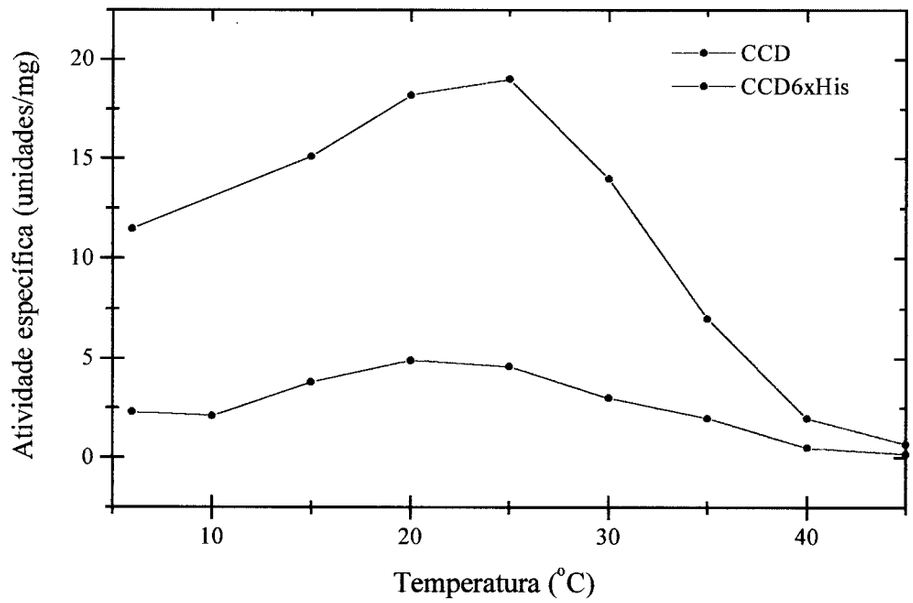


Figura I.3.6: Atividade específica das enzimas CCD e CCD6His como função da temperatura.

Analisando conjuntamente os resultados de dicroísmo circular e atividade enzimática, pode ser observado que em temperaturas entre 20 e 25°C, as proteínas CCD e CCD6His apresentam maior atividade específica e espectros de CD caracterizados por estruturas em folhas β anti-paralelas, compatíveis com resultados anteriores. Ambas as enzimas têm certa resistência à mudanças com a temperatura, mantendo seu conteúdo de estrutura secundária e atividade até cerca de 40°C. Acima desse valor, as proteínas perdem atividade rapidamente, assim como apresentam alterações em sua estrutura secundária. Apesar disso, as proteínas parecem não desenovelar completamente já que seus espectros de CD não chegam a apresentar características de estruturas completamente desorganizadas. Tal fato sugere que elas

sofrem mudanças conformacionais suficientes para torná-las inativas, mas sem perder por completo sua estrutura secundária. A similaridade no comportamento dos espectros de CD das duas enzimas com o aumento da temperatura e o padrão similar observado na atividade enzimática de ambas, apesar da diferença em valores dos mesmos, indica que a presença dos resíduos de His é a causa da reduzida atividade da CCD6His, que deve, de alguma maneira, bloquear o sítio ativo da enzima.

I.3.2. Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)

O espectro de EPR em banda X da enzima CCD clivada é apresentado na **Figura I.3.7**. A linha bastante intensa centrada em g=4,3 é atribuída à transição entre os dois níveis do dubleto intermediário com E/D=1/3 da **Figura I.2.5**. Este tipo de espectro é característico do íon Fe(III) spin alto localizado em um ambiente de simetria rômbica, como observado em metaloproteínas contendo ferro em grupamentos não-heme (Gaffney & Silverstone, 1993). Duas características dos espectros são marcantes. Primeira, a linha é bastante estreita com uma largura pico-a-pico de cerca de 16 Gauss. Esse fato sugere que o parâmetro D/E é dentro de uma margem de erro bastante pequena o mesmo para todas as moléculas na amostra, ou seja, o ambiente em torno do íon férrico é bastante homogêneo. Segunda, a relaxação do spin eletrônico é lenta, já que o espectro de EPR pode ser medido até temperaturas tão altas quanto 77 K. Nenhum das outras possíveis linhas de ressonância em torno de g=9,7;0,9 e 0,6 foram observadas. Sinais na região em torno de g=2 tiveram sua origem atribuída a impurezas não-específicas do tubo de quartzo utilizado para as medidas, visto que a subtração entre os espectros da enzima e do

tubo resultou no desaparecimento daquele sinal. Na **Figura I.3.7** é mostrado, ainda, o espectro em banda Q da CCD que foi medido no laboratório da Prof(a). E. Wajnberg (CBPF). Neste espectro fica claro o desdobramento da linha observada em banda X em duas outras que parecem corresponder a um íon Fe(III) em simetria axial e indicando que o valor de *E/D* não é exatamente igual a 1/3.

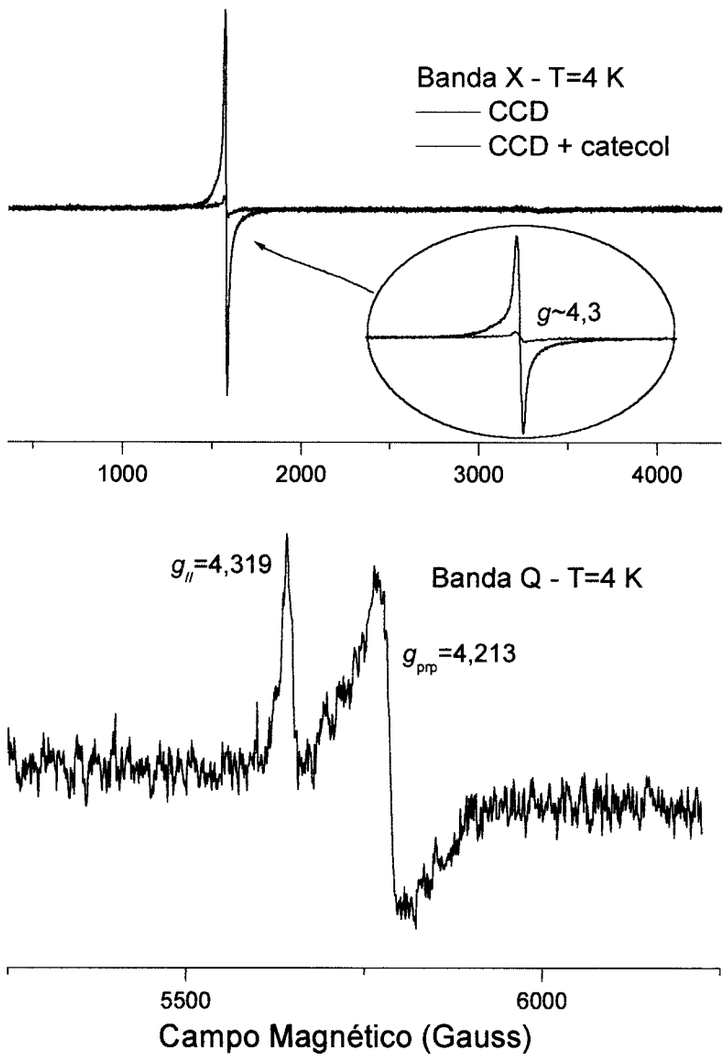


Figura I.3.7: Espectros da CCD em bandas X e Q, mostrando uma linha isotrópica em torno de g=4,3 e o seu desdobramento em freqüências mais altas, respectivamente. A curva em vermelho mostra um espectro da CCD após a adição de uma quantidade grande do substrato catecol, que é apresentado para que se faça uma comparação com o espectro sem o substrato.

Desdobramento de Campo Zero

O espectro de EPR da enzima CCD medido a 2,5 K foi simulado através do programa Simphonia (**Figura I.3.8**) e os valores de g correspondentes à linha observada foram determinados: $g_x = g_y = g_z = 4{,}2935$. Esses três valores iguais são compatíveis com a solução do Hamiltoniano H_0 da eq. (I.2.4) com $\lambda = E/D = 1/3$. De posse do valor de λ, pode-se determinar a separação em energia entre os três dubletos de Kramer, que neste caso estão igualmente espaçados, e assumem os valores 0, $4\sqrt{7}D/3$ e $8\sqrt{7}D/3$.

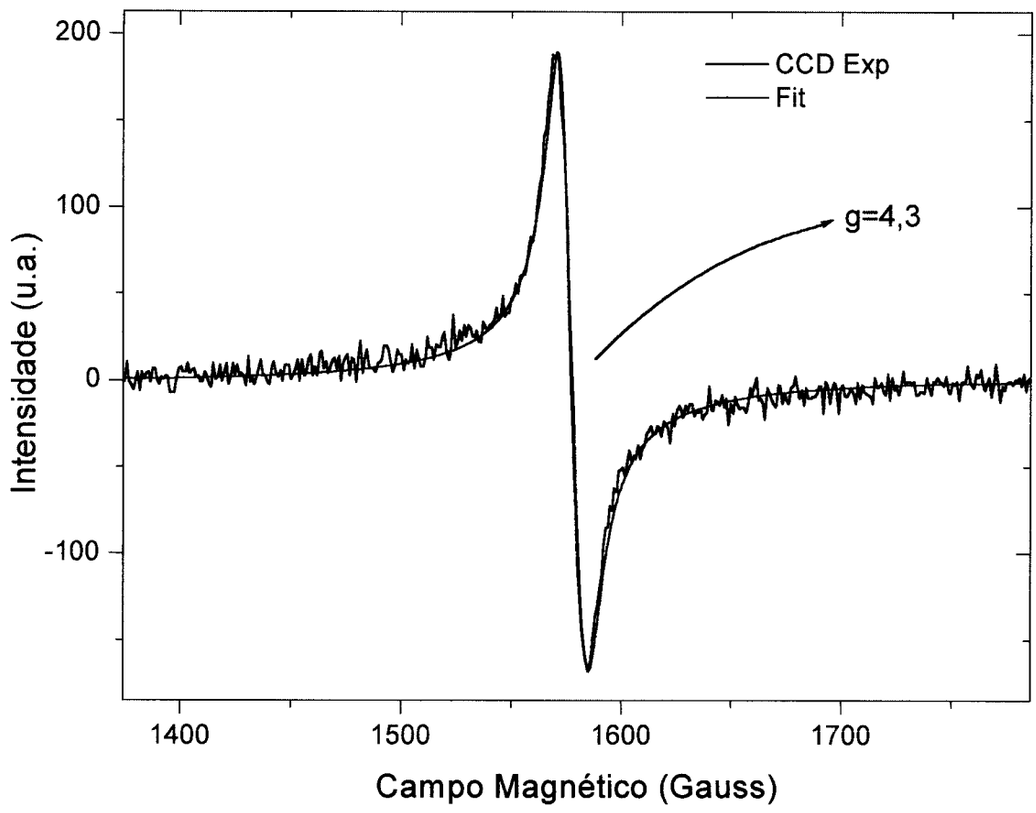


Figura I.3.8: Simulação do espectro da enzima CCD medido a 4 K obtida através do program Simphonia – Bruker.

Para a determinação dos desdobramentos de campo zero, fez-se necessário o levantamento da curva de saturação da proteína através das medidas com variação da potência de microondas descritas na seção I.2.3.3. A curva de saturação obtida está apresentada na **Figura I.3.9** e mostra que a potência de microondas de 4 mW é a mais adequada uma vez que teremos o máximo de potência possível (máxima intensidade por conseguinte) sem a saturação do sinal em g=4,3.

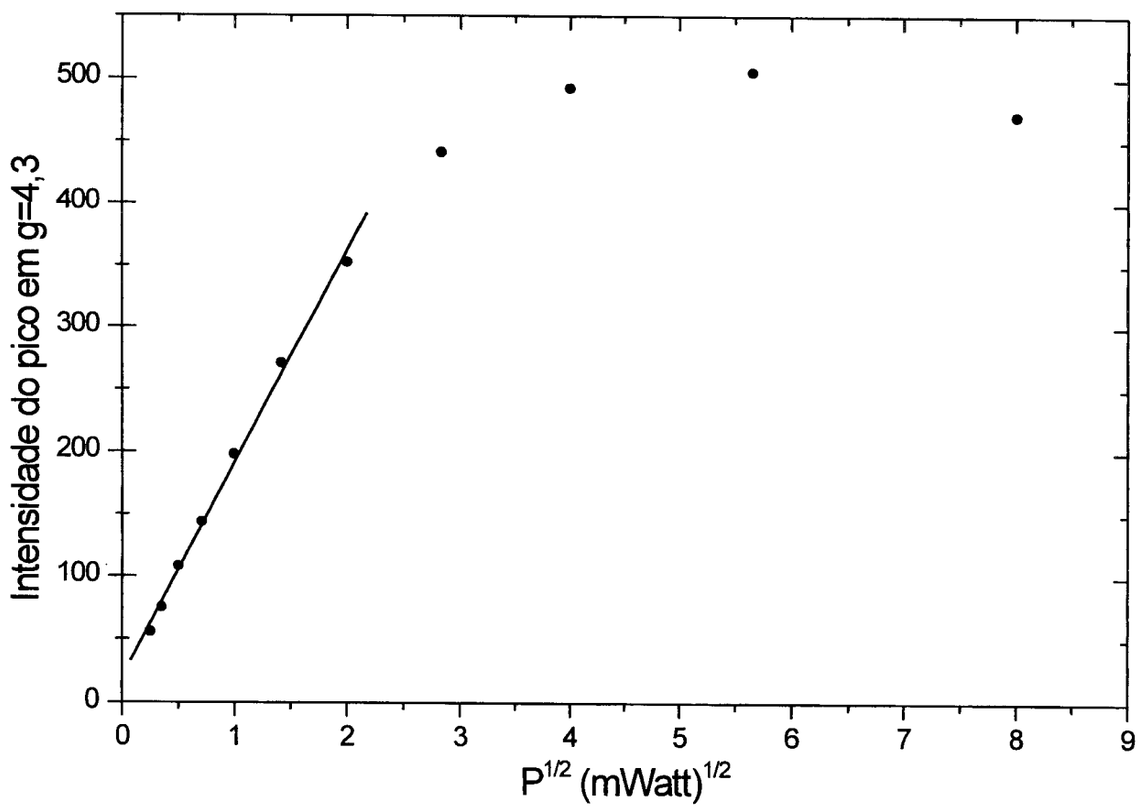


Figura I.3.9: Curva de saturação para a enzima CCD obtida a 4 K. A potência de 4 mW foi escolhida por fornecer a maior amplitude do sinal possível sem a sua saturação.

Uma vez determinada a potência conveniente de trabalho, examina-se a dependência com a temperatura da intensidade do sinal de EPR. Como a largura dessa linha se manteve constante durante a variação da temperatura, é utilizado a sua intensidade pico-a-pico como um dos parâmetros para a construção da **Figura I.3.10**. Com a informação a respeito do valor das separações ΔE_1 e ΔE_2 entre os três dubletos obtida anteriormente, com a última sendo o dobro da primeira, pois $\lambda=1/3$, procede-se com o ajuste dos dados experimentais da **Figura I.3.10** à eq. (I.2.8). Esse ajuste forneceu o valor 6,7 K para $\Delta E_1=4(7)^{1/2}D/3$ e, consequentemente, $D=(1{,}3\pm0{,}2)\text{cm}^{-1}$. Somente os pontos até a temperatura de 30 K foram utilizados, visto que acima desse valor a linha de EPR tem sua intensidade diminuída por mecanismos de relaxação e não mais apresenta o comportamento descrito pela eq. (I.2.8). O valor do parâmetro D está dentro de um intervalo razoável de valores já obtidos para outras proteínas contendo Fe(III) em simetria rômbica (Pinkowitz & Aisen, 1972; Blumberg & Peisach, 1973).

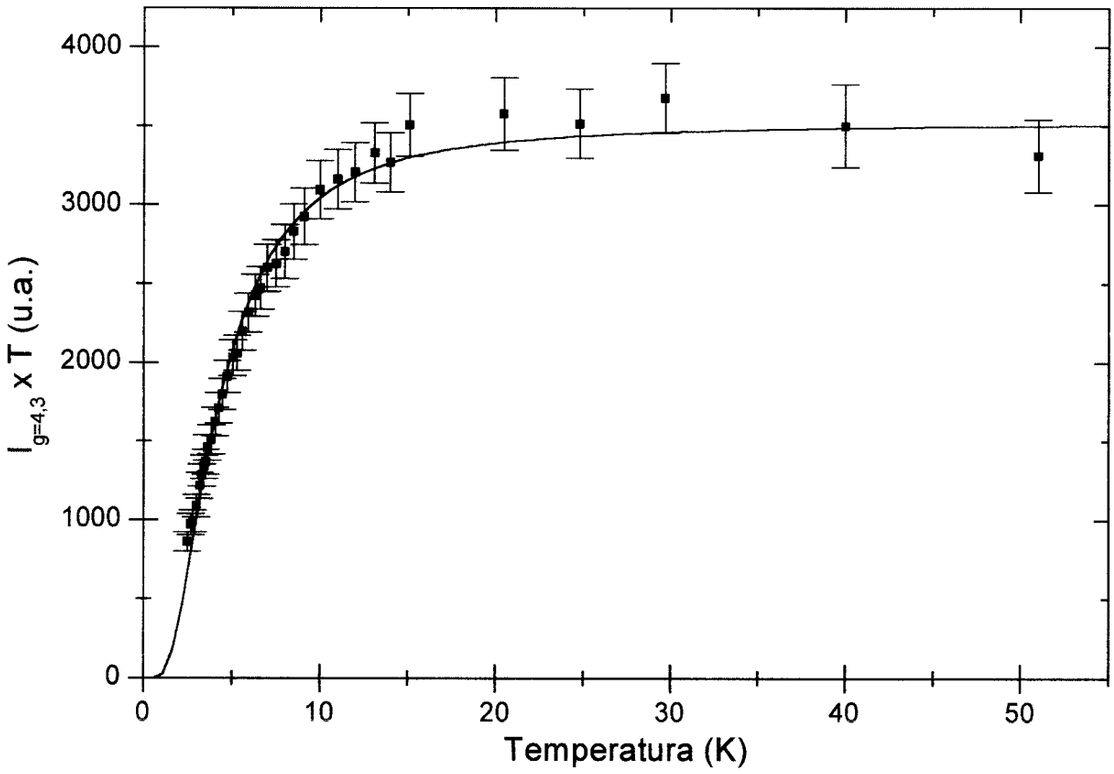


Figura I.3.10: Dependência com a temperatura do sinal de EPR em g=4,3. A linha sólida foi obtida através da eq. (I.2.8) para λ=1/3 e D=(1,3±0,2) cm^{-1}.

Quantificação do Íon Fe(III)

Os espectros da CCD, da transferrina e dos compostos BBPPN e BBPEN foram obtidos como descrito anteriormente (**Figura I.3.11**) e, subsequentemente, integrados duas vezes para a determinação da área da linha de absorção de RPE, proporcional ao número de spins que contribuem para o sinal. Uma subtração entre cada um dos espectros acima e um do tubo de quartzo vazio foi realizada, assim como correções das linhas de base. O número de moléculas de CCD, transferrina, BBPPN e BBPEN nas soluções usadas foi determinado através da medida da

concentração (obtida pela absorção ótica para as duas proteínas e pela pesagem de quantidades adequadas dos outros dois compostos). A partir das áreas calculadas e do número de moléculas, obtivemos os seguintes valores para o conteúdo de Fe(III) da enzima CCD:

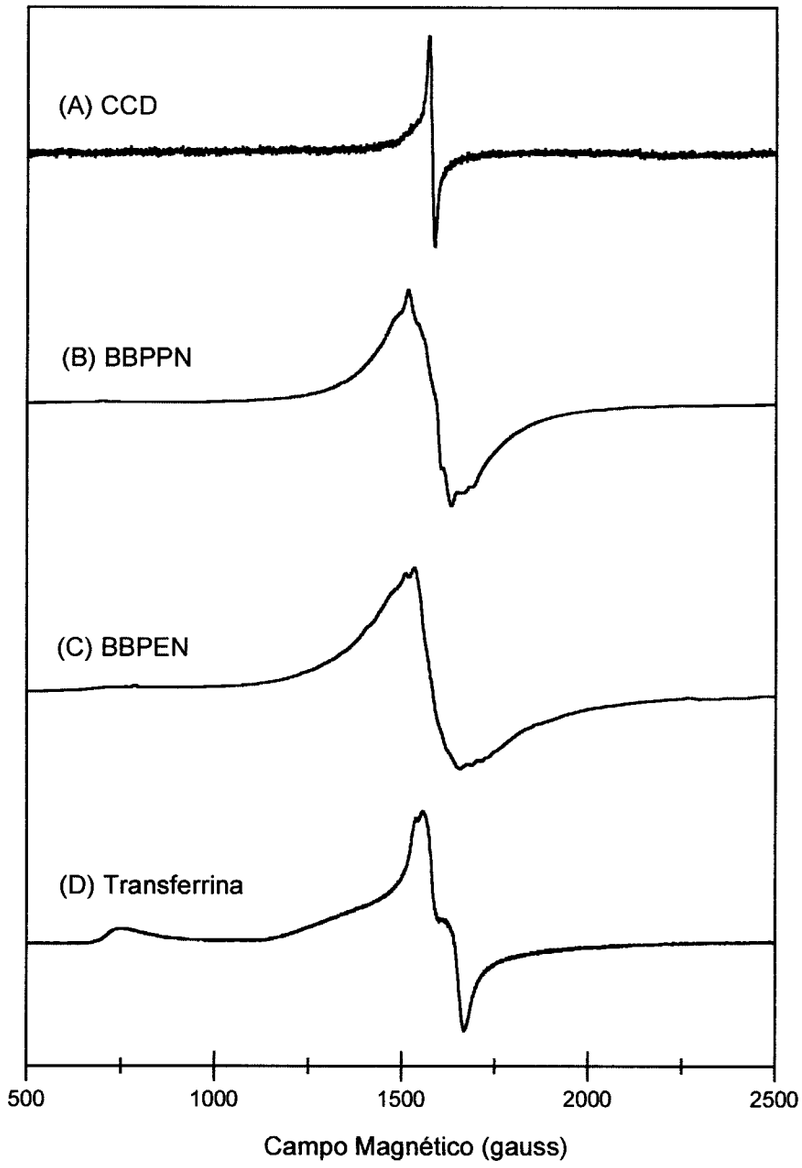


Figura I.3.11: Espectros da: (A) CCD; (B) BBPPN; (C) BBPEN e (D) Transferrina bovina usados para a quantificação do número de íons Fe(III) por molécula de CCD. Todos foram adiquiridos sob as mesmas condições experimentais.

Tabela I.3.3: Quantificação do número de íons Fe(III) por molécula de CCD.

Padrão utilizado	Fe/molécula de CCD
BBPPN	0,9±0,1
BBPEN	1,1±0,1
Transferrina	1,4±0,1

Uma dificuldade enfrentada e que acarretou a realização de vários experimentos de quantificação residiu no fato de se ter realizado os primeiros experimentos com uma quantidade de Fe por proteína CCD muito baixa (em torno de 1 íon Fe para cada 20 moléculas de CCD). Para resolver este problema, foi acrescentado ao meio de cultura onde é crescida a bactéria que expressou a proteína de interesse uma quantidade de 50 mg de $FeSO_4$ por litro de meio de cultura. Após esse cuidado é que foi possível se obter os resultados mostrados na tabela acima. Deve-se salientar, ainda, que os valores obtidos apresentam erros da ordem de 10%, que estão dentro dos valores normais observados quando da utilização do método comparativo para determinação de conteúdo de spins. Tais erros são oriundos, principalmente, de imprecisões no cálculo das áreas e na determinação das concentrações das amostras.

Os resultados acima confirmam a presença de apenas um íon Fe(III) por molécula de CCD, assim como obtido Broderick & O'Halloran (1991) usando outro método de quantificação. Assim, a composição molecular da enzima CCD de *P. putida* é (α_2Fe). Embora, essa relação Fe/molécula seja pouco usual, existem casos similares em outras catecol dioxigenases (Nakai *et al.*,1990; Chen & Lovell, 1990)

Titulação com o Substrato - Gráfico de Scatchard

As experiências de titulação foram realizadas diversas vezes até que fossem estabelecidas as melhores condições para a sua realização. O primeiro ponto testado foi quanto tempo é necessário deixar a reação acontecer, pois uma primeira tentativa de titulação na qual se procedia com o congelamento imediato da solução enzima+substrato (logo após a mistura) não apresentou resultados coerentes. Foram realizadas, então, experiências onde se variava o tempo de espera e ao mesmo tempo homogeneizava-se a solução final, assim como feito anteriormente, com a diferença que, desta feita, a relação enzima:substrato estava bem determinada através das concentrações das soluções de partida. Estabelecido, então, as condições de medida a partir das medidas acima e daquelas de atividade enzimática, passou-se para a titulação propriamente dita.

A adição de substrato em concentrações crescentes à solução da enzima CCD teve como resultado uma diminuição gradativa da intensidade do sinal em g=4,3, sem o aparecimento de outras linhas que pudessem indicar alterações da simetria local em torno do íon ou mudança do seu estado de spin (**Figura I.3.12**). Além disso, a linha observada não sofreu alargamentos durante a reação com o substrato (**Figura I.3.7** inset). Esses dois fatos sugerem uma redução do estado de valência do íon, que passaria de Fe(III) para Fe(II). Isto explicaria a redução em intensidade do sinal à medida que aumentamos a quantidade de substrato presente, já que Fe(II) apresenta-se em estados de spin S=0 ou S=2, ambos não detectáveis por EPR.

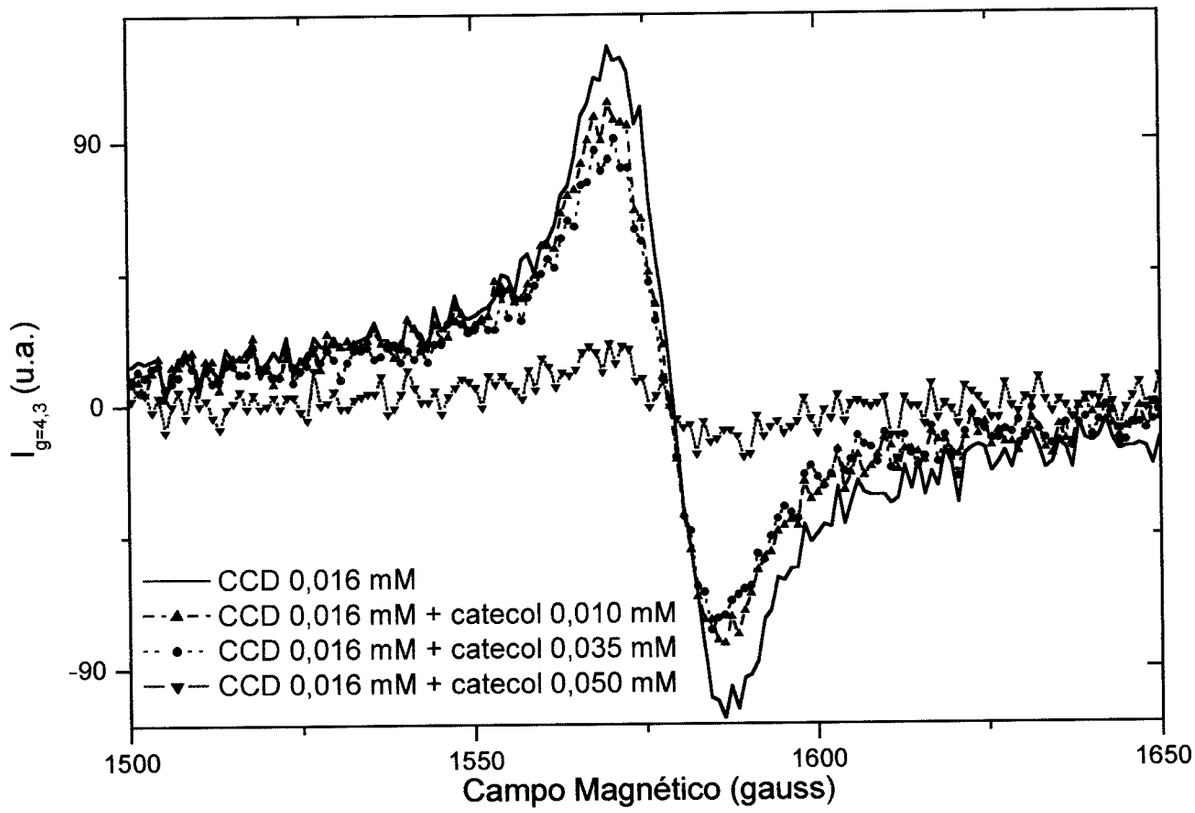


Figura I.3.12: Efeito da adição de concentrações crescentes de substrato à solução da enzima, visto do ponto de vista do espectro de EPR. Somente os espectros de algumas concentrações estão mostrados para facilitar a visualização.

A construção do gráfico de Scatchard, através do qual pode-se determinar quantos sítios de ligação para o substrato existem e a constante de afinidade desse substrato por tal sítio, foi tentada a partir dos espectros obtidos com a titulação. As grandezas número de ligantes ligados, moles de proteína e número de ligantes livres estão relacionadas, respectivamente, às diferenças em intensidade dos sinais da CCD pura e da solução CCD+catecol para as várias concentrações de substrato, à

intensidade do sinal da CCD pura e à diferença entre o número de moléculas de catecol colocadas em solução e o número de ligantes ligados.

Dentre os vários experimentos realizados, o melhor resultado obtido está apresentado na **Figura I.3.13**, que foi obtido após se ter conseguido determinar as melhores condições experimentais para as etapas envolvidas na titulação. O gráfico de Scatchard apresenta comportamento linear, característico do caso onde existem sítios identicos e independentes. A **Figura I.3.13**, apesar de ter sido feita para poucas concentrações de substrato, evidencia claramente a intersecção da reta ajustada ao dados experimentais em N=1. Ou seja, a CCD apresenta um único sítio de ligação para o catecol. Segundo a eq. (I.2.11), além do número de sítios, também podemos calcular a constante de equilíbrio da reação de associação do complexo enzima+substrato (CCD + catecol $\xrightarrow{k}$ CCD-catecol, v. **Figura I.1.4b**) através do coeficiente angular da eq. (I.2.9), que fornece k=(2,7±0,1)×10^{-6} M, valor em acordo com resultados de Broderick & O'Halloran (1991) e dentro do intervalo usual para este tipo de ligação (Haynie, 2001).

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO

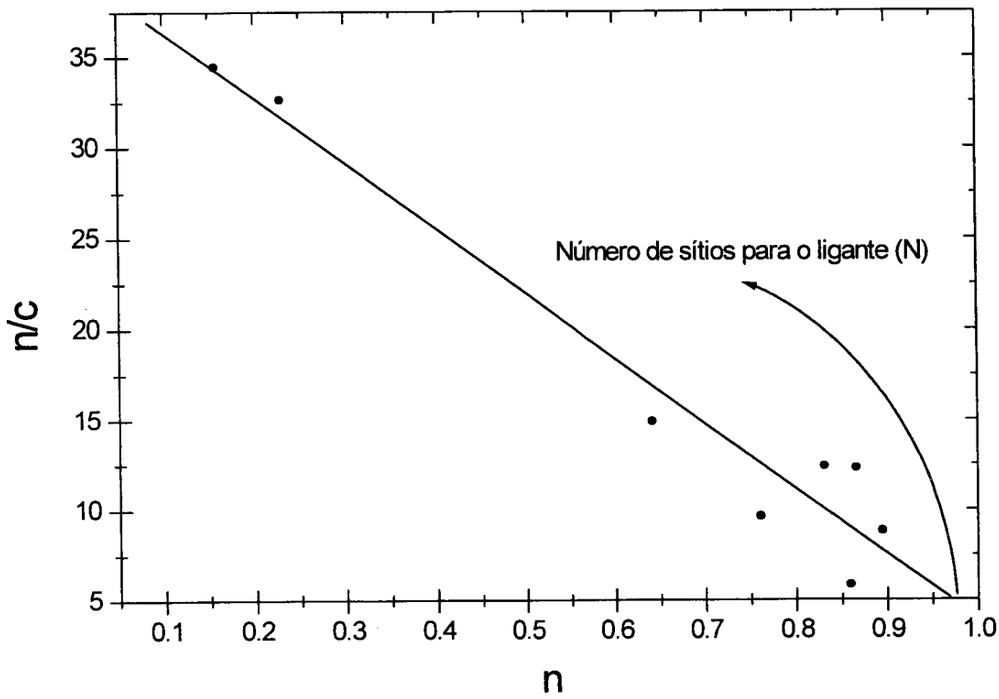


Figura I.3.13: Gráfico de Scatchard para a CCD construído a partir dos experimentos de titulação. A intersecção com o eixo das abscissas fornece o valor de *N*.

Variação do pH

Os espectros obtidos com a variação do pH da solução da amostra estão apresentados na **Figura I.3.14**. Diferenças acentuadas entre os espectros podem ser observadas, evidenciando a desnaturação da proteína para valores de pH inferiores a 6 e superiores a 8. A relação *E/D* parece ter seu valor alterado, acarretando desdobramentos do sinal em *g*=4,3 (aparecimento de uma linha em *g*=4,5). Ou seja, a simetria local em torno do Fe(III) sofre mudanças de maneira a afastar o valor *E/D* de 1/3 (simetria rômbica).

Uma análise conjunta dos resultados obtidos via dicroísmo circular e atividade enzimática confirma o intervalo de valores de pH entre 6 e 8 como sendo aquele onde a proteína está mais ativa, com o enovelamento correto e com a simetria local em torno do íon preservada. Os resultados de EPR mostram que para valores de pH menores do que 6, o grupo hidroxila que está coordenado com o Fe(III) é removido (titulável) levando a um alteração da simetria do sítio ativo da proteína. Esse fato proporciona a queda da atividade da mesma, medida por absorção ótica e para valores de pH ainda menores, observamos a completa desnaturação da CCD via dicroísmo circular. Para valores de pH superiores a 8, atividade da proteína é também reduzida, mas de maneira menos intensa, assim como o desenovelamento não é tão drástico quanto para pH's ácidos. O espectro de EPR em pH 9 indica uma mudança dos parâmetros de campo cristalino, mas com uma redução menos acentuada da intensidade e da forma do sinal em g=4,3 quando comparada àquela observada em pH's ácidos.

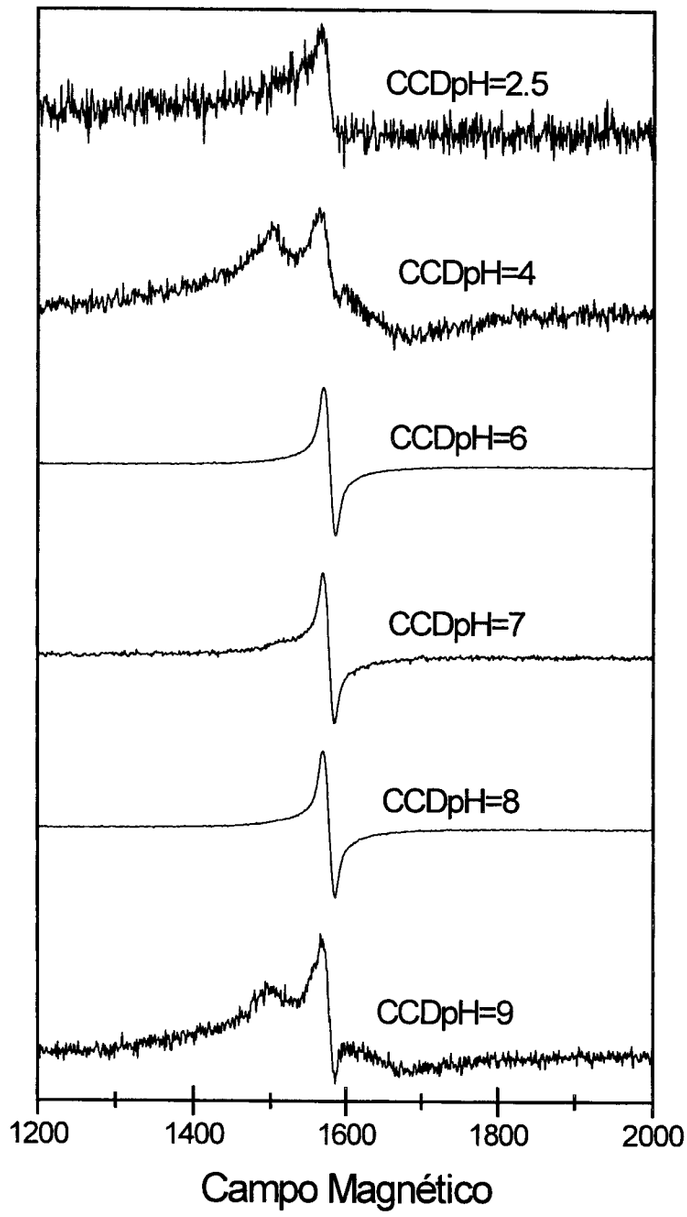


Figura I.3.14:Dependência do sinal de EPR com a variação do pH da solução de CCD. O intervalo onde a proteína está mais ativa e conservada vai de pH 6 até 8.

Estudos da estrutura dinâmica de biomembranas por EPR pulsada bidimensional

Capítulo II.1

Introdução – EPR Pulsada e o Estudo de Membranas de Interesse Biológico

A técnica de EPR tem sido uma ferramenta muito importante no estudo de estrutura de membranas e sua dinâmica (Freed, 1987; Marsh, 1985). A alta sensibilidade e escala de tempo favorável de EPR, combinada com a disponibilidade de marcadores de spin com estruturas muito similares à de componentes naturais de biomembranas, permitem uma caracterização detalhada de membranas em geral. Infelizmente, os espectros de EPR de muitas biomembranas são complexos e podem ser mal interpretados se apenas uma análise superficial é usada. Uma solução para esse problema é se fazer espectroscopia de EPR em amostras alinhadas macroscopicamente, que fornecem elevada resolução espectral. Assim, simulações espectrais detalhadas permitem a quantificação dos detalhes da estrutura dinâmica da membrana e como esta muda em função da temperatura e composição, por exemplo (Kar *et al.*, 1985; Tanaka & Freed, 1985). Entretanto, para muitos sistemas

biológicos relevantes pode não ser conveniente e nem possível a preparação de amostras alinhadas, ao passo que amostras de dispersões desordenadas macroscopicamente contendo um marcador de spin podem ser prontamente preparadas. No entanto, a superposição de espectros oriundos de diferentes fragmentos da membrana que estão localmente ordenados mas aleatoriamente orientados reduz significativamente a resolução espectral numa analogia à perda de resolução em estudos de sólidos nas formas cristalina e policristalina. Essa perda de resolução é a principal fonte de ambigüidades na análise de espectros de EPR, os quais são chamados de espectros de EPR MOMD (i.e., "microscopically ordered but macroscopically disordered") (Meirovitch *et al.*, 1984; Ge & Freed, 1993).

Mesmo com os avanços descritos acima, uma outra causa de baixa resolução é o uso preponderante de espectros de EPR no modo convencional ("continuous wave"), que apresentam alargamentos inomogêneos significativos devido a interações superhiperfinas entre o marcador de spin e prótons vizinhos. Esse alargamento inomogêneo compromete a sensibilidade à dinâmica molecular mesmo para amostras bem alinhadas. Além disso, em dispersões macroscopicamente desordenadas, o efeito MOMD contribui com mais uma fonte de alargamento inomogêneo, o que compromete ainda mais a sensibilidade à dinâmica. Em princípio, o efeito MOMD sobre as larguras e formas de linha pode ser usado para obter informação sobre os parâmetros de ordem, mas é difícil de desconvoluir este efeito daqueles de interações superhiperfinas e movimento, mesmo quando simulações espectrais detalhadas são feitas (Ge & Freed, 1993).

Como dito anteriormente, EPR convencional tem sido usado amplamente no estudo de estrutura dinâmica de membranas (Hubbell & McConnell, 1971; Marsh, 1985; Freed, 2000; Borbat *et al.*, 2001), mas recentemente, as chamadas técnicas

modernas de EPR, incluindo EPR bidimensional e alto campo-alta freqüência, têm demonstrado trazer grandes vantagens adicionais àqueles estudos iniciais (Freed, 2000; Borbat *et al.*, 2001). Técnicas de 2D-FT-EPR fornecem resolução spectral melhor à ordem e dinâmica comparado com EPR convencional (Patyal *et al.*, 1997). Uma das metodologias de 2D-FT-EPR é a ressonância eletrônica dupla ("2D-electron-electron double resonance"-2D-ELDOR) (Patyal *et al.*, 1990; Gorcester *et al.*, 1990; Crepeau *et al.*, 1994; Patyal *et al.*, 1997; Borbat *et al.*, 1997; Freed, 2000; Borbat *et al.*, 2001). Os picos cruzados em espectros de 2D-ELDOR são uma medida da transferência de magnetizaçã por processos de relaxação de spin. O crescimento de picos cruzados fornece, portanto, informações qualitativas e quantitativas sobre como mecanismos de relaxação, como spin exchange e interações dipolares magnéticas entre moléculas marcadas, afetam a difusão translacional e rotacional. As formas de linha dos picos diagonais e cruzados são particularmente informativas, especialmente para a combinação tipo eco do espectro de 2D-ELDOR (S_{c-}) (Gamliel & Freed, 1990; Crepeau *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1994; Patyal *et al.*, 1997; Freed, 2000; Borbat *et al.* 2001).

O principal objetivo dos projetos em EPR bidimensional aqui apresentados é o estudo da estrutura dinâmica de diferentes membranas lipídicas, bem como o comportamento de suas propriedades físico-químicas em função de parâmetros como a temperatura e a composição. Para colocar os assuntos abordados em contexto, uma breve descrição de cada um dos problemas investigados é dada abaixo.

A Estrutura Dinâmica de Biomembranas - O Estado de Líquido Ordenado ("Liquid-Ordered Phase")

A complexa organização de membranas biológicas pode ser estudada através do uso de membranas lipídicas mais simples, cuja composição é escolhida de maneira a enfatizar aquelas propriedades que se deseja investigar. O caráter anfifílico dos lipídios faz com que, em solução aquosa, eles se agrupem em bicamadas que podem, por sua vez, estar empacotadas de diversas maneiras. Assim, são definidas várias fases dos lipídios na membrana, como a fase gel, na qual os lipídios estão mais ordenados e a membrana é menos fluida, e a fase de líquido cristalino, onde a membrana é mais fluida e os lipídios têm suas cadeias acílicas desordenadas.

Colesterol e seus derivados são componentes comuns de biomembranas, sendo encontrados principalmente em membranas plasmáticas de células eucarióticas, onde podem responder por até 50 mol% da composição lipídica de tais membranas (Bloom & Morritsen, 1991). Eles funcionam como moduladores passivos da membrana (Bloch, 1995), alterando suas propriedades físico-químicas, como a fluidez. Mais recentemente, outra função tem sido atribuída às moléculas de colesterol em biomembranas: a formação de domínios liquído ordenados (Lo) devido à interações específicas entre as moléculas de colesterol e lipídios com pelo menos uma cadeia acílica saturada. Esses domínios, denominados "rafts" em membranas biológicas (Simons & Ikonen, 1997; Brown & London, 1997; Brown & London, 1998), desempenham papel importante na transferência de sinais do meio extracelular para o citoplasma (transdução de sinal – "signal transduction) (Field *et al.*, 1995; Field *et al.*, 1997). Portanto, entender o papel dos lipídios e como sua organização afeta os processos relevantes para o funcionamento celular é uma área de bastante interesse.

Tem sido demonstrado que a presença de colesterol na membrana em concentrações superiores a 22 mol% leva a membrana a estar no estado de líquido ordenado (Lo) (Ipsen *et al.*, 1987), que possuem alguma características bastante peculiares e, à primeira vista, contraditórias. Assim como na fase gel ou sólido ordenado (So), as cadeias acílicas dos lipídios em fase Lo encontram-se mais ordenadas do que na fase de liquído cristalino (Lc). Entretanto, como em um líquido, as taxas de rotação e translação das cadeias lipídicas em fase Lo são mais rápidas do que aquelas obtidas na fase So. Vist & Davis (1990) mostraram que não há forças restauradoras em membrnas na fase Lo e, portanto, estas se comportam como um fluido bidimensional (Bloom *et al.*, 1991).

O objetivo principal deste primeiro trabalho é a caracterização através de técnicas bidimensionais de EPRda fase de líquido ordenado em membranas modelo de lipídio-Chol e a comparação de tais resultados com aqueles obtidos para a fase de cristal líquido em membranas de lipídio puro.

O passo seguinte ao estudo de membranas modelo é a aplicação das técnicas bidimensionais ao estudo de membranas biológicas. Assim, é feito uso de membranas plasmáticas obtidas a partir de células de linfócitos de rato (RBL-2H3), chamadas doravante simplesmente de membranas bleb. Estas membranas contêm receptores que iniciam o processo de transdução de sinal após sua agregação com um antígeno específico. Além disso, é sabido que essas membranas possuem altas concentrações de colesterol, esfingomielina e gangliosídios (Brown & Rose, 1992), o que leva a crer que estão em fase Lo ou que contêm domínios onde os lipídios estão naquela fase. Ge *et al.* (1999) demonstraram através de experimentos de EPR-CW que membranas DRM ("detergent resistant membranes") de células RBL-2H3 contêm domínios na fase Lo, sendo estes os primeiros resultados experimentais sobre

propriedades físicas de DRM isoladas de células.

Distinção e Caracterização de Lipídios tipo "Bulk" daqueles tipo "Boundary" em Membranas contendo Gramicidina A':

Interações entre lipídios e proteínas têm sido intensamente estudadas por várias técnicas espectroscópicas tanto em membranas reconstituídas quanto em membranas biológicas (Watts & De Pont, 1986; Mouritsen, 1986). Entretanto, os efeitos de proteínas integrais sobre a organização e propriedades dinâmicas dos lipídios da membrana ainda carecem de mais investigações. Por exemplo, de Kruijff *et al.* (1985) sugerem que a agregação de proteínas pode ser um agente modulador da fase em que se organizam os lipídios. Outro exemplo diz respeito aos processos de endocitose e exocitose, durante os quais estruturas transientes contendo segmentos da membrana, cuja formação pode ser induzida pela agregação de algumas proteínas especializadas, têm que ser formadas localmente. Assim, estudos de como a agregação de proteínas modula a estrutura lipídica na membrana ajudariam a entender os mecanismos moleculares em eventos como os citados acima.

Em modelo sugerido por Jost *et al.* (1973) aparece a idéia que um lipídio na vizinhança imediata de uma proteína está imobilizado e a esse lipídio dá-se o nome de lipídio ligado ("boundary lipid"). Esse modelo se baseia na observação de espectros de EPR contendo duas componentes quando são medidas amostras de marcadores de spin em membranas contendo misturas de lipídios e proteínas, ao passo que apenas uma componente é observada no espectro de membranas formadas pelo lipídio puro. Assim, um sistema muito utilizado nesse tipo de experimentos é aquele constituído pelo peptídeo Gramicidina A' (GA) incorporado a membranas lipídicas diversas. O peptídeo GA é comumento usado devido à sua disponibilidade

comercial, estrutura simples e fácil incorporação em bicamadas lipídicas. Além disso, é bem conhecido que a agregação de moléculas de GA leva à formação de fase hexagonais H_{II} (Killian, 1992) dos lipídios e esta é de fundamental importância em diversos processos biológicos que acontecem em biomembranas.

A técnica de EPR-CW tem sido uma ferramenta valiosa no estudo de interações lipídios-proteínas em sistemas diversos. Ge & Freed (1993) apresentaram simulações detalhadas da forma de linha de espectros de vesículas multilamelares contendo misturas de (lipídios-GA-marcador de spin) para diferentes concentrações de GA. Esses experimentos, embora muito informativos, sofreram pela limitação em resolução de espectros de EPR-CW naquele tipo de amostra. Mais recentemente, Ge & Freed (1999) realizaram estudos sobre os efeitos da agregação de GA sobre o lipídio ligado através do monitoramento das mudanças na quantidade formada desse lipídio. A melhor resolução alcançada por métodos de 2D-FT-EPR pode, então, ser aplicada com eficácia ao estudo dos efeitos da presença de moléculas de GA sobre a fase lipídica da membrana (Patyal *et al.*, 1997) e este se constitui no terceiro problema a ser abordado no presente trabalho de tese.

Capítulo II.2

Materiais e Métodos

No presente capítulo são descritos os procedimentos envolvidos na preparação de amostras para medidas de 2D-FT-EPR, processamento dos dados e simulação dos espectros obtidos. Além disso, é conveniente incluir uma breve apresentação sobre os fenômenos básicos relacionados à técnica de EPR bidimensional.

II.2.1 Materiais

Os lipídios 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-fosfatidilcolina (DPPC) e esfingomielina (SM), assim como os marcadores de spin 1-palmitoil-2-(16-doxil stearoil) fosfatidilcolina (16-PC), dipalmitoilfosfatidil tempo (2,2,6,6,-tetrametil-1-oxi) colina (DPPTC), foram adquiridos junto à Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, AL). O peptídeo Gramicidina A′, que é uma mistura de Gramicidinas A, B e C, e o marcador de spin 3β-doxil-5α-colestane (CSL), um derivado de colesterol, foram comprados da empresa Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Todos esse materiais foram utilizados sem outros procedimentos de purificação que não aqueles realizados pelos respectivos fabricantes.

II.2.2 Preparação de Amostras

Membranas modelo com marcador de spin

O procedimento aqui descrito é geral e vale para todos as amostras usadas nos experimentos de 2D-FT-EPR de membranas modelo. Assim, soluções estoque de lipídios em clorofórmio e marcadores de spin em clorofórmio:metanol 1:1 foram misturadas em tubo de vidro. A massa total de lipídios em cada preparação foi de 2 mg e a concentração de marcador de spin foi sempre mantida em 0,5 mol% dos lipídios presentes na amostra. No caso de experimentos de EPR pulsado, a concentração de marcador de spin pode ser aumentada até cerca de 2 mol% de lipídios sem conseqüências para o espectro, já que em experimentos envolvendo a medida do eco de spins, efeitos de alargamento inomogêneos podem ser cancelados e/ou separados. Uma vez misturados lipídios e marcador de spin, a solução final foi evaporada em fluxo de N_2, com os lipídios secos formando um filme fino nas paredes do tubo de vidro. A fim de se garantir a completa eliminação de resíduos de clorofórmio da amostra, esta é mantida "overnight" sob vácuo. A seguir, a amostra é hidratada em volume adequado de tampão 50 mM Tris (pH 7,0), 160 mM de NaCl e 0,1 mM EDTA. Os lipídios são, então, raspados das paredes do tubo, agitados em vórtex e mantidos no escuro a temperatura ambiente por pelo menos 3 horas para hidratação das membranas. Após a hidratação, as amostras são centrifugadas até que se forme um "pellet" razoável para a transferência das vesículas do tubo de vidro para um capilar adequado (I.D. 1,5 mm). A última etapa de preparação envolve a troca de O_2 por N_2. O objetivo aqui é eliminar o oxigênio presente na amostra e que faz com que o tempo de relaxação T_1 do marcador de spin fique ainda mais curto, acarretando um decaimento muito rápido do sinal de EPR. Para tanto, as amostras são colocadas em um "glove bag" onde é feita uma atmosfera de N_2. Bombeia-se,

então, no interior do capilar com um fluxo de N_2 por pelo menos 2 horas, selando-se o capilar com parafina após tal processo. Testes com medida dos tempos T_1 mostraram que o processo de eliminação de O_2 descrito acima apresenta resultados satisfatórios no que tange a realização dos experimentos de 2D-FT-EPR.

16-PC em membranas de DPPC:GA (1:1)

Soluções de Gramicidina A′ (GA) (25,6 mg de GA em 0,25 mL de metanol) e DPPC/16-PC (50 mg de DPPC em 0,282 mL de solução 2,9 mM de 16-PC em clorofórmio) são misturadas em um tubo de vidro e repete-se o procedimento descrito acima para membranas modelo. Tal procedimento fornece uma mistura de DPPC:GA na razão molar 1:1 e contendo 1 mol % do marcador de spin 16-PC.

16-PC em membranas Bleb

As membranas bleb são membranas plasmáticas extraídas de mastócitos de ratos (RBL-2H3) (Holowka & Baird, 1996) e preparadas pelo grupo da Prof.(a) Barbara Baird (Baker Laboratory-Cornell University) e têm, em seguida, o marcador de spin 16-PC incorporado a elas segundo o procedimento a seguir. O volume total de membranas bleb é de aproximadamente 1 mL por preparação e contém cerca de 8×10^7 células. Uma alíquota de 10 μL de uma solução 0,07 mM do marcador 16-PC em metanol é adicionada ao tubo contendo as membranas, que são incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente. Esse volume de células com o marcador é, então, diluído em PBS (pH 7,5) até se ter um volume final de cerca de 5 mL. Após adição do marcador, ultracentrifuga-se a amostra a 49000 rpm a 4°C por 60 minutos e, em seguida, transfere-se o "pellet" resultante para um capilar. Os passos seguintes para remover o O_2 e selar o tubo são os mesmos descritos acima para membranas modelo.

II.2.3 Métodos em 2D-FT-EPR

Os experimentos em 2D-FT-EPR podem ser divididos em dois tipos: experimentos a dois pulsos ("Correlation Spectroscopy"-COSY e "Spin Echo Correlation Spectroscopy"-SECSY, **Figura II.2.1b-c**) e a três pulsos (como "Electron-Electron Double Resonance"-ELDOR, **Figura II.2.1a**). Na primeira classe, SECSY-EPR possibilita a separação dos alargamentos homogêneos de espectro alargados inomogeneamente, assim tornando possível se obter informações sobre a dinâmica de spins. Informações equivalentes e adicionais podem ser obtidas a partir de experimentos de COSY-EPR.

Uma característica de COSY-EPR que é compartilhada por todos as técnicas de 2D-FT-EPR baseados na medida de FIDs é que detecta-se um sinal em quadratura dupla, que é um sinal complexo (com uma parte real relacionada à absorção e uma parte imaginária dispersiva) com respeito a cada uma das freqüências que caracterizam o experimento bidimensional. Esse sinal em quadratura duplo é obtido durante a medida a partir da seqüência de 16 passos usada para "phase cycling", onde os 8 primeiros passos têm o objetivo de cancelar termos axiais, offsets dc, reter os efeitos de uma seqüência do tipo CYCLOPS (Hoult & Richards, 1975). Os seguintes 8 passos diferem da primeira série apenas na fase do pulso de preparação, que é adiantada de $\pi/2$. Os dois sinais complexos oriundos de cada ciclo de 8 passos são chamados de S' e S'' e constituem o sinal completo em quadratura duplo necessário para as medidas de 2D-FT-EPR (Gorcester *et al.*, 1990).

Gamliel & Freed (1990) demonstraram que os dados em quadratura dupla são melhor representados por uma combinação linear de S' e S'' da forma:

$$\begin{aligned} S_{c-} &= S' - iS'' \\ S_{c+} &= S' + iS'' \end{aligned} \qquad \text{(II.2.1).}$$

A primeira (S_{c-}) é a combinação que fornece apenas os dados de eco de spin depois do "phase cycling" e que cancela qualquer contribuições tipo FID dos pulsos. A combinação S_{c+} é chamda contribuição do tipo FID porque não é refocalizada pelo segundo pulso. Na ausência de alargamentos inomogêneos as duas combinações são idênticas, mas na presença de tais alargamentos, S_{c-} e S_{c+} são sinais bastante diferentes, com S_{c-} apresentando picos mais estreitos devido ao cancelamento do tipo eco das inomogeneidades. Ao longo do presente trabalho, os sinais de 2D-FT-EPR apresentados serão sempre aqueles referentes à combinação S_{c-}, já que esta é a que fornece maior resolução espectral.

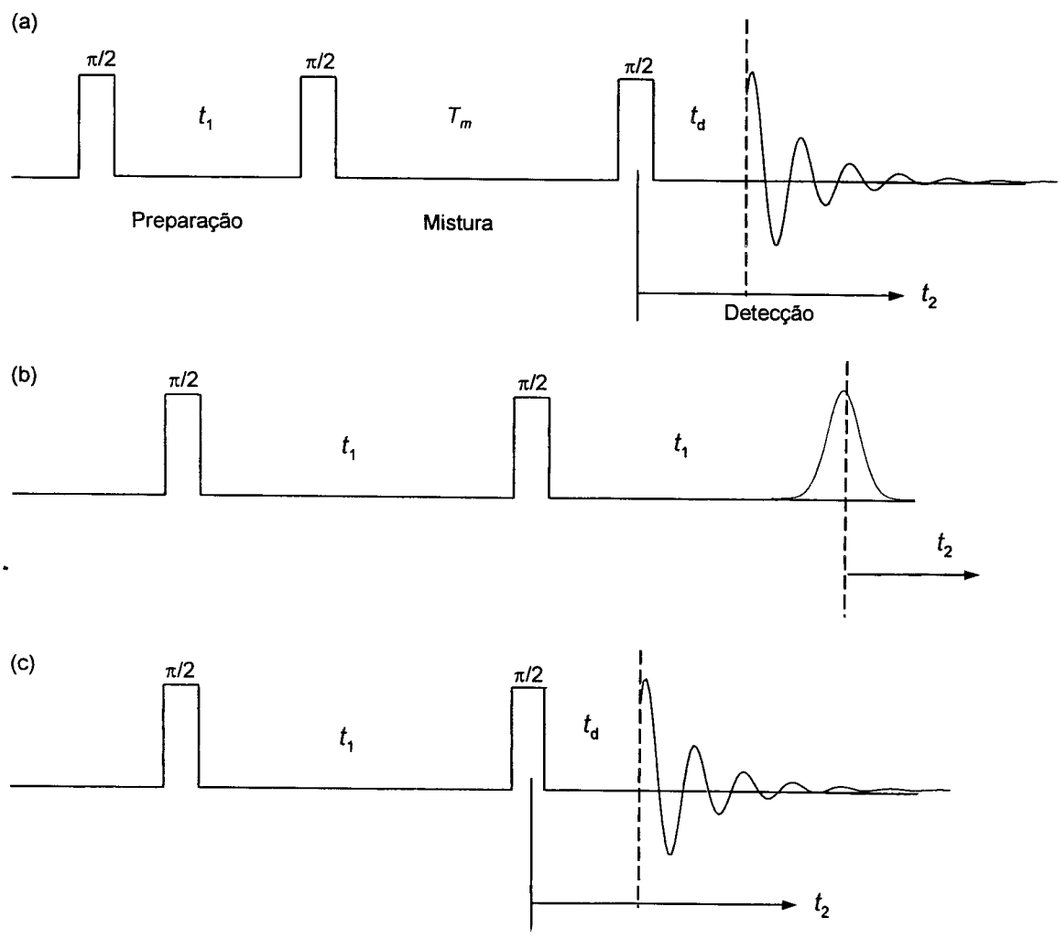


Figura II.2.1: Seqüências de pulsos usadas em medidas de 2D-EPR: (a) ELDOR, (b) SECSY e (c) COSY.

Princípios Básicos em 2D-ELDOR

Experimentos de 2D-ELDOR fornecem distinções ainda maiores do que aquelas obtidas a partir de medidas a dois pulsos como COSY e SECSY. Em espectros de 2D-ELDOR no domínio das freqüências, elementos off-diagonais, também chamados de picos cruzados, emergem e são uma medida da transferência de magnetização por processos de relaxação de spin durante o tempo de mistura (**Figura II.2.1a**). Estudos de picos cruzados em 2D-NMR têm sido uma ferramenta valiosa em estudos de estrutura e dinâmica de moléculas grandes e pequenas no estado líquido, permitindo a determinação de distâncias internucleares, tempos de correlação rotacional e complexação molecular (Abragam, 1960). A técnica bidimensional usada como base para o desenvolvimento da 2D-ELDOR aqui descrita foi proposta inicialment por Jeener *et al.* (1979) para estudos de exchange químico, com Macura & Ernst (1980) demonstrando sua aplicabilidade à medidas de relaxações cruzadas intra e intermoleculares.

A seqüência básica para 2D-ELDOR encontra-se na **Figura II.2.1a**, onde o primeiro pulso de $(\pi/2)_x$ (pulso de preparação) cria magnetização transversal. As componentes da magnetização precessionam, então, livremente por um período de evolução t_1, adquirindo assim fases diferentes (processo conhecido como "frequency labeling"). Um segundo pulso de $(\pi/2)_x$ leva a componente y de cada pacote para o eixo z negativo. Durante o subseqüente período de mistura T_m, componentes da magnetização ao longo de z podem ser transferidas sob a influência de processos de relaxação. Após tal intervalo de tempo, a magnetização resultante é trazida por um terceiro pulso $(\pi/2)_x$ ao plano xy novamente para detecção.

O aparecimento de picos cruzados pode ser entendido a partir de uma análise formal feita em NMR (Macura & Ernst, 1980) de um experimento bidimensional de

transferência de magnetização para um sistema de múltiplos spins na ausência de interações spin-spin escalares. Entretanto, interações dipolares devem estar presente para permitir a transferência de magnetização. O sistema consiste de g conjuntos de spins equivalentes, cada conjunto contendo k núcleos (k=1,...,g), com freqüências ω_k.

Relaxação cruzada das componentes M_{zk} da magnetização longitudinal acontece de acordo com a equação:

$$\dot{\boldsymbol{m}} = -R\boldsymbol{m} \qquad \text{(II.2.2).}$$

O vetor m representa os desvios de M_{zk} do equilíbrio térmico para todos os g conjuntos de spins:

$$m_k = M_{zk} - (n_k / N)M_0 \qquad \text{com } N = \sum_k n_k \qquad \text{(II.2.3),}$$

onde M_0 é a magnetização total no equilíbrio dos N núcleos e R representa a matriz de relaxação contendo as constantes R_{kl}, que representam as relaxações cruzadas e externas.

Assim, as componentes z da magnetização no início do período de mistura (**Figura II.2.1a**) estão discriminadas pelas freqüências de precessão adquiridas durante o período de evolução t_1, isto é:

$$m_l(0) = -[1 + \cos(\omega_1 t_1)\exp(-t_1 / T_{2l})]\frac{n_l}{N}M_0 \qquad \text{(II.2.4).}$$

O tempo de recuperação em direção ao valor de equilíbrio durante o período de mistura é dado pela eq. (II.2.2) com a solução:

$$\boldsymbol{m}(T_m) = \exp\{-RT_m\}\boldsymbol{m}(0) \qquad \text{(II.2.5)}$$

Finalmente, a magnetização observada durante o período de medida t_2 no eixo y é dada por:

$$M_y(t_1,T_m,t_2)=\sum_{kl}\cos(\omega_k t_2)\exp(-t_2/T_{2k})\times$$
$$\times\{[\exp(-RT_m)]_{kl}[1+\cos(\omega_l t_1)\exp(-t_1/T_{2l})]-\delta_{kl}\}\frac{n_l}{N}M_0 \qquad \text{(II.2.6)},$$

que, por sua vez, pode ser decomposta em:

$$M_y^{cross}(t_1,T_m,t_2)=\sum_{kl}\cos(\omega_k t_2)\exp(-t_2/T_{2k})\times$$
$$\times\{[\exp(-RT_m)]_{kl}\cos(\omega_l t_1)\exp(-t_1/T_{2l})\}\}\frac{n_l}{N}M_0 \qquad \text{(II.2.7)}$$

que compreende aquelas componentes que carregam as "etiquetas" de freqüência adquiridas durante o tempo de evolução. Essas são, essencialmente, as componentes que produzem picos cruzados entre as freqüências ω_k e ω_l após transformação de Fourier bidimensional em t_1 e t_2 (**Figura II.2.3**)

$$S^{cross}(\omega_1,T_m,\omega_2)=\sum_{kl}\frac{1}{2}\frac{1/T_{2k}}{(\omega_2-\omega_k)^2+1/T_{2k}^2}[\exp(-RT_m)]_{kl}\times$$
$$\times\frac{1}{2}\frac{1/T_{2l}}{(\omega_1-\omega_l)^2+1/T_{2l}^2}\frac{n_l}{N}M_0 \qquad \text{(II.2.8)}.$$

Para tempos de mistura T_m longos, essas componentes decaem a zero devido a mecanismo relaxação spin-rede T_1 ("leakage").

A segunda parte da eq. (II.2.6)

$$M_y^{axial}(t_1,T_m,t_2)=\sum_{kl}\cos(\omega_k t_2)\exp(-t_2/T_{2k})\{[\exp(-RT_m)]_{kl}-\delta_{kl}\}\frac{n_l}{N}M_0 \qquad \text{(II.2.9)}$$

não é influenciada pela precessão durante o período de evolução e, durante o período de mistura T_m, esses termos crescem de zero em direção ao valor de equilíbrio da magnetização. A transformada de Fourier da eq. (II.2.9) fornece:

$$S^{axial}(\omega_1,T_m,\omega_2)=\sum_{kl}\frac{1}{2}\frac{1/T_{2k}}{(\omega_2-\omega_k)^2+1/T_{2k}^2}\{[\exp(-RT_m)]_{kl}-\delta_{kl}\}\times$$
$$\times 2\pi\delta(\omega_1)\frac{n_l}{N}M_0 \qquad \text{(II.2.10)}$$

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO

e é a responsável pelos indesejáveis picos axiais em ω_I=0, que podem se tornar excessivamente grandes para tempos T_m longos. A decomposição de M_y em M_y^{cross} e M_y^{axial} é mostrada na **Figura II.2.2**.

Assim, espectros de 2D-ELDOR obtidos segundo a seqüência de pulsos da **Figura II.2.1a** apresentam picos diagonais e cruzados, sendo estes últimos referentes à transferência de magnetização entre as freqüências de precessão possíveis para o sistema de spins em questão. Estes picos cruzados aparecem como reflexo de mecanismos de relaxação cruzada e, para o caso de 2D-ELDOR em radicais nitróxidos, são resultado de dois mecanismos principais descritos na seção subseqüente.

Transferência de Magnetização em Experimentos de 2D-ELDOR

Na análise formal feita acima não foi dado nenhuma atenção especial aos processos responsáveis pela relaxação descrita na eq. (II.2.2). Isto é feito agora, já com uma descrição em termos do que é relevante para o caso de espectros de radicais nitróxidos em 2D-FT-EPR.

Como dito acima, dois são os principais mecanismos de relaxação nesse tipo de sistema e que levam à transferência de magnetização originadora de picos cruzados: (1) interações dipolares elétron-núcleo pertencentes à mesma molécula (END), que levam a transições nucleares (Δm_I=±1) e que afetam a taxa de reorientação rotacional; (2) interações de "exchange" (HE), que reportam na taxa de colisões moleculares entre moléculas contendo o marcador de spin. Durante os experimentos de 2D-ELDOR são obtidos espectros em função do tempo de mistura

T_m e observa-se como os picos cruzados crescem ao se variar T_m. Com essa coordenada temporal adicional, 2D-ELDOR passa a ser um experimento tridimensional em t_1, t_2 e T_m.

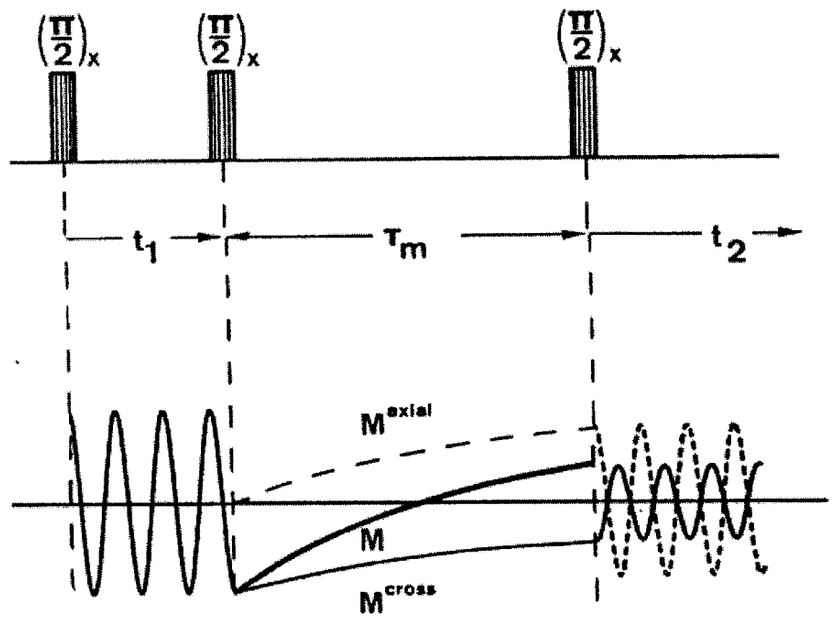


Figura II.2.2: Componentes da magnetização ***M*** em experimento de 2D-ELDOR. M^{cross} é responsável pelo aparecimento de picos cruzados devidos à transferência de magnetização, ao passo que M^{axial} dá origem aos picos axiais que não dependem da precessão durante t_1. (adaptada de Macura & Ernst, 1980).

É importante ser observado que mecanismos de relaxação END, que leva a "flips" do spin nuclear, é restrito pelas regras de seleção a transições do tipo "single quantum" e, por conseguinte, afetam apenas os chamadas "single quantum" picos cruzados. Obviamente, que para T_m suficientemente longos, END pode contribuir para picos do tipo "double quantum" através de duas transições "single quantum" consecutivas (**Figura II.2.3a**).

Colisões entre moléculas de marcadores de spin que se difundem acontecem ocasionalmente no caso de amostras em solução. Quando isto ocorre, a interação de exchange é "ligada" por um período curto de tempo (a duração do choque) e, ao se separarem, os radicais podem ter trocado seus estados de spin eletrônico. Pode-se pensar em tal processo como descrito por:

$$R(\uparrow) + R'(\downarrow) = R(\downarrow) + R'(\uparrow) \qquad \text{(II.2.11).}$$

Pode-se ver que, se R e R' são de alguma maneira diferentes (diferentes estados de spin nuclear ou transições nucleares ramificadas, por exemplo), o resultado do choque pode ser a mudança da freqüência de ressonância do spin eletrônico. Esta idéia física não muito sofisticada sugere que Heisenberg exchange deve ser encarada como um processo de transferência eletrônica, o que é corroborado por uma análise teórica mais cuidadosa (Freed, 1967). Sendo um processo de transferência eletrônica, após o choque, o elétron pode estar localizado em qualquer um dos possíveis estados de spin nuclear do radical com igual probabilidade. Assim, interação de radicais nitróxidos do tipo HE contribuem igualmente para o crescimento de picos cruzados "single" e "double quantum" (**Figura II.2.3b**). Portanto, o padrão de picos cruzados e como estes se desenvolvem em função de T_m por si só permitem uma distinção qualitativa entre os dois processos de relaxação acima mencionados.

Em espectros oriundos de membranas que estão Microscopicamente Ordenadas e Macroscopicamente Desordenadas (MOMD), como é o caso do presente projeto, 2D-ELDOR é usada, ainda, para distinguir alargamentos inomogêneos oriundos de interações superhiperfinas do marcador com prótons do solvente (que alarga igualmente as linhas hiperfinas do espectro do marcador de spin) daqueles provenientes do próprio efeito MOMD e que se reflete em quão ordenado se encontra o radical na membrana.

Existe, portanto, um jogo entre os processos de relaxação descritos que afetam a formação de picos cruzados e entre os alargamentos inomogêneos que afetam a largura e a forma de linha de picos diagonais e cruzados no espectro bidimensional. Com isso, a maneira mais efetiva para análise de tais espectros é obtida através de simulações para obtenção de parâmetros de ordem e taxas de difusão translacional e rotacional do marcador de spin. O procedimento para simulações utilizando o pacote de programas desenvolvido por Freed e colaboradores (Freed, 1977; Gamliel & Freed, 1990; Lee *et al.*, 1994; Budil *et al.*, 1996) ao longo dos últimos 15 anos encontra-se descrito nas próximas seções.

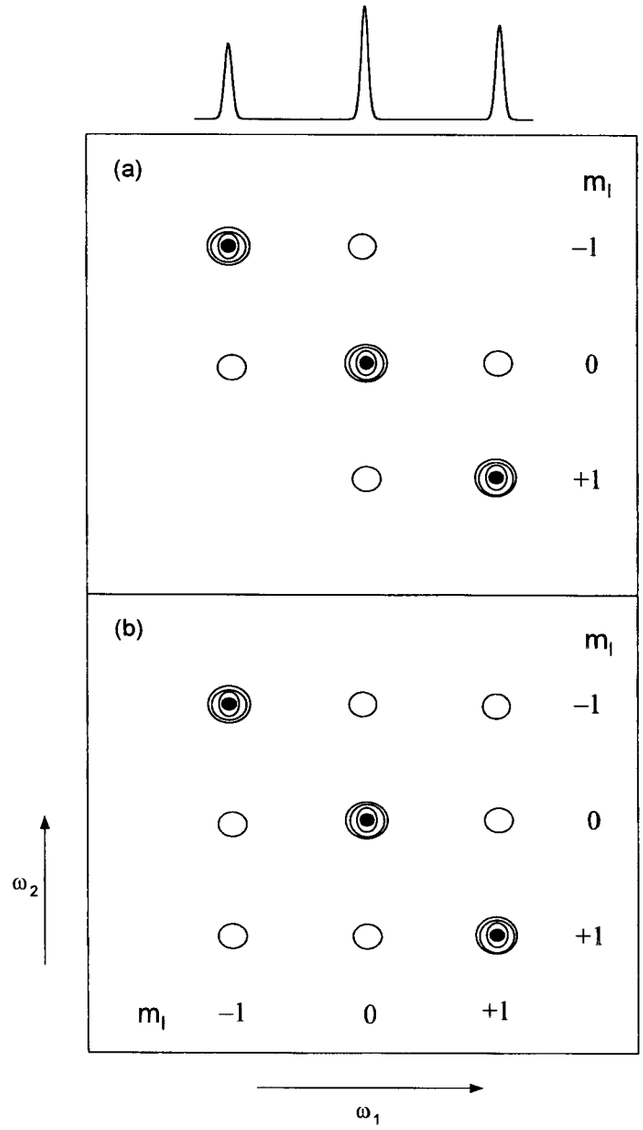


Figura II.2.3: Influência dos mecanismos de relaxação na formação de picos cruzados em espectros de 2D-ELDOR de radicais nitróxidos em geral: (a) END – picos cruzados de "single quantum"; (b) HE – picos cruzados de "single" e "double quantum" aparecem. Os números +1,0,-1 referem-se aos estados de spin nuclear. Estes são gráficos de contorno do espectro tridimensional. (adaptada de Atherton, 1993)

II.2.4 Medidas de 2D-FT-EPR

Todos os experimentos de RPE pulsado foram realizados no espectrômetro de RPE pulsado descrito por Crepeau *et al* (1994) e Borbat *et al.* (1997). Para os experimentos de ELDOR, três pulsos de $\pi/2$ (2 kW de potência do amplificador TWT e largura de ~5 ns) são usados de acordo com a **Figura II.2.1a**. O espectrômetro está equipado com um ressoador do tipo "loop gap" de 3,25 mm I.D., Q_L=90 e que, em condições de trabalho, oferece uma cobertura uniforme de ±100 MHz, com tempos mortos de 30-40 ns (para as medidas de 16-PC em vesículas contendo GA, o tempo morto foi de 20-25 ns). A temperatura da amostra é regulada por um criostato com controlador de temperatura comercial (Bruker, model ER4111VT).

Na medida dos espectros de 2D-ELDOR, variou-se a separação entre os dois primeiros pulsos, i.e. t_1, em passos de 3 ns para 128 valores a partir de um valor inicial de 40-50 ns. Cada sinal é coletado como função de t_2 para um total de 256 pontos complexos em acréscimos de 1 ns. Esse passo efetivo é conseguido através do "interleave" de cinco coletadas separadas, cada uma com passo em t_2 de 5 ns. Uma seqüência de "phase cycling" constituída de 32 passos e adaptada daquela seqüência de 16 passos usada por Gamliel & Freed (1990) é empregada para a eliminação de sinais não desejados tais como picos imagem, sinais transversais e picos axiais. Os 16 passos adicionais servem para melhorar o cancelamento de artefatos instrumentais que não tenham sido completamente removidos pela seqüência original. Uma coleta completa de dados para cada valor de t_1 consiste de 500-1500 médias para cada um dos 32 passos da tabela de "phase cycling". Uma medida completa de 2D-ELDOR leva cerca de 30-60 minutos para uma taxa de repetição de 10-15 kHz. O sinal em

quadratura dupla é então coletado e depois combinado de forma a se ter as componentes S_{c-} e S_{c+} (Gamliel & Freed, 1990), que são posteriormente analisadas. Os experimentos são repetidos para uma série adequada de três ou quatro tempos de mistura (T_m), cujos valores estão, em geral, dentro do intervalo 50ns-2μs.

A preparação dos dados experimentais para as simulações consiste na aplicação da transformada de Fourier aos sinais complexos $S'(t_1,t_2)$ e $S''(t_1,t_2)$ em relação a t_1 e t_2 (exemplo de dados no domínio temporal é mostrado na **Figura II.2.4**) seguido pelo cálculo do espectro magnitude. Este é usado para evitar a necessidade de se fazer correções para variações na fase através do espectro bidimensional resultantes do fato de serem usados tempos mortos e campos de microondas finitos (Gorcester & Freed, 1988; Patyal *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 1993). Esse processo é feito para ambas as componentes S_{c-} e S_{c+}.

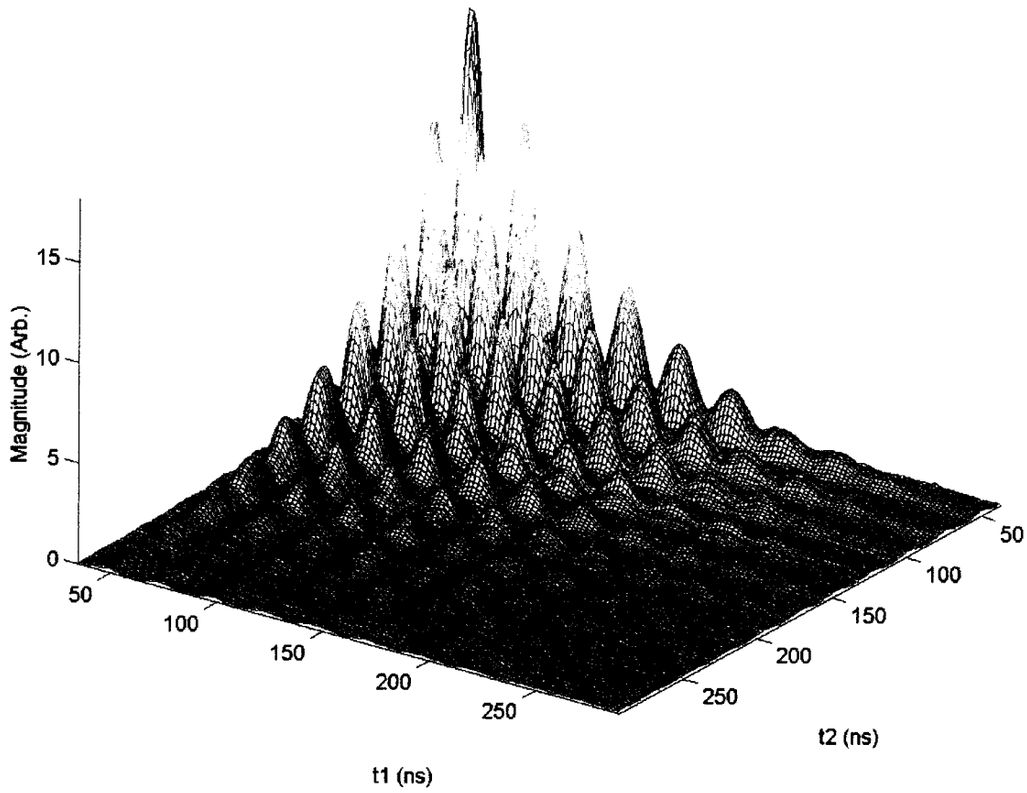


Figura II.2.4: Espectro magnitude de 2D-ELDOR no domínio temporal do marcador de spin 16-PC em membranas de DPPC a 50°C.

II.2.5 Simulações de Espectros de 2D-FT-EPR

Uma vez de posse dos espectros magnitude no domínio das frequências, estes são simulados para a obtenção de parâmetros de ordem e de taxas de difusão rotacional e translacional que caracterizem a dinâmica e a estrutura da membrana na qual o marcador de spin encontra-se inserido. Isso é possível através do pacote de programas NLSPMC desenvolvido ao longo dos últimos anos por Freed e

colaboradores (Freed, 1977; Gamliel & Freed, 1990; Lee *et al.*, 1994; Budil *et al.* 1996).

Esses programas baseiam-se na teoria estocástica de Liouville para cálculo de espectros de EPR no regime de movimentos lentos, que para radicais nitróxidos ocorre quando os tempos de correlação são da ordem de 10^{-7} até 10^{-9} s (Freed & Schneider, 1989). A partir desse limite não é mais possível se usar a teoria de Redfield, que é uma teoria de perturbação, para a determinação da forma da linha espectral.

A idéia principal para resolver o problema do cálculo de espectros de EPR no regime de movimento lentos reside em se assumir que as flutuações na orientação de uma molécula, definida por coordenadas Ω, podem ser tratadas classicamente usando-se um operador Γ_Ω (operador de Markov) que é independente do tempo. A equação de difusão para a probabilidade de $P(\Omega,t)$ de se achar a orientação Ω em um tempo t é:

$$\frac{dP(\Omega,t)}{dt} = -\Gamma_\Omega P(\Omega,t) \qquad \text{(II.2.12).}$$

Kubo mostrou que com essa hipótese, a equação de movimento do operador matriz densidade $\rho(\Omega,t)$ é dada por (Kubo, 1969):

$$\frac{d\rho(\Omega,t)}{dt} = -i[H(\Omega,t),\rho(\Omega,t)] - \Gamma_\Omega \rho(\Omega,t) \qquad \text{(II.2.13),}$$

onde $H(\Omega,t)$ é o hamiltoniano de spin, que depende da orientação da molécula e Γ_Ω é o operador de relaxação representando a difusão rotacional molecular que, no caso de membranas lipídicas, normalmente é definida em termos de um tensor de difusão rotacional com simetria axial ($R_\perp$ e $R_{//}$).

Na ausência de pulsos de microondas, é mais conveniente se escrever a eq. (II.2.13) como:

$$\frac{\partial}{\partial t}\chi(\Omega,t) = -[iH^{\times}(\Omega)+\Gamma(\Omega)]\chi(\Omega,t) \equiv -L(\Omega)\chi(\Omega,t) \qquad \text{(II.2.14)},$$

onde $\chi(\Omega,t) = \rho(\Omega,t) - \rho_0(\Omega)$ é o operador densidade reduzido, $H^{\times}(\Omega)$ é o superoperador comutador do hamiltoniano e $L(\Omega)$ é o oeprador estocástico de Liouville. A solução formal da eq. (II.2.14) pode ser escrita como:

$$\chi(\Omega,t+t_0) = \exp(-Lt)\chi(\Omega,t_0) \qquad \text{(II.2.15)}$$

e a evolução da matriz densidade na ausência de pulsos é completamente descrita pelos modos normais do operador estocástico de Liouville, que são obtidos pela sua diagonalização.

Na presença de pulsos, o hamiltoniano deve incluir o efeito dos pulsos assim como a relaxação dos spins. Se a interação com os pulsos é muito maior do que os demais termos no hamiltoniano, então todos os spins são uniformemente afetados pelo pulso independentemente de suas freqüências de ressonância (pulso duro e não-seletivo). A duração de um pulso desse tipo é curta, fazendo com que a relaxação durante o intervalo de tempo do mesmo possa ser desprezada. Então, a evolução dos elementos do operador matriz densidade neste caso pode ser expressa em termos do propagador de pulsos como:

$$\rho(t+t_0) = P(t_p)\rho(t_0)P^{-1}(t_p) \qquad \text{(II.2.16)}.$$

Assim, a evolução do operador matriz densidade depois de uma seqüência arbitrária de pulsos pode ser completamente determinada pela aplicação das eqs. (II.2.15) e (II.2.16) para o operador estocástico de Liouville e do propagador de pulsos, respectivamente. De posse dos elementos do operador matriz densidade é

possível calcular o espectro de EPR através da magnetização observável média M=Tr{ρS_x}. A teoria detalhada de simulações de espectros de 2D-FT-EPR é descrita por Lee *et al.* (1994).

Parâmetros Usados nas Simulações de Espectros de 2D-FT-EPR

Visando um entendimento dos parâmetros obtidos através de tais simulações, apresenta-se, agora, uma descrição semiqualitativa dos princípios básicos envolvidos nas simulações espectrais através do pacote de programas supra-citado e que serão úteis quando da interpretação dos resultados obtidos.

Primeiramente, faz-se necessária a descrição dos diversos sistemas de referência relevantes para as simulações em questão. Há quatro sistemas de coordenadas: o sistema de difusão molecular (x',y',z'), o sistema do diretor local (x'',y'',z''), o sistema magnético (x''',y''',z''') e o sistema de laboratório (x,y,z).

Os sistemas de refência mais triviais de serem definidos e visualizados são o sistema magnético (x''',y''',z''') e o de laboratório, sendo este último, como é usual, definido pela direção z do campo magnético estático. Em relação ao sistema magnético são definidos os tensores $\boldsymbol{g}$ e $\boldsymbol{A}$. Os eixos x''' e z''' são definidos paralelos às direções da ligação N-O e do orbital $2p_z$ do átomo de nitrogênio, respectivamente. O eixo y''' é definido de maneira a formar um sistema dextrógiro ortogonal com os outros dois eixos.

O sistema do diretor local (x'',y'',z'') é definido pela normal à superfície da membrana em cada ponto da mesma (vetor diretor local). A normal é, então, chamada de eixo z'', com (x'' e y'' arbitrariamente escolhidos). O diretor local é usado para definir os ângulos ψ referentes ao efeito MOMD descrito abaixo.

Para a definição do sistema molecular (x',y',z'), deve-se notar que a mobilidade rotacional de um marcador de spin é caracterizada por duas taxas de difusão rotacional, $R_{\perp}$ e $R_{//}$, que representam os valores principais de um tensor de difusão com simetria axial. Na verdade, $R_{\perp}$ e $R_{//}$ representam uma aproximação para os modos internos de rotação da cadeia e para o movimento geral da mesma (Ferrarini *et al.*, 1989). O sistema de difusão molecular (x',y',z') é, portanto, aquele no qual essas duas taxas são definidas. Mais especificamente, o eixo z' é feito paralelo ao eixo principal de simetria do segmento da molécula onde encontra-se ligado o radical nitróxido. Portanto, $R_{//}$ e $R_{\perp}$ são as taxas de difusão rotacional em torno do eixo z' e de um eixo perpendicular a ele, respectivamente. Em marcadores do tipo n-PC (n é a posição do radical NO ao longo da cadeia lipídica, por exemplo 5, 10 ou 16), z' é paralelo ao diretor local z'' (i.e., à própria cadeia lipídica) e $R_{\perp}$ representa o movimento oscilatório da respectiva porção da cadeia lipídica.

É em relação ao sistema de difusão molecular que são definidos, ainda, os parâmetros de ordem do sistema. Estes parâmetros representam o potencial orientador presente em membranas biológicas e que restringe a amplitude do movimento rotacional das cadeias lipídicas. Isto é, quanto maior o potencial orientador, menor será o intervalo de orientações disponível para o movimento rotacional das cadeias. Mais precisamente, o potencial $U(\Omega)$ dá origem a uma distribuição de moléculas ao longo de várias orientações em torno do eixo de ordenamento local da membrana (diretor local). No caso de vesículas, existe, ainda, uma distribuição desse diretor local representando cada um dos segmentos da membrana na vesícula.

O parâmetro de ordem mais comumente usado S_0 é definido como:

$$S_0 = \langle D_{00}^2 \rangle = \left\langle \frac{1}{2}(3\cos^2\theta - 1) \right\rangle = \frac{\int d\Omega \exp(-U/kT) D_{00}^2}{\int d\Omega \exp(-U/kT)} \qquad \text{(II.2.17)},$$

onde k é a constante de Boltzmannn, T é a temperatura. Esse parâmetro representa quanto o eixo molecular z' está alinhado com o vetor diretor local z''. Um segundo parâmetro de ordem pode ser também definido

$$S_2 = \langle D_{02}^2 + D_{0-2}^2 \rangle = \left\langle \sqrt{\frac{3}{2}} \sin^2\theta \cos 2\phi \right\rangle \qquad \text{(II.2.18)}$$

e representa o desvio da simetria cilíndrica do alinhamento molecular relativo à superfície da membrana, ou seja, mede até que ponto há uma preferência de alinhamento dos eixos moleculares x' vs. y' com relação ao diretor local. O potencial $U(\Omega)$ é usualmente representado como uma expansão em harmônicos esféricos generalizados,

$$\begin{aligned} -U/kT &= c_0^2 D_{00}^2(\Omega) + c_2^2 (D_{02}^2(\Omega) + D_{0-2}^2(\Omega)) + \ldots \\ &= \frac{c_0^2}{2}(3\cos^2 - 1) + \sqrt{\frac{3}{2}} c_2^2 \sin^2\theta \cos 2\phi \end{aligned} \qquad \text{(II.2.19)}$$

onde $\Omega=(\theta,\phi)$ são os ângulos polar e azimutal do eixo de difusão z' em relação ao sistema diretor local. Os coeficientes c_0^2 e c_2^2 são parâmetros adimensionais representando a energia potencial de cada orientação.

Em espectros de vesículas lipídicas, o efeito de "Microscopic Order and Macroscopic Disorder" (MOMD) tem que ser levado em consideração durante as simulações. Isto quer dizer que diferentes segmentos da membrana lipídica estão aleatoriamente orientados em relação ao eixo z do laboratório (direção de aplicação do campo magnético estático). O espectro de 2D-ELDOR-MOMD pode ser visto, então, como o espectro de uma amostra policristalina, sendo, portanto, representado

por uma superposição de espectros oriundos de todos os fragmentos e que pode ser escrito como:

$$S_{c\pm}^{MOMD} = \int S_{c\pm}(\psi)\,\mathrm{sen}\psi\, d\psi \qquad \text{(II.2.20)},$$

onde $S_{c\pm}(\psi)$ é o espectro de um fragmento da membrana cujo vetor diretor faz um ângulo ψ com o eixo z do laboratório. Nas simulações aqui apresentadas, o espectro teórico final foi sempre obtido pela média sobre quinze diferentes valores de ψ.

Nas **Figuras II.2.5** e **II.2.6** faz-se um resumo esquematizado do que foi dito acima em relação aos sistemas de eixos e estrutura geral das membranas. Na primeira são apresentados os sistemas magnéticos (x''',y''',z''') e moleculares (x',y',z') para os marcadores de spin 16-PC, DPPTC e CSL. Daí conclue-se que é possível dizer que 16-PC tem uma z-ordem ($z'''//z'$), DPPTC é de x-ordem ($x'''//z'$) e CSL é, praticamente, de y-ordem ($y'''//z'$). Portanto, os valores dos parâmetros de ordem S_0 e S_2 dão uma medida de quanto os respectivos eixos z''' (16-PC), x''' (DPPTC) e y''' (CSL) alinham-se com o diretor local z''. Na **Figura II.2.6** visualiza-se a definição do ângulo de "tilt" ψ do vetor diretor em relação à direção do campo magnético estático (eixo z) e que leva ao chamado efeito MOMD. Além disso, em cada segmento de membrana multilamelar, tem-se o vetor diretor disposto como mostrado no zoom à direita na **Figura II.2.6**.

As simulações também incluem um parâmetro relacionado à mobilidade translacional do marcador caracterizada pela freqüência de Heisenberg "exchange", ω_{exc}, que mede a taxa de colisão entre duas moléculas contendo o marcador de spin, assim como incluem efeitos de tempo morto nas dimensões t_1 e t_2, que são fixados nos valores medidos experimentalmente.

O primeiro passo para a realização de uma simulação utilizando o pacote de programas NLSPMC consiste na escolha de valores de partida razoáveis para as grandezas $R_{\perp}$, $R_{//}$, c_0^2, c_2^2, ω_{HE} e Δ_G (alargamento inomogêneo Gaussiano), onde o último é um parâmetro de largura de linha adicional e que, essencialmente, representa a contribuição devido às interações superhiperfinas com prótons do solvente. Assim como observado por Patyal *et al.* (1997), a utilização de um ângulo β de "tilt" entre o sistema de eixos magnético e o sistema de difusão melhorou bastante o espectro teórico em várias situações.

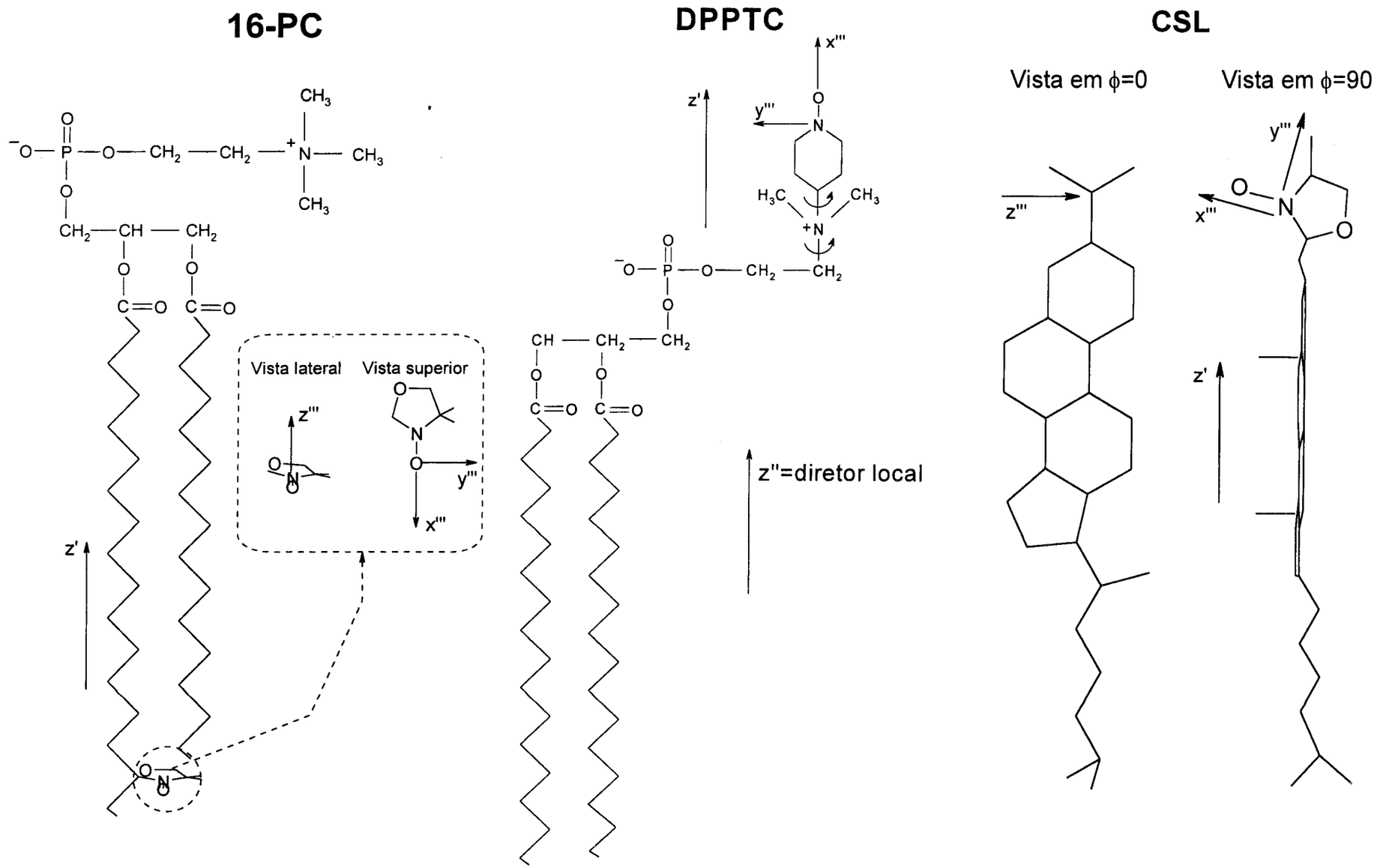


Figura II.2.5: Sistemas de eixos usados nas simulações de espectros de 2D-FT-EPRpara os marcadores de spin 16-PC, DPPTC e CSL. Os vetores z' em cada caso representam o eixo principal de alinhamento na membrana para o qual o movimento do nitróxido é sensível.

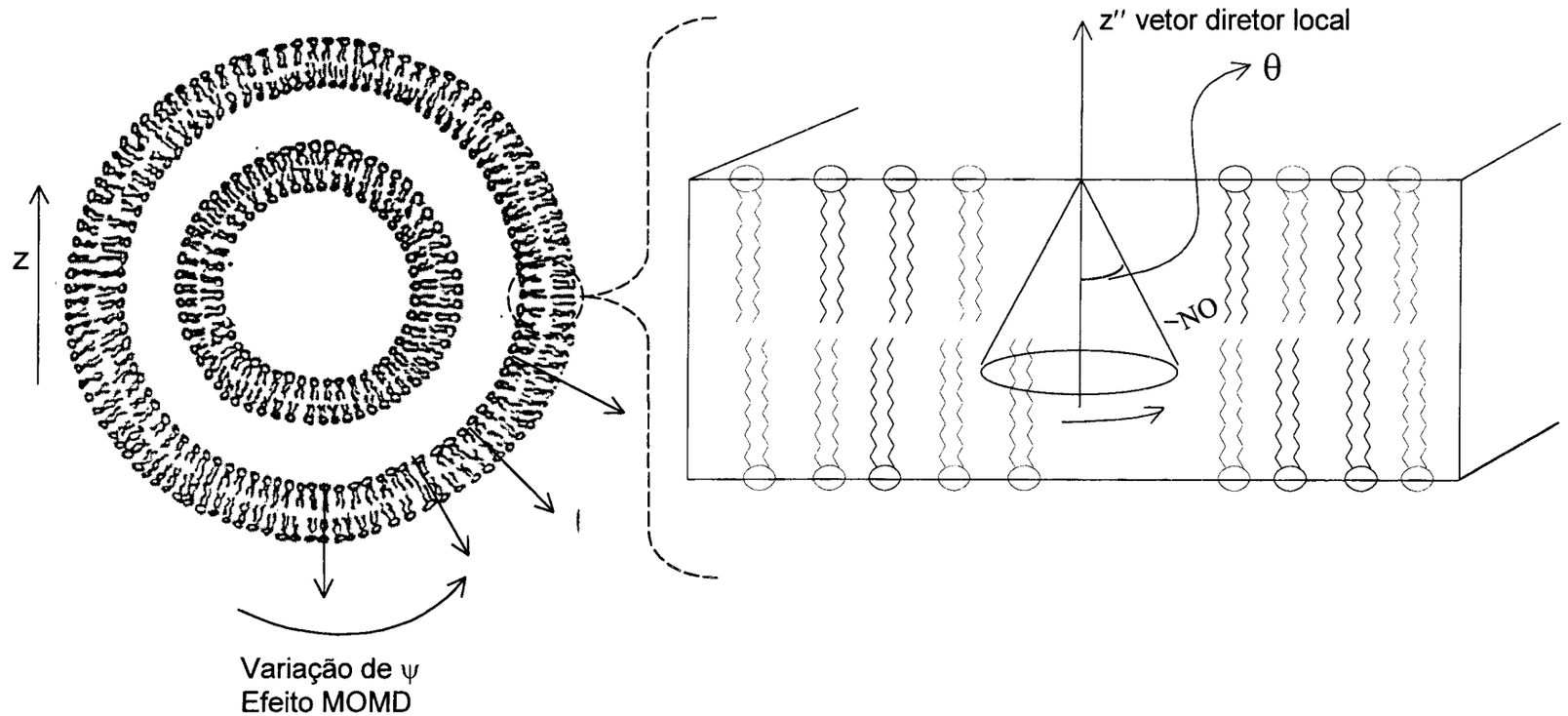


Figura II.2.6: Estrutura geral das dispersões usadas nas medidas de 2D-ELDOR, onde é mostrado o ângulo ψ usado na definição do efeito MOMD (z define a direção do campo magnético externo). O esquema à direita mostra uma ampliação de uma seção de bicamada com a definição do ângulo θ usado na definição dos parâmetros de ordem. Também é vista a orientação do vetor diretor local *z''* para algumas segmentos da membrana (setas acompanhando a variação de ψ). (adaptada de Riske *et al.*, 1997 e Campbell & Dwek, 1984)

Capítulo II.3

Resultados e Discussão

Os resultados referentes aos experimentos de 2D-FT-EPR são agora apresentados e discutidos. Primeiramente é discutida a estrutura de membranas lipídicas com diferentes composições e a diferentes temperaturas do ponto de vista de EPR pulsado (seção II.3.1). Em seguida, aplicam-se as conclusões daí obtidas para a análise de membranas biológicas (membranas bleb) (seção II.3.2). Por fim, muda-se um pouco o enfoque dos resultados, passando-se para o estudo de interações lipídios-peptídeos na tentativa de enteder os efeitos da presença de peptídeos sobre os lipídios da membrana (seção II.3.3).

II.3.1 Estrutura Dinâmica de Membranas Modelo

O estudo de membranas modelo realizado será dividido da seguinte maneira: na seção II.3.1.1 são comparados os estados de líquido cristalino e líquido ordenado em membranas de lipídio puro e lipídio/Chol com vários marcadores de spin e para uma temperatura fixa de 50°C. Depois, procura-se caracterizar o comportamento de membranas contendo colesterol em concentrações variadas e para diferentes temperaturas, mas agora somente com o marcador de spin 16-PC (seção II.3.1.2). Este resultados fazem parte de um

projeto maior que busca a construção de um diagrama de fase completo para membranas ternárias constituídas de dois tipos de lipídios e colesterol.

II.3.1.1 Estado de Líquido Cristalino (Lc) vs Líquido Ordenado (Lo)

Na caracterização dessas duas fases em que podem estar os lipídios de uma membrana foram usadas dispersões de DPPC puro, esfingomielina (SM) pura e de misturas DPPC/Chol e SM/Chol, ambas 1/1 (50 mol% de colesterol) com os marcadores de spin 16-PC, DPPTC e CSL, sendo os dois últimos usados apenas nas dispersões envolvendo DPPC (v. Capítulo II.2) e à temperatura de 50°C. Nessa temperatura, os lipídios das vesículas contendo DPPC puro e SM pura estão no estado de líquido cristalino, ao passo que nas misturas de DPPC/Chol e SM/Chol (1/1) se encontram no estado de líquido ordenado, como se depreende da literatura (Ipsen *et al.*, 1987).

Descrição Qualitativa dos Espectros de 2D-ELDOR

Picos cruzados em espectros de 2D-ELDOR resultam da transferência de magnetização por vários mecanismos de relaxação de spin durante o tempo de mistura T_m (v. seção II.2.3). O crescimento desses picos como função de T_m fornece informações a respeito de tais processos de relaxação que, como dito anteriormente, envolvem, principalmente, interações dipolares elétron-núcleo (END) e interações de troca de Heisenberg (HE). A primeira induz "flips" do spin nuclear (transições nucleares de NMR) e a segunda é causada por colisões bimoleculares entre marcadores de spin. Cada tipo de mecanismo é caracterizado por um padrão de picos cruzados (**Figura II.2.3**), no qual interações END induzem a formação, principalmente, de picos "single quantum" (primeira ordem), enquanto colisões entre marcadores contribuem igualmente para picos cruzados de primeira e segunda ordem ("single" e "double quantum"). Além da diferença nos

mecanismos de relaxação, também é esperado que estruturas dinâmicas diversas, como lipídios em fase Lo e Lc, apresentem diferenças nos mecanismos que contribuem para o alargamento das linhas de ESR. Assim, o padrão de desenvolvimento de picos cruzados e as formas de linha de espectros de EPRpodem ser usadas para caracterizar e estabelcer distinções entre estruturas dinâmicas.

Os espectros de 2D-ELDOR S_{c-} dos marcadores de spin 16-PC e CSL em dispersões lipídicas de DPPC, SM e DPPC/Chol (1/1), SM/Chol (1/1) coletados em banda Ku (17.3 GHz), com T_m=500 ns e temperatura de 50°C estão mostrados nas **Figuras II.3.1** (gráficos de contorno) e **II.3.2** (espectros tridimensionais). Como as diferenças entre espectros oriundos de amostras com e sem colesterol tornam-se mais significativas à medida que T_m fica mais longo, apenas os espectros correspondentes ao maior valor de T_m são apresentados naquelas figuras. Uma rápida observação de tais figuras leva à conclusão de como espectros de fases de Lo e Lc dão origem a espectros de 2D-ELDOR qualitativamente diferentes, assim permitindo caracterizações simples da fase lipídica através do reconhecimento de padrões para a evolução de picos cruzados e alargamentos inomogêneos (**Figura II.3.1**). As linhas estreitas observadas nos espectros do marcador 16-PC se devem a um processo de média da anisotropia dos parâmetros de EPRoriunda do substancial movimento do marcador localizado no final das cadeias acílicas dos lipídios, ao passo que para CSL se observa linhas largas devidas ao movimento lento da estrutura rígida do esterol, bem como maior ordem microscópica da molécula de CSL.

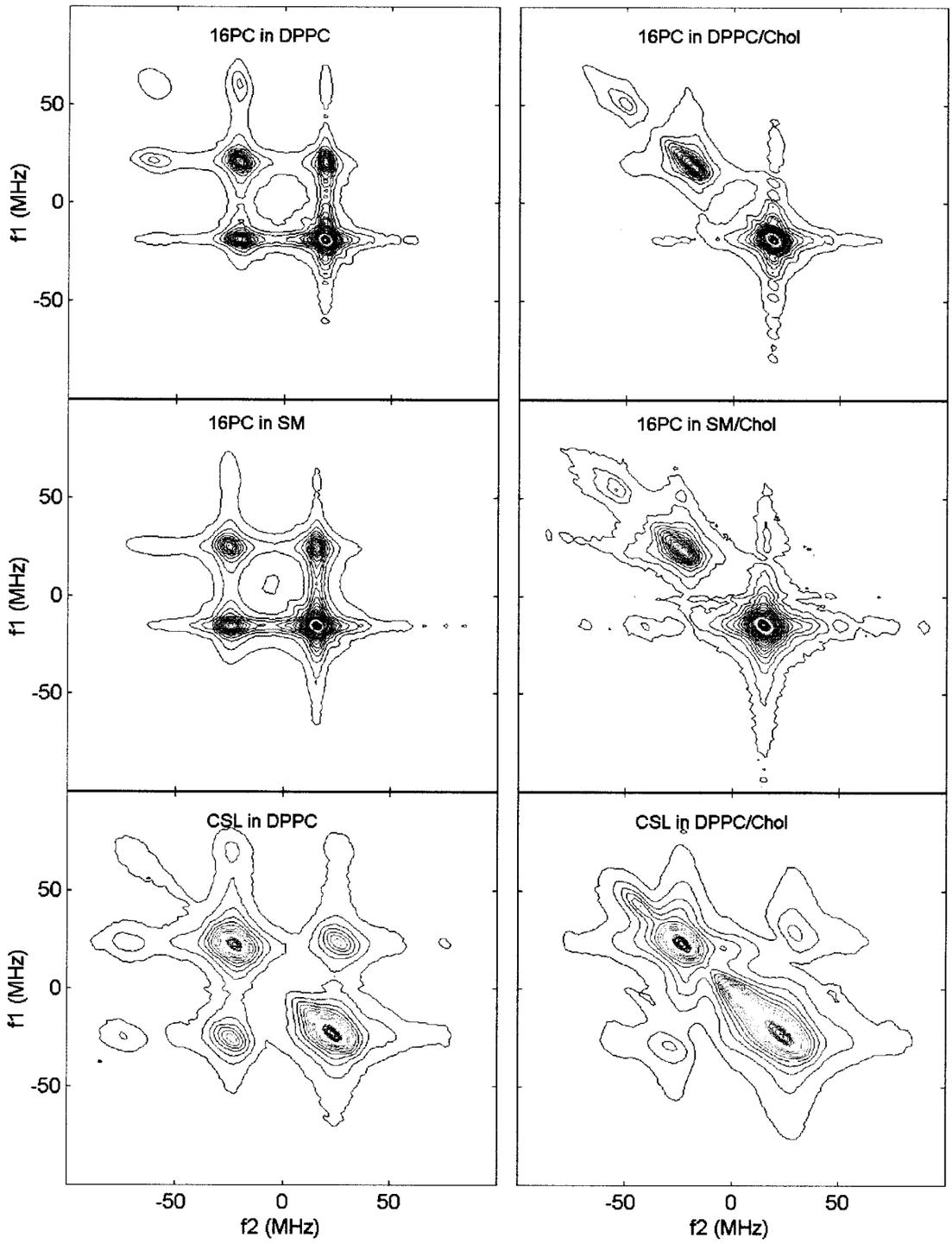


Figura II.3.1: Curvas de contorno dos espectros de 2D-ELDOR do marcador de spin 16-PC em amostras de DPPC, DPPC/Chol (1/1), SM, SM/Chol (1/1), e do marcador CSL em DPPC e DPPC/Chol (1/1) evidenciando o crescimento de picos cruzados em amostras de lipídios puros (fase Lc). Dados coletados em 17,3 GHz, T_m=500 ns e T=50°C.

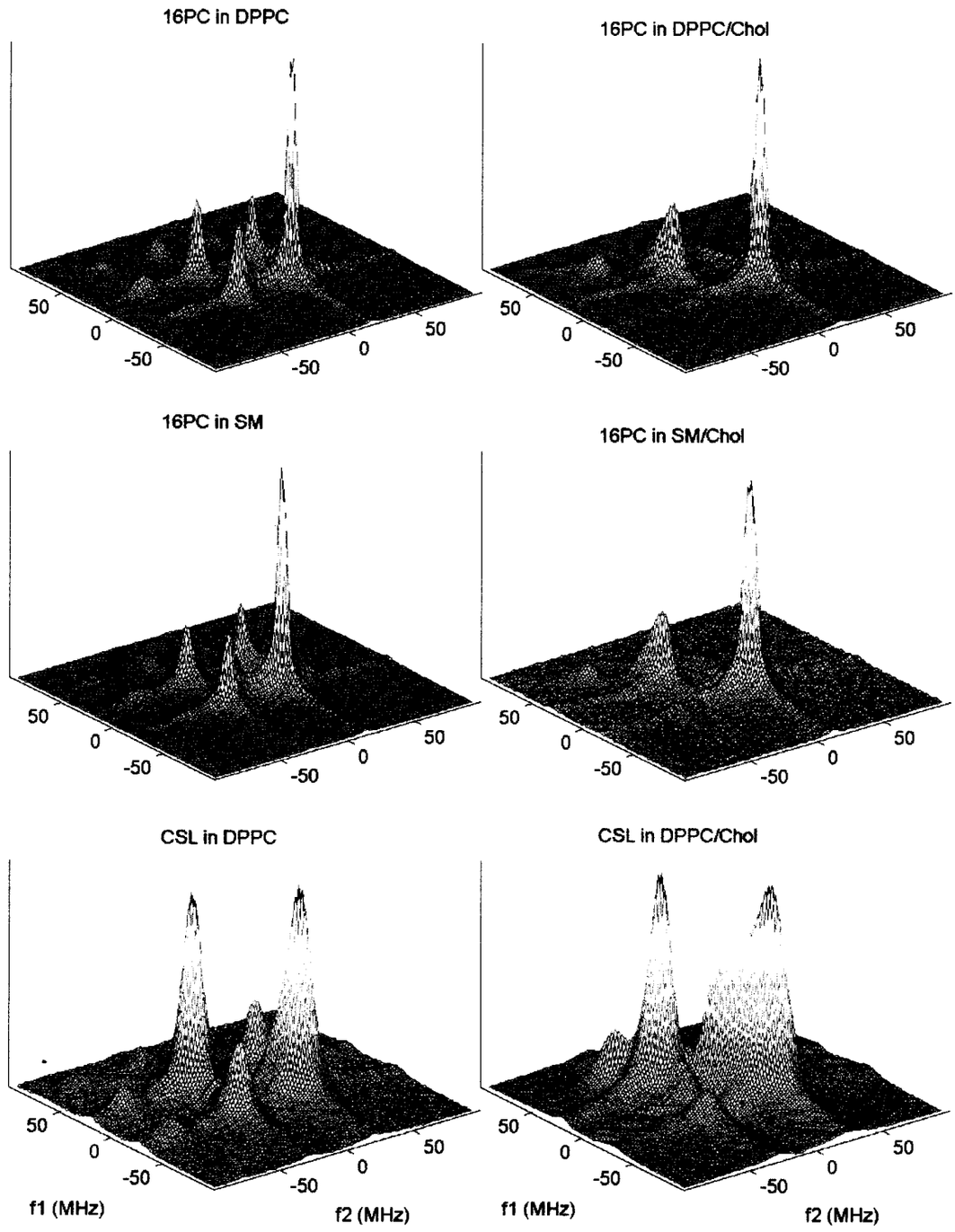


Figura II.3.2.: Espectros de 2D-ELDOR do marcador de spin 16-PC em amostras de DPPC, DPPC/Chol (1/1), SM, SM/Chol (1/1), e do marcador CSL em DPPC e DPPC/Chol (1/1) evidenciando o crescimento de picos cruzados em amostras de lipídios puros (fase Lc). Dados coletados em 17,3 GHz, T_m=500 ns e T=50°C.

Das **Figuras II.3.1** e **II.3.2** pode-se concluir através de uma análise apenas qualitativa que lipídios em fase Lo (coluna da esquerda naquelas figuras) exibem ordem maior do que aqueles em fase Lc (coluna da direita) e este ordenamento microscópico maior na fase Lo leva a um maior alargamento inomogêneo do espectro (linhas mais largas na presença de colesterol). Além disso, como o movimento é mais restrito na fase Lo, o desenvolvimento de picos cruzados em função de T_m é mais lento do que na fase Lc (lipídios puros). Essas conclusões são confirmadas pelas simulações apresentadas a seguir.

Amostras de DPPC e DPPC/Chol (1/1) com o marcador de spin localizado na cabeça polar do fosfolipídio (DPPTC) não apresentaram o mesmo tipo de comportamento descrito acima para os marcadores localizados na região das cadeias lipídicas.

Descrição Quantitativa dos Espectro de 2D-ELDOR: Simulações

Para tonar a análise acima mais detalhada fez-se necessário proceder com as simulacões dos espectros dos vários marcadores de spin (16-PC, CSL e DPPTC) nas amostras de lipídio puro (DPPC e SM) e nas misturas de lipídio/colesterol (DPPC/Chol e SM/Chol). Essas simulações foram realizadas segundo descrito na seção II.2.5. Aqui vale relembrar que os dados experimentais englobam, para cada marcador de spin, uma série de tempos de mistura T_m, que são simulados simultaneamente para uma dada temperatura e amostra. Também, neste ponto, há somente dados referentes a uma temperatura para todas as amostras (T=50°C), que está acima da temperatura de transição de fase dos lipídios DPPC e SM.

Os resultados finais das simulações através do pacote NLSPMC fornece os espectros teóricos apresentados nas **Figuras II.3.3-II.3.10** para as amostras DPPC/16-PC, DPPC/Chol/16-PC, SM/16-PC, SM/Chol/16-PC, DPPC/CSL, DPPC/Chol/CSL, DPPC/DPPTC, DPPC/Chol/DPPTC, respectivamente. Nessas figuras os espectros

experimentais estão colocados na coluna direita com as respectivas simulações à esquerda para os vários tempos de mistura T_m medidos. A **Tabela II.3.1** contém os valores dos parâmetros de interesse obtidos ao final das simulações referentes às amostras acima.

Tabela II.3.1: Parâmetros obtidos para os marcadores 16-PC, CSL e DPPTC em amostras de DPPC puro e DPPC/cholesterol (1/1) a 50 °C.

Sample	$R_\perp$ ($\times 10^8 s^{-1}$)	$R_{//}$ ($\times 10^9 s^{-1}$)	S_0	S_2	Δ_g (Gauss)	ω_{exc} ($\times 10^6 s^{-1}$)
DPPC/16PC[£]	2,48	7,50	0,16	-0,28	0,4	2,61
DPPC/Chol/16PC[£]	4,41	9,01	0,41	-0,30	0,6	–*
SM/16PC[£]	2,10	1,65	0,16	-0,17	0,4	1,81
SM/Chol/16PC[£]	6,80	3,14	0,43	-0,23	0,6	-*
DPPC/CSL[#]	0,36	0,80	0,75	0,03	1,2	4,49
DPPC/Chol/CSL[#]	0,14	0,21	0,90	0,01	1,5	0,19
DPPC/DPPTC[§]	0,11	0,49	0,75	-*	0,6	4,78
DPPC/Chol/DPPTC[§]	0,76	4,71	0,53	-0,19	0,6	–*

[£] Parâmetros magnéticos para 16-PC: A_{xx}=5,0 G; A_{yy}=5,0 G; A_{zz}=33,0 G; g_{xx}=2,0089; g_{yy}=2,0058; g_{zz}=2,0021 (Ge *et al.*, 1999); diffusion tilt: φ=31° (Patyal *et al.*, 1997).

[#] Parâmetros magnéticos para CSL: A_{xx}=4,9; A_{yy}=5,5; A_{zz}=33,1; g_{xx}=2,0087; g_{yy}=2,0057; g_{zz}=2,0021 (Barnes & Freed, 1998).

[§] Parâmetros magnéticos para DPPTC: A_{xx}=5,6; A_{yy}=5,6; A_{zz}=34,6; g_{xx}=2,0082; g_{yy}=2,0053; g_{zz}=2,0015 (Ge & Freed, 1998).

Estimated errors: $R_\perp$ (5%), $R_{//}$ (10%), S_0 (1%), S_2 (1%), Δ_g (1%), ω_{exc} (10%).

* valores muito pequenos (pelo menos 1000 vezes menor do que no caso das amostras sem colesterol), então mantidos fixos em 0.

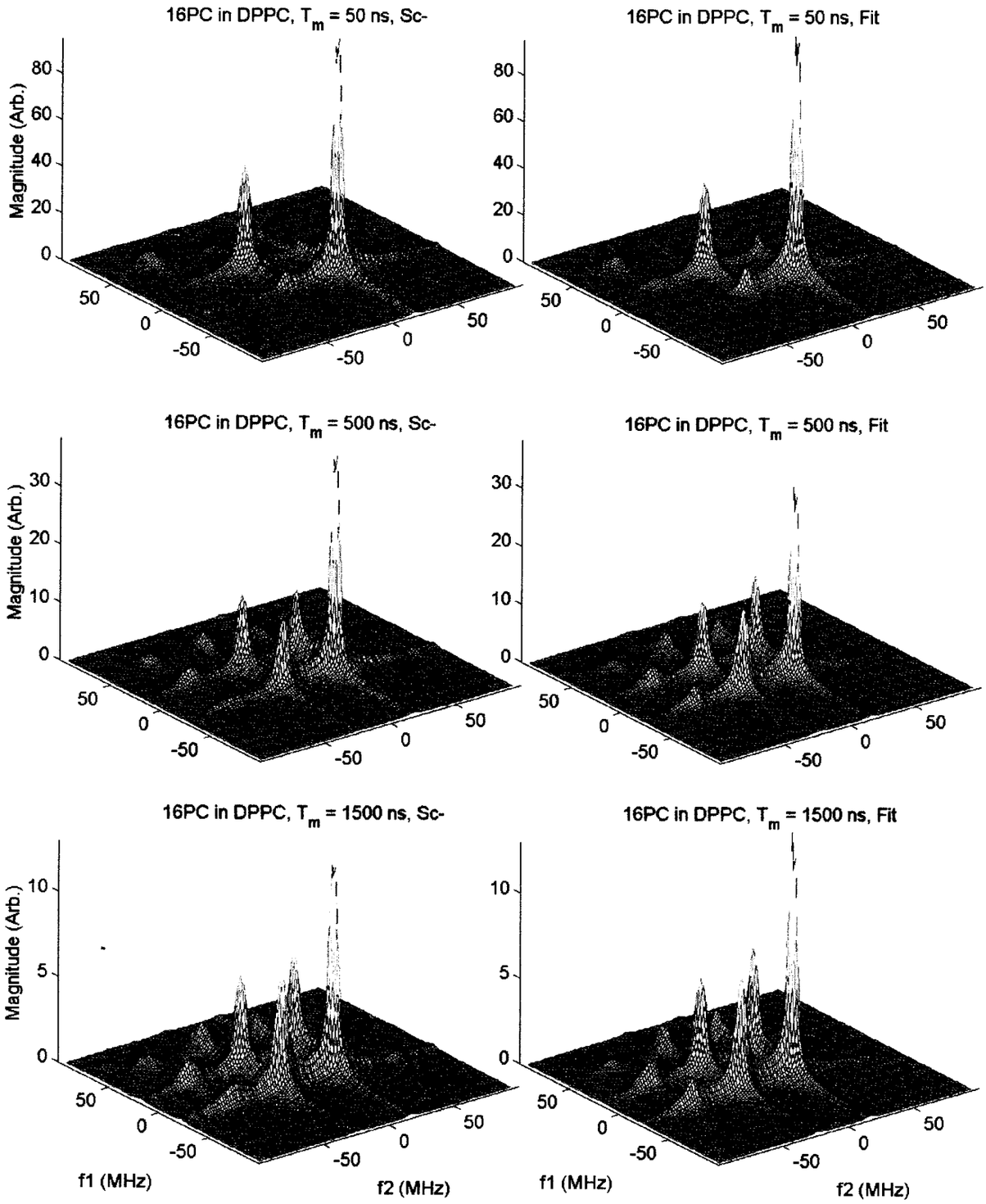


Figura II.3.3: Espectros experimentais (2D-ELDOR S_{c-}) e respectivas simulações do marcador de spin 16-PC em dispersões de DPPC puro a T=50°C , 17,3 GHz e para uma série de tempos de mistura T_m.

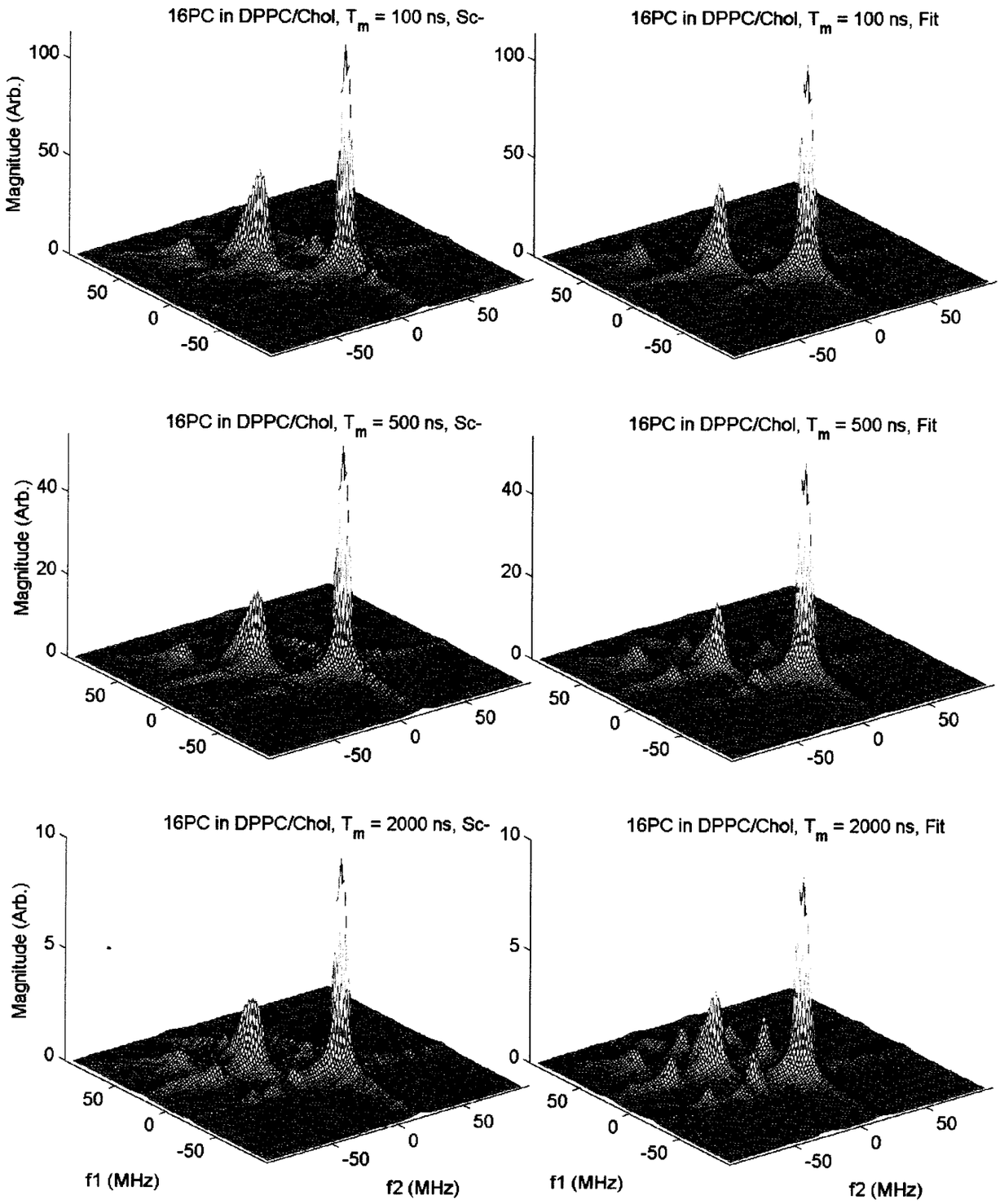


Figura II.3.4: Espectros experimentais (2D-ELDOR S_{c-}) e respectivas simulações do marcador de spin 16-PC em dispersões de DPPC/Chol (1/1) a T=50°C , 17,3 GHz e para uma série de tempos de mistura T_m.

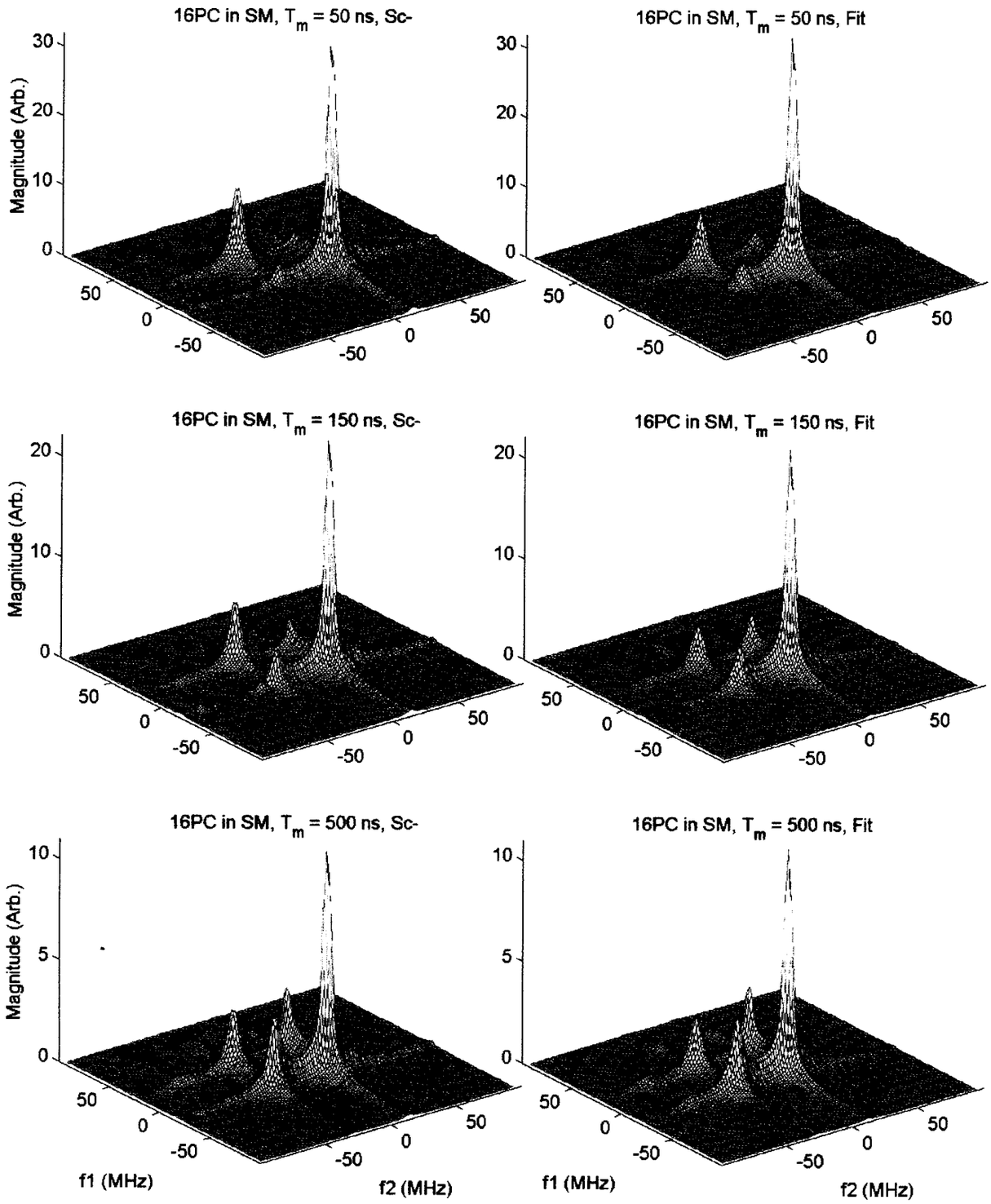


Figura II.3.5: Espectros experimentais (2D-ELDOR S_{c-}) e respectivas simulações do marcador de spin 16-PC em dispersões de SM pura a T=50°C , 17,3 GHz e para uma série de tempos de mistura T_m.

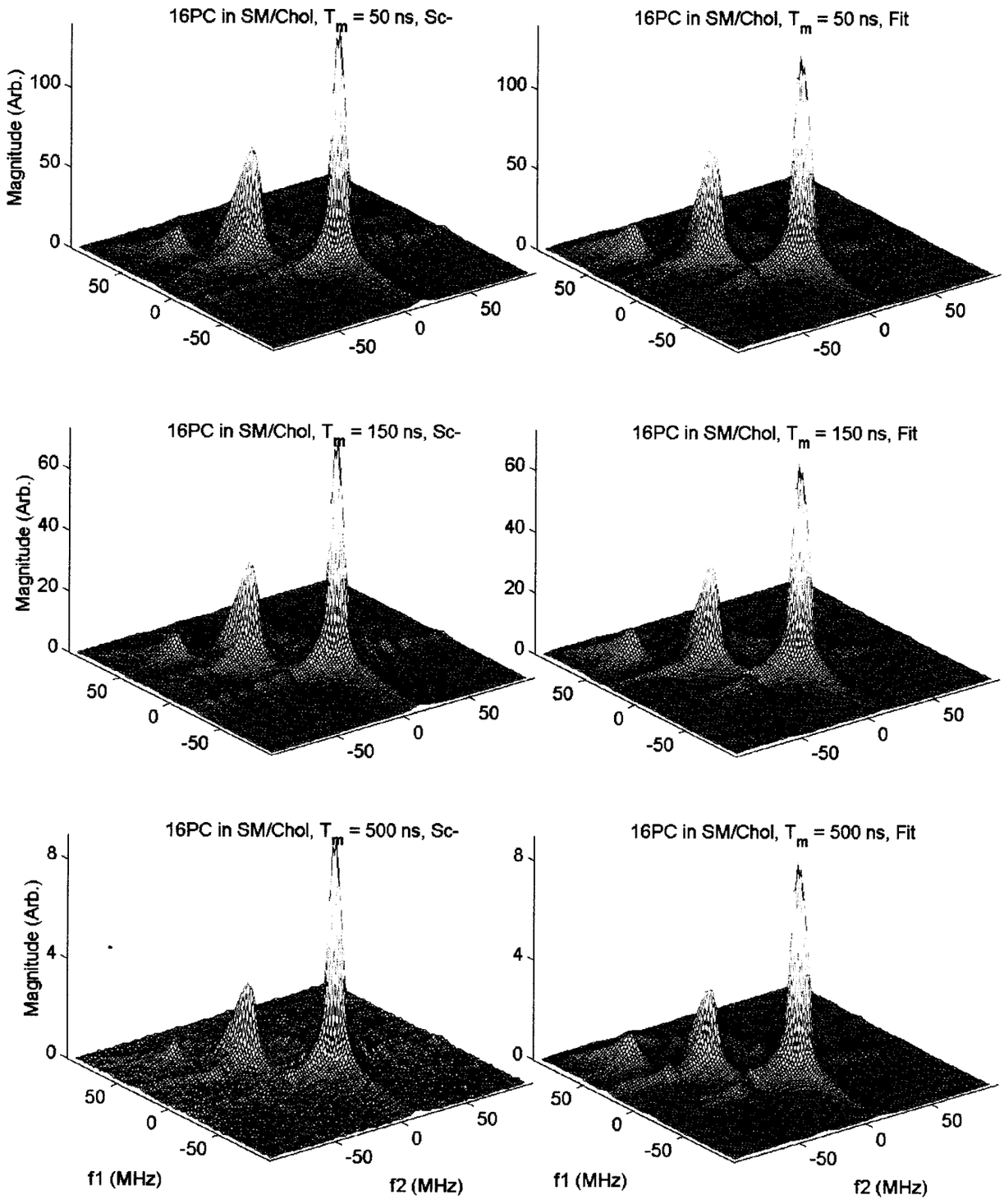


Figura II.3.6: Espectros experimentais (2D-ELDOR S_{c-}) e respectivas simulações do marcador de spin 16-PC em dispersões de SM/Chol (1/1) a T=50°C , 17,3 GHz e para uma série de tempos de mistura T_m.

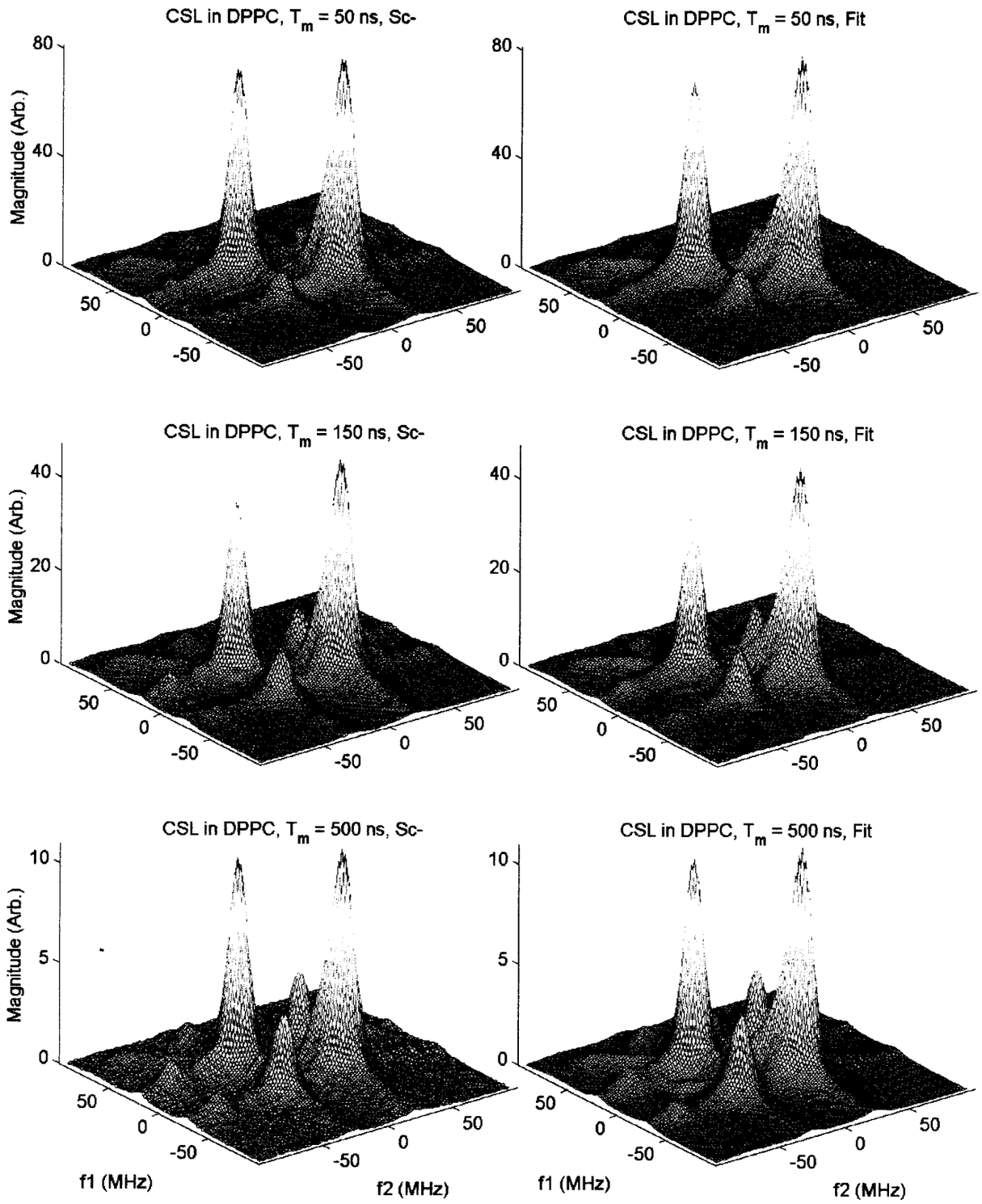


Figura II.3.7: Espectros experimentais (2D-ELDOR S_{c-}) e respectivas simulações do marcador de spin CSL em dispersões de DPPC puro a T=50°C , 17,3 GHz e para uma série de tempos de mistura T_m.

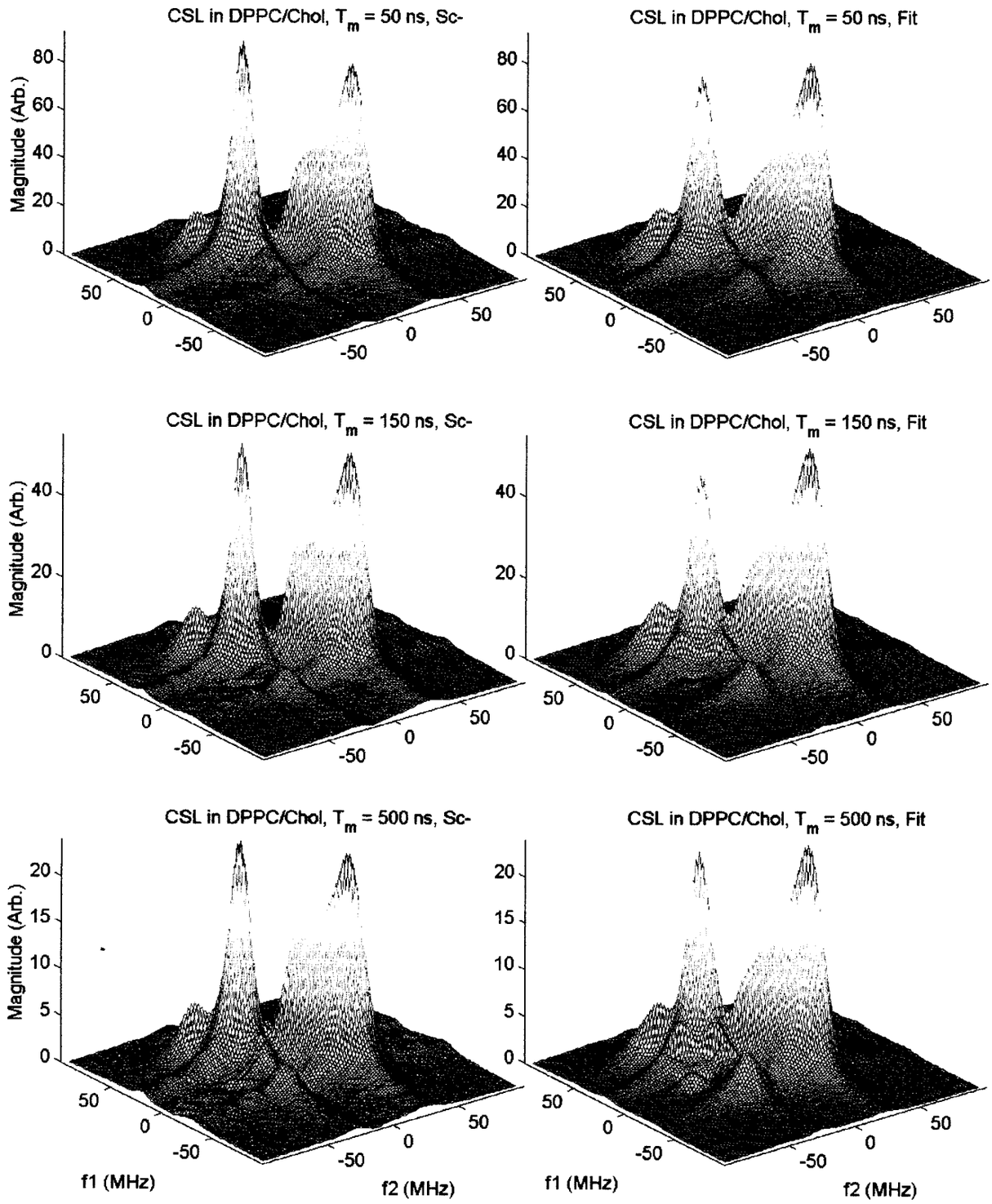


Figura II.3.8: Espectros experimentais (2D-ELDOR S_{c-}) e respectivas simulações do marcador de spin CSL em dispersões de DPPC/Chol (1/1) a T=50°C , 17,3 GHz e para uma série de tempos de mistura T_m.

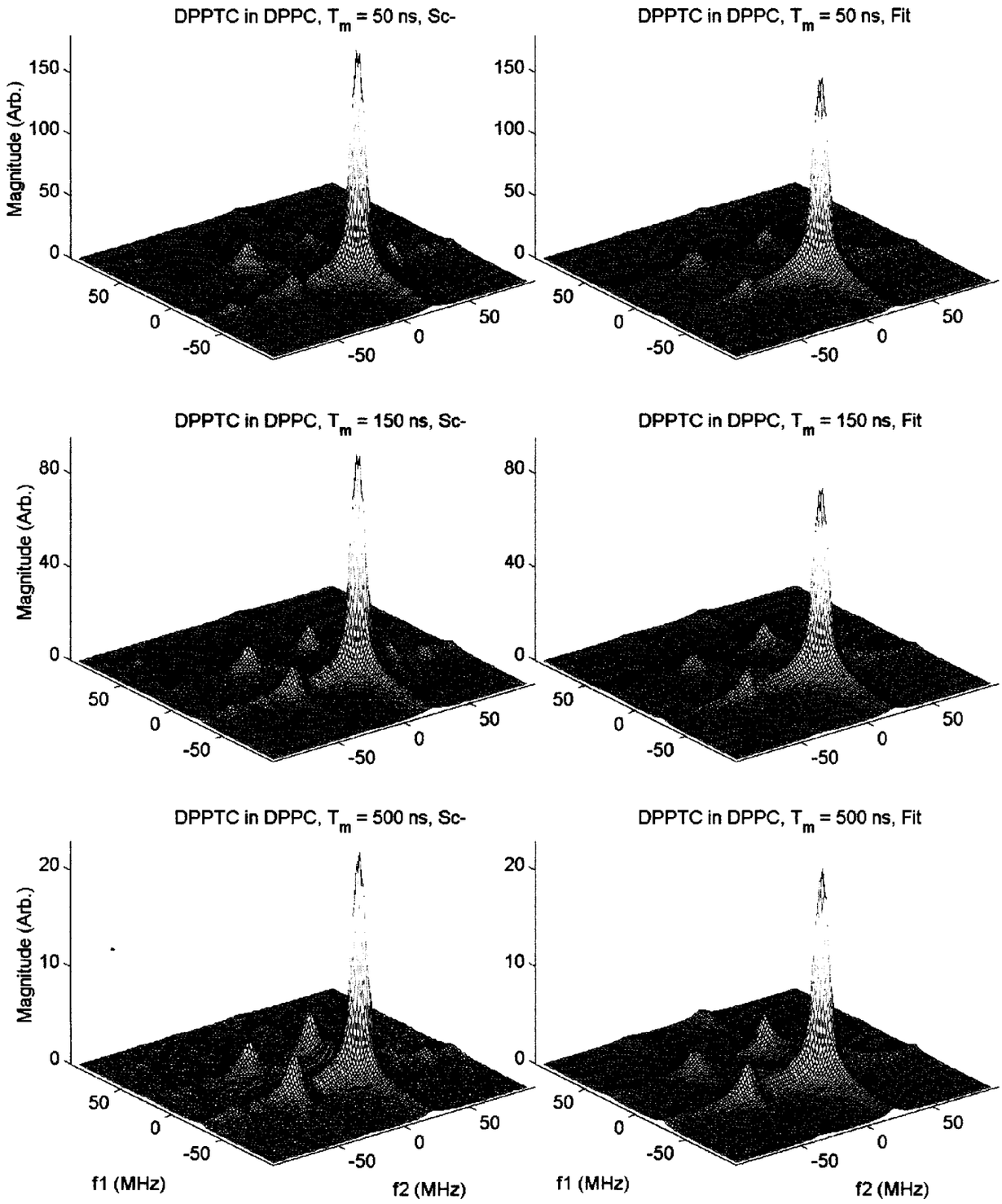


Figura II.3.9: Espectros experimentais (2D-ELDOR Sc-) e respectivas simulações do marcador de spin DPPTC em dispersões de DPPC puro a T=50°C , 17,3 GHz e para uma série de tempos de mistura T_m.

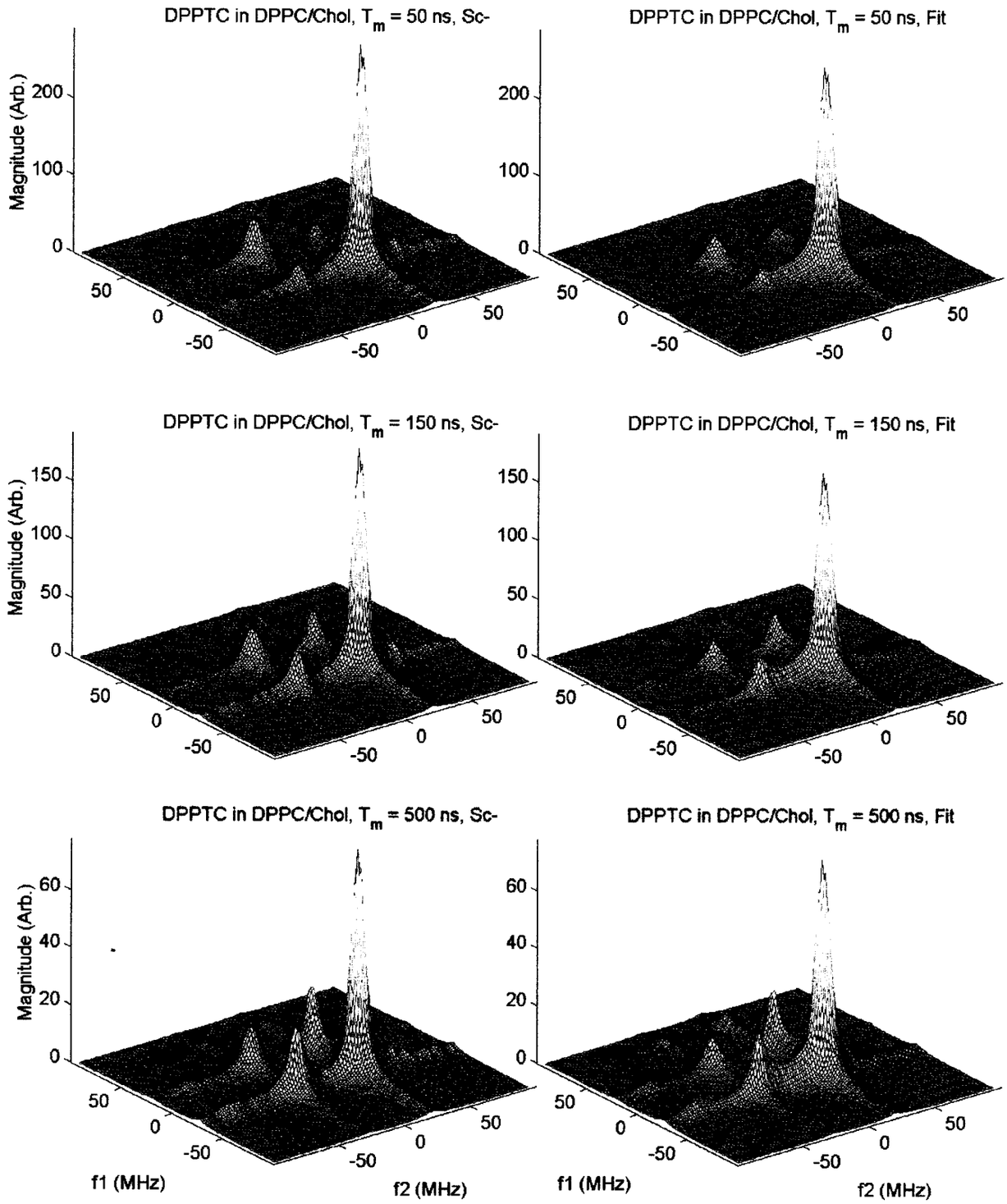


Figura II.3.10: Espectros experimentais (2D-ELDOR S_{c-}) e respectivas simulações do marcador de spin DPPTC em dispersões de DPPC/Chol (1/1) a T=50°C , 17,3 GHz e para uma série de tempos de mistura T_m.

A partir dos parâmetros da **Tabela II.3.1** pode-se caracterizar, como será visto, detalhadamente as fases lipídicas de líquido cristalino (Lc) e líquido ordenado (Lo), caracterização esta feita tanto do ponto de vista das cadeias lipídicas e da estrutura rígida da molécula de CSL, quanto do grupamento que compõe a cabeça polar do fosfolipídio.

Inicialmente, as simulações são analisadas em termos do mesmo marcador de spin na ausência e presença de colesterol. Assim, o marcador de spin 16-PC se movimenta mais rapidamente na fase de Lo do que na fase de Lc, tanto para amostras de DPPC quanto SM, com um aumento nos valores de $R_{\perp}$ e $R_{//}$. Isto significa que as cadeias acil dos lipídios tornam-se mais fluídas na presença de colesterol, ou seja, na fase de Lo. O parâmetro de ordem S_0 para 16-PC em amostras contendo DPPC e SM aumenta consideravelmente na presença de colesterol, indicando um ordenamento grande das cadeis acil ao longo do vetor diretor local, ao passo que a anisotropia do tensor (S_2) de ordem permanece praticamente a mesma. O comportamento das taxas de difusão rotacional e dos parâmetros de ordem parecem ser efeitos contraditórios, ou seja, apesar do movimento estar mais restrito (maior ordem), as cadeias têm maior fluidez na fase de Lo do que na de Lc (Ipsen *et al.*, 1987; Straume & Litman, 1987; Shin & Freed, 1989). Além disso, um volume livre extra (Freed, 1994) pode ser criado pela estrutura bastante assimétrica das moléculas de colesterol, o que permitiria movimento mais rápido dos lipídios na fase de líquido ordenado. O aumento do parâmetro de ordem na presença de alta concentração de colesterol na membrana também leva a um aumento no efeito MOMD sobre os espectros de 2D-ELDOR. Isto pode ser visto na forma de um aumento considerável na largura dos picos diagonais (f_1=f_2, "autopeaks"), o que é refletido nas simulações como uma maior contribuição para o alargamento Gaussiano inomogêneo (Δ_g) tanto nas amostras de DPPC quanto naquelas contendo SM.

Além das taxas de difusão rotacional e dos parâmetros de ordem, é possível a obtenção de informações a respeito da taxa de difusão translacional das cadeias lipídicas,

como discutido na seção II.2.3. A freqüência de colisões, refletida no parâmetro ω_{exc}, bimoleculares é o número a ser analisado. Da **Tabela II.3.1**, pode-se observar que uma taxa de "exchange" considerável é obtida a partir das simulações para as amostras de DPPC/16-PC e SM/16-PC sem colesterol (fase Lc), fato este que indica maior mobilidade translacional das moléculas de lipídio na ausência de colesterol e que está em pleno acordo com as observações qualitativas apresentadas no início desta seção e onde atentava-se para a falta de picos cruzados nos espectros oriundos de amostras com colesterol (fase Lo). A falta de picos cruzados pode, portanto, ser atribuída à falta ou pouca contribuição de mecanismos que promovam a transferência de magetização entre as linhas hiperfinas durante T_m. As cadeias lipídicas apresentam, portanto, maior mobilidade translacional na fase Lo do que na fase Lc.

Passando agora para a análise dos resultados contidos na **Tabela II.3.1** para o marcador de spin CSL (que faz o papel de uma molécula de colesterol marcada), observa-se que as taxas de difusão rotacional deste marcador são muito mais lentas quando comparadas àquelas obtidas para 16-PC independentemente da presença de colesterol, devido à diferença entre o momento de inércia das cadeias acil e do "backbone" do grupo esterol, como já apontado na discussão qualitativa dos espectros. As moléculas de CSL apresentam taxas de difusão rotacional menores na fase de Lo do que na fase de Lc, contrariamente às cadeias lipídicas (16-PC), e parâmetros de ordem aumentando na presença de colesterol para um valor extremamente alto de 0,91. Este ordenamento bastante alto leva a um grande alargamento inomogêneo em ambos os casos, mas com a fase Lo ainda mostrando valores de Δ_g maiores do que aqueles para a fase Lc. Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores de Kar *et al.* (1985) e Shin *et al.* (1990). A maior resolução e sensibilidade à dinâmica da técnica de 2D-ELDOR, juntamente com a possibilidade de simular os espectros daí obtidos, são uma maneira bastante confiável de obter informações a respeito da difusão

lateral de moléculas tipo esterol em membranas, aspecto que, ao contrário da mobilidade de cadeias lipídicas, ainda carece de mais investigações. Assim, na **Tabela II.3.1**, vê-se que, ao passar da fase Lc para Lo através da adição de colesterol às amostras, diminui-se a mobilidade lateral de moléculas de CSL drasticamente, fato refletido na ausência de picos cruzados nos respectivos espectros (**Figuras II.3.7** e **II.3.8**). O que se depreende desse resultado e daquele obtido para 16-PC em termos de mobilidade lateral é que o maior empacotamento das moléculas de lipídios e colesterol na fase Lo previne as colisões entre os radicais nitróxidos ligados às cadeias acil e ao colestane (CSL).

A região polar do fosfolipídio (também chamda de cabeça polar e estudada pelo uso do marcador DPPTC, v. **Figura II.2.6**) tem um comportamento diferente daquele apresentado acima para a região das cadeias acílicas. Contrariamente aos espectros de 16-PC e CSL, nenhuma diferença significante é observada entre a fase Lo e a Lc em termos de inspeção visual dos espectros de DPPTC (**Figuras II.3.9** e **II.3.10**). Entretanto, as simulações de tais espectros revela que a mobilidade rotacional aumenta consideravelmente na presença de colesterol (fase Lo), assim como é observado uma diminuição razoável no parâmetro de ordem S_0. Essas observações estão em concordância com estudos anteriores (Henze, 1980; Tanaka *et al.*, 1997; Ge *et al.*, 1999). Neste ponto, é importante lembrar que a estrutura das moléculas de colesterol consiste de um anel tetracíclico e uma cadeia lateral carbônica que se extende em direção ao centro da bicamada lipídica, e um grupo hidroxila localizado na interface polar/não-polar. Isto é, as moléculas de colesterol estão localizadas na membrana mais ou menos na altura das cadeias acílicas dos fosfolipídios. Portanto, ao efeito das moléculas de colesterol, criando espaços na região polar da bicamada lipídica, tem sido atribuído um enfraquecimento das interações entre as cabeças polares, o que levaria à diminuição em S_0 nessa região (Yeagle *et al.*, 1975; McIntosh *et al.*, 1989). Além disso, esse enfraquecimento devido à presença de colesterol faz com que as taxas de difusão rotacional

$R_{\perp}$ e $R_{//}$ para o DPPTC apresentem o maior aumento na fase Lo dentre os três marcadores usados ($R_{\perp}$ na fase Lo aumenta por um fator ~7 em relação à fase Lc e $R_{//}$ por quase uma ordem de grandeza, v. **Tabela II.3.1**). Ou seja, a fase Lo caracteriza-se por uma difusão rotacional ainda mais rápida e, consequentemente, maior fluidez, na região da cabeça polar. A mobilidade translacional na região polar segue o mesmo padrão observado para 16-PC e CSL, com sua drástica redução na presença de alta concentração de colesterol.

II.3.1.2 Misturas de DPPC/Chol: Estudos em Função da Temperatura e da Concentração de Colesterol

Uma vez distingüídas e caracterizadas as fases Lc e Lo de dispersões lipídicas puras e com alta concentração de colesterol e mostrado quão direto e detalhado podem ser estudos de 2D-ELDOR dessas estruturas, uma análise das suas propriedades em função da temperatura de medida e da quantidade de colesterol presente na amostra faz-se necessária. Assim, nesta seção é tomado apenas o marcador de spin 16-PC, mas desta feita, amostras contendo diferentes concetrações de colesterol são medidas à temperaturas indo desde cerca de 20°C até tão alto quanto 55°C. São apresentados e discutidos dois grupos de resultados: [1] aqueles referentes às amostras DPPC e DPPC/Chol (1/1) contendo o marcador 16-PC e para o intervalo de temperaturas 20°C-55°C; [2] resultados para amostras de DPPC/Chol/16PC com concentrações variáveis de colesterol e para o mesmo intervalo de temperatura anterior. O obejtivo é, portanto, tentar entender o efeito de altas concentrações de colesterol sobre as diferentes fases dos lipídios quando a temperatura é alterada, bem como associar esses resultados com aqueles oriundos de amostras com um quantidades gradativamente maiores de colesterol.

Inicialmente, então, são apresentados nas **Figuras II.3.11-II.3.12** espectros de 2D-ELDOR S_{c-} e suas respectivas simulações do marcador de spin 16-PC em amostras de DPPC

e DPPC/Chol (1/1) para T=30°C. Para temperaturas menores que 41°C, os lipídios DPPC da amostra sem colesterol estão na fase gel e espectros característicos para essa fase são mostrados nas figuras citadas. Os parâmetros $R_{\perp}$ e S_0 se mostraram mais sensíveis à mudanças organizacionais da fase lipídica e os valores obtidos das simulações dos espectros de 2D-ELDOR S_{c-} das amostras 16PC/DPPC e 16PC/DPPC/Chol (1/1) para todas as temperaturas estão colocados na **Tabela II.3.2**. A **Figura II.3.13** permite uma melhor visualização do comportamento daqueles parâmetros como função da temperatura, assim como permite observar o efeito da presença de colesterol sobre as propriedades de fluidez e ordem das membranas lipídicas. Em temperaturas abaixo da transição de fase gel-Lc, a mobilidade rotacional é menor e o parâmetro de ordem maior do que os valores na fase Lc e vê-se nitidamente uma transição de fase acontecendo no parâmetro S_0 em torno de 41°C. Esta descrição é coerente com as definições gerais conhecidas para essas duas fases lipídicas (Yeagle, 1992) (ESR, nesse caso, não é sensível às outras transições que ocorrem em mais baixa temperaturas, já que as diferenças estruturais entre tais fases são menos dramáticas em termos dos parâmetros medidos por EPRe daí a ausência de outras transições de fase na **Figura II.3.13**). A fase gel em que se encontram os lipídios da amostra de DPPC puro, como esperado, apresenta um ordenamento maior que a fase Lc , e comparável àquele imposto pelas moléculas de colesterol na fase de Lo. Mais especificamente, da **Tabela II.3.2A**, observa-se que $R_{\perp}$ diminui por um fator ~3 e S_0 decresce por um fator ~4 quando se vai da fase de Lc para a fase gel. Essas duas alterações fazem com que os espectros do marcador 16-PC na fase gel (**Figura II.3.11**) sejam mais largos e menos resolvidos do que aqueles relativos à fase de Lc (**Figura II.3.3**). Com isso, as simulações de espectros de dados na fase gel se tornam mais demoradas e trabalhosas, apresentando certas discrepâncias entre experimento e simulação finais.

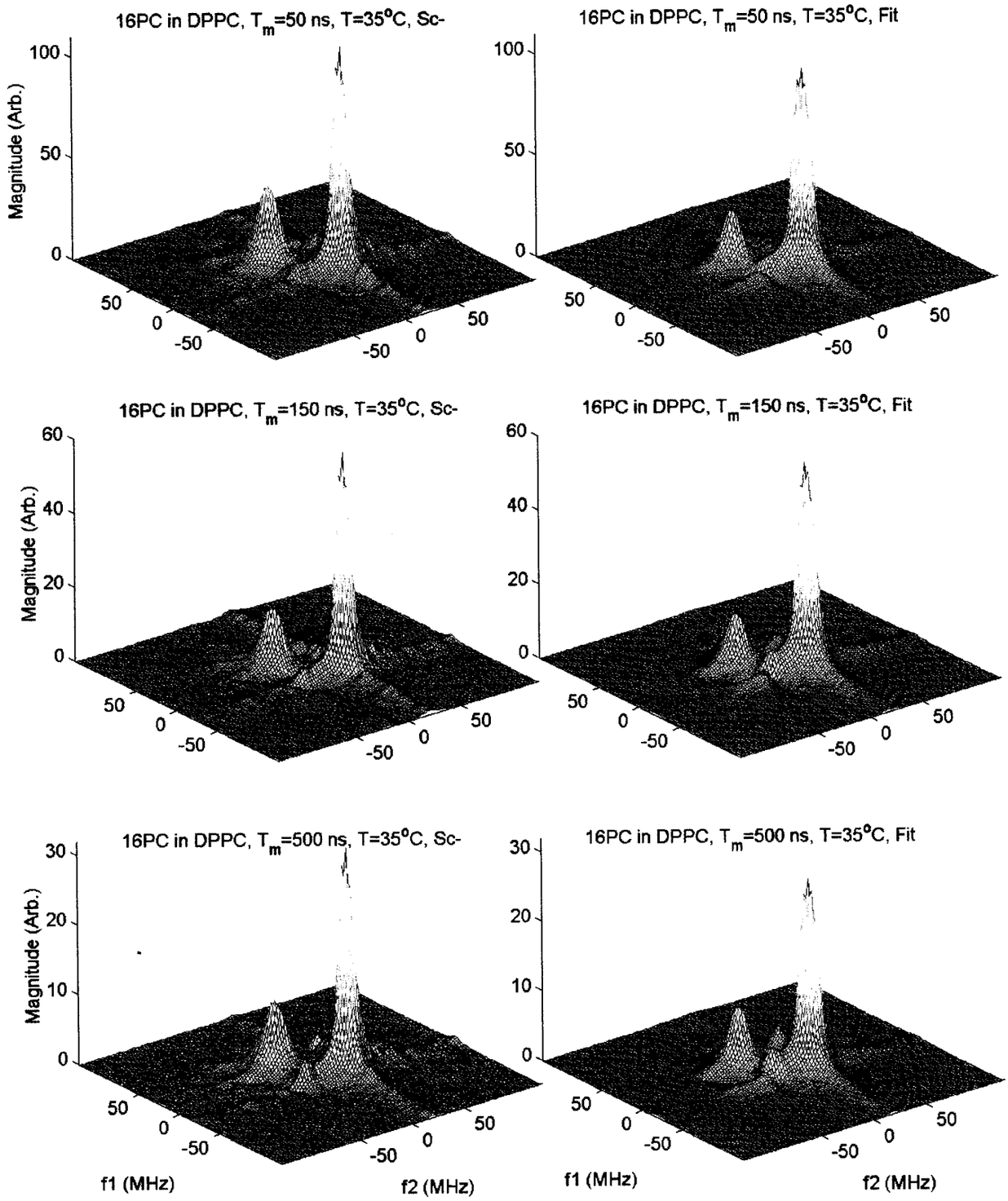


Figura II.3.11: Espectros experimentais (2D-ELDOR S_c) e respectivas simulações do marcador de spin 16-PC em dispersões de DPPC puro a T=35°C , 17,3 GHz e para uma série de tempos de mistura T_m.

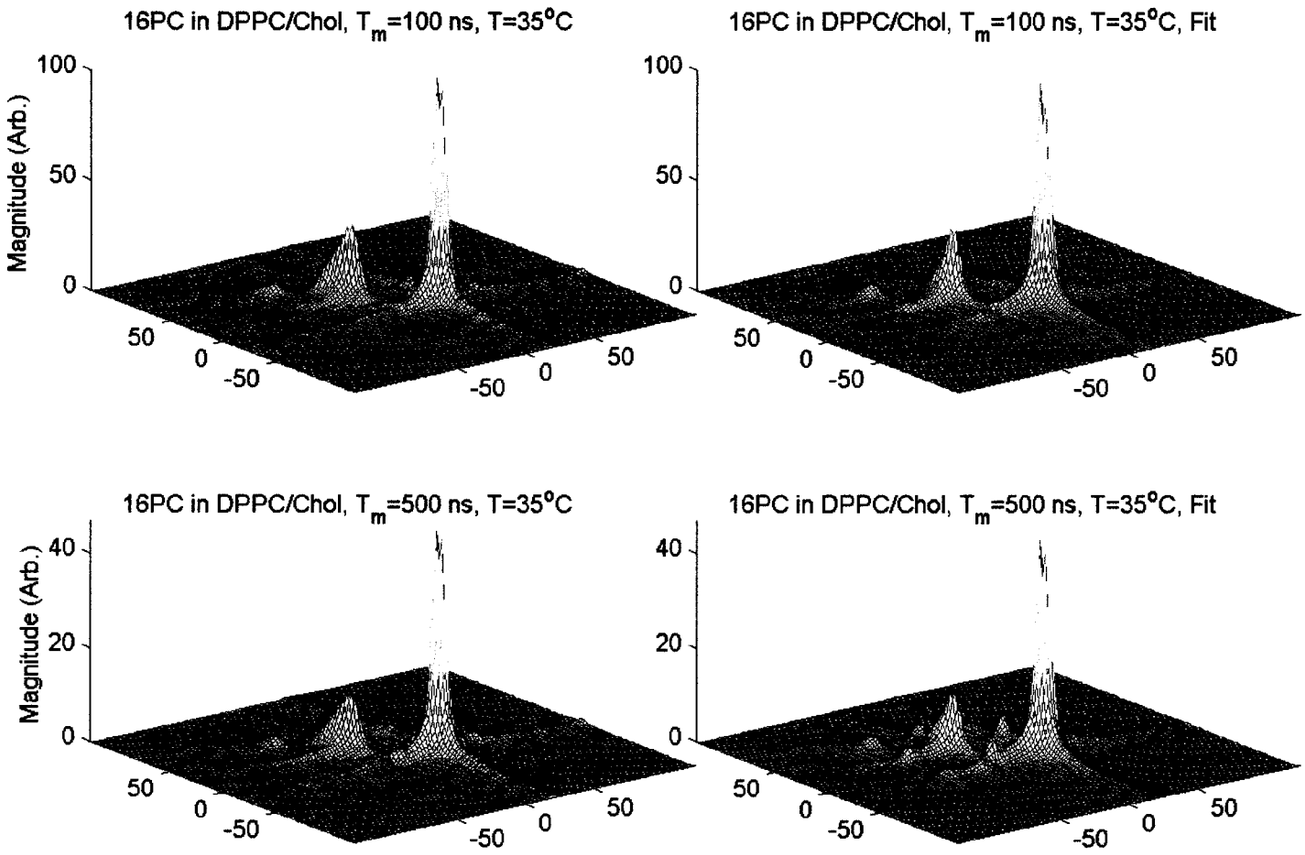


Figura II.3.12: Espectros experimentais (2D-ELDOR S_{c-}) e respectivas simulações do marcador de spin 16-PC em dispersões de DPPC/Chol (1/1) a T=35°C , 17,3 GHz e para uma série de tempos de mistura T_m.

Tabela II.3.2: Parâmetros obtidos para o marcador 16-PC em amostras de DPPC puro e DPPC/cholesterol (1/1) em várias temperaturas.

(A) DPPC/16PC

Temp (°C)	$R_\perp$ ($\times 10^8 s^{-1}$)	S_0
57,3	2,50	0,12
52,0	2,40	0,14
47,8	2,48	0,16
44,5	1,70	0,20
42,5	1,60	0,21
40,5	1,50	0,25
38,2	1,00	0,42
35,0	0,90	0,42
24,5	1,00	0,49

(B) DPPC/Chol/16PC

Temp (°C)	$R_\perp$ ($\times 10^8 s^{-1}$)	S_0
57,3	9,77	0,40
47,8	4,41	0,41
35,0	3,22	0,45
24,5	1,64	0,49

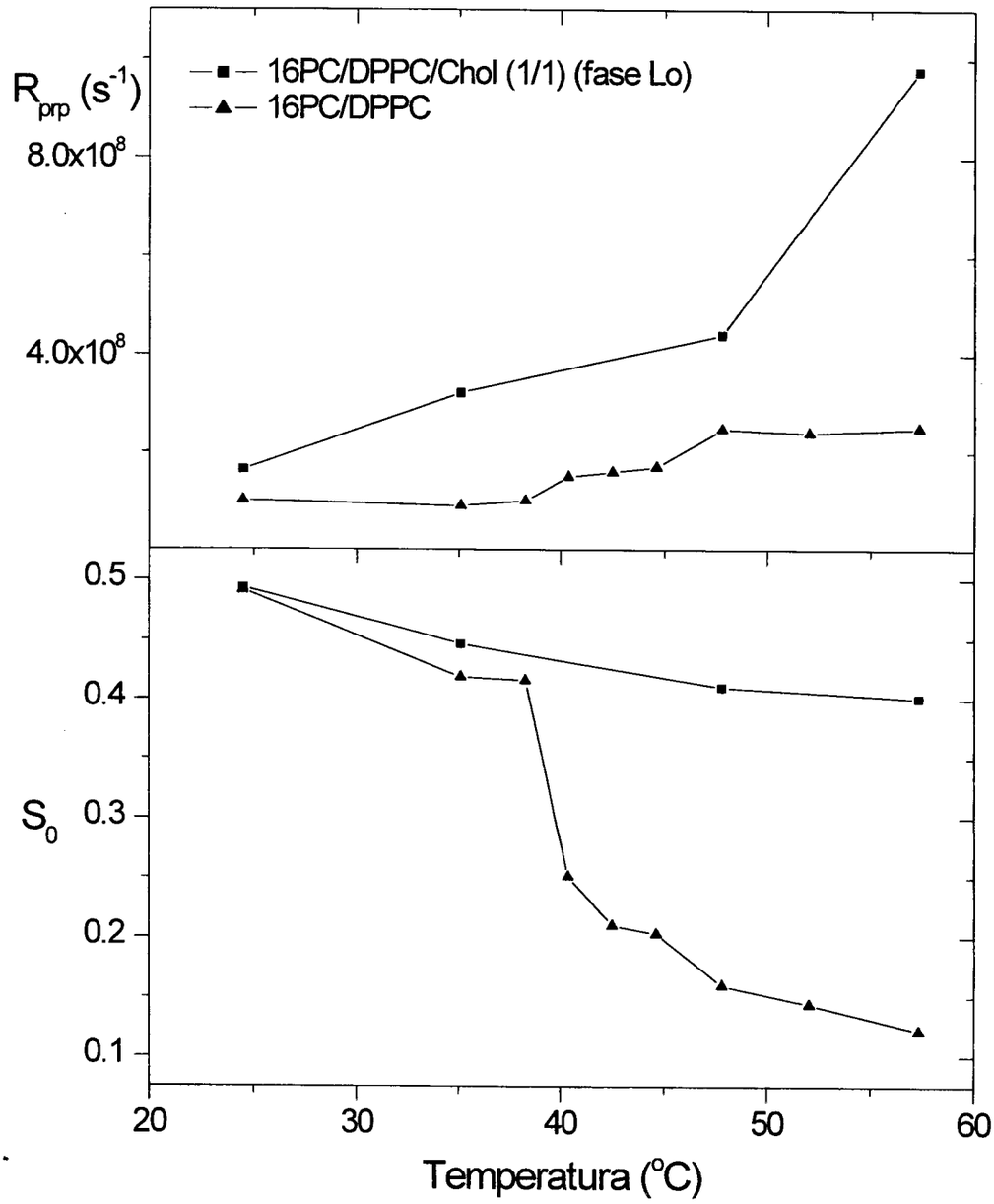


Figura II.3.13: Variação com a temperatura de $R_\perp$ (R_{prp}) e S_0 do marcador de spin 16-PC em dispersões de DPPC puro e de DPPC/Chol (1/1). Dados da **Tabela II.3.2**.

A principal característica das curvas apresentadas na **Figura II.3.13** é a presença de uma transição de fase em S_0 para a amostra de DPPC puro e a sua ausência na presença de 50 mol% de colesterol na membrana (o mesmo tipo de comportamento é observado com o

parâmtro S_2). O efeito da presença de colesterol em concentrações elevadas é, portanto, o de manter os lipídios organizados de uma maneira única sobre o intervalo de temperaturas medido, abolindo a transição de fase pertinente e mantendo a membrana em um estado de fluidez alta e de ordenamento também elevado (fase Lo). Uma comparação menos cuidadosa entre os espectros relativos à fase gel (**Figura II.3.11**) e fase Lo (**Figura II.3.12**), poderia levar a se acreditar que tratam-se de espectros relativos a fases lipídicas com características físico-químicas semelhantes, dada a presença de linhas largas e ausência de picos cruzados. No entanto, mesmo quando a inspeção visual falha ou é duvidosa, como neste caso, as simulações através dos programas NLSPMC são capazes de distingüir aquelas duas fases, apontando, por exemplo, que a mobilidade dos lipídios ainda é relativamente menor na fase gel e que, nesta, há interações de menor magnitude do que na fase Lc do tipo "exchange", ao passo que não há tais interações nos espectros da fase Lo (valores de ω_{ex} são obtidos das simulações de espectros de DPPC a T=30°C, mas não de espectros de DPPC/Chol a T=30°C). Isto demonstra a capacidade da técnica de 2D-ELDOR aliada ao uso dos programas de simulação na distinção de diferentes fases lipídicas mesmo quando o reconhecimento de padrões por inspeção visual (como feito na comparação ente Lc e Lo) torna-se difícil.

O passo seguinte no estudo da estrutura dinâmica de membranas modelo é, então, a medida e análise de espectros relativos a amostras contendo diferentes concentrações de colesterol. Esta parte do trabalho inclui-se em um projeto maior de colaboração com o Prof. Gerald Feigenson (Biotechnology Department-Cornell University) em que é buscado o estudo completo da estrutura lipídica como função da composição em membranas ternárias de DPPC/DLPC/colesterol e SM/POPC/colesterol.

Para isso, foram medidas amostras de DPPC/Chol/16PC com concentrações de colesterol tendo como limites os dois casos analisados acima: 0 mol% até 50 mol%. A

escolha das concetrações de colesterol utilizadas se baseou em estudos por fluorescência feitos por Feigenson & Buboltz (2001), onde é sugerido um diagrama de fases para misturas de DPPC/DLPC/Chol (DLPC=dilaurilfosfatidilcolina). Assim, as amostras aqui estudadas compreenderam composições lipídicas ao longo do lado de tal diagrama de fase correspondente a misturas binárias de DPPC/Chol (**Figura II.3.14**). As concentrações de colesterol medidas foram 0, 10, 20, 30, 40 e 50 mol%.

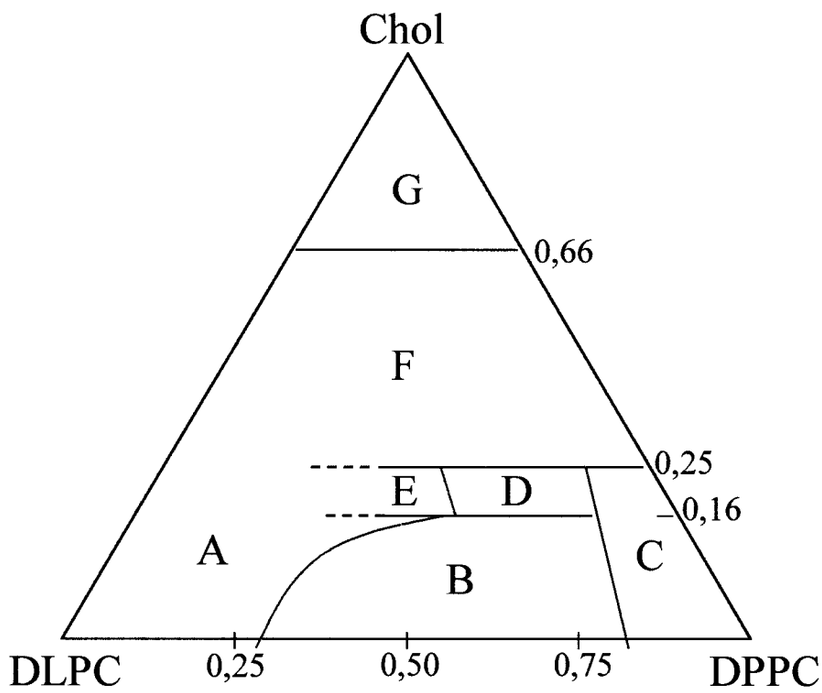


Figura II.3.14: Diagrama de fase para misturas de DPPC/DLPC/Chol a T=24°C. Cada lado representa uma mistura binária dos lipídios nos respectivos vértices. Os números correspondem às concentrações de cada componente, por exemplo, os números crescentes na direção do Chol representam a sua concentração na mistura. As fases acima são identificadas como: A-fase lamelar fluida rica em DLPC; B- fases fluida lamelar e ordenada rica em DPPC coexistindo; C- fase ordenada rica em DPPC; D- fase que muda continuamente de ordenada para fluida; E- fase ordenada-fluida; F- fase de líquido ordenado. As medidas de 2D-ELDOR foram realizadas segundo o lado DPPC/Chol para [Chol] entre DPPC puro até 0.5. (adaptada de Feigenson & Buboltz, 2001).

Feigenson & Buboltz (2001) propõem modelos para explicar cada uma das fases, mas algumas das fronteiras entre diferentes fases não estão bem entendidas e determinadas. Nesse ponto, 2D-ELDOR é uma técnica bastante útil como mostrado na **Figura II.3.15**,

onde mostram-se os gráficos de contorno correspondentes aos espectros do marcador 16-PC em amostras contendo diferentes concentrações de colesterol. As alterações devido a mudanças da fase lipídica quando é aumentada a quantidade de colesterol são claras, com o desaparecimento dos picos cruzados e alargamento dos picos diagonais. Para quantificar reforçar este resultado, simulam-se os espectros para cada temperatura e cada concentração, obtendo-se os parâmetros descritos anteriormente. A **Figura II.3.16** mostra a variação dos parâmetros $R_{\perp}$, S_0 e S_2 do marcador 16-PC nas misturas de DPPC/Chol em função da temperatura e da concentração de colesterol.

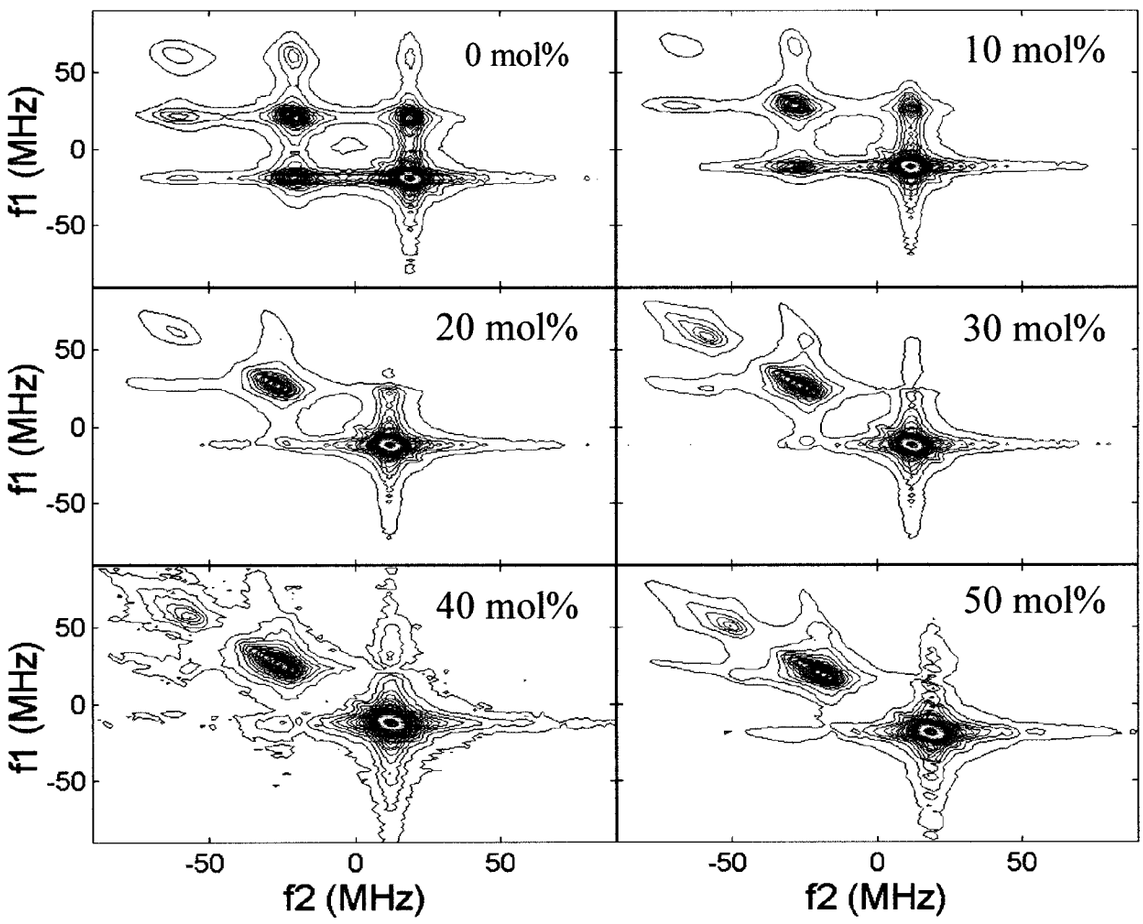


Figura II.3.15: Gráficos de contorno dos espectros de 2D-ELDOR S_{c-} do marcador 16-PC em dispersões de DPPC/Chol com diferentes concentrações de colesterol (17,3 GHz, T=50°C, T_m=500 ns).

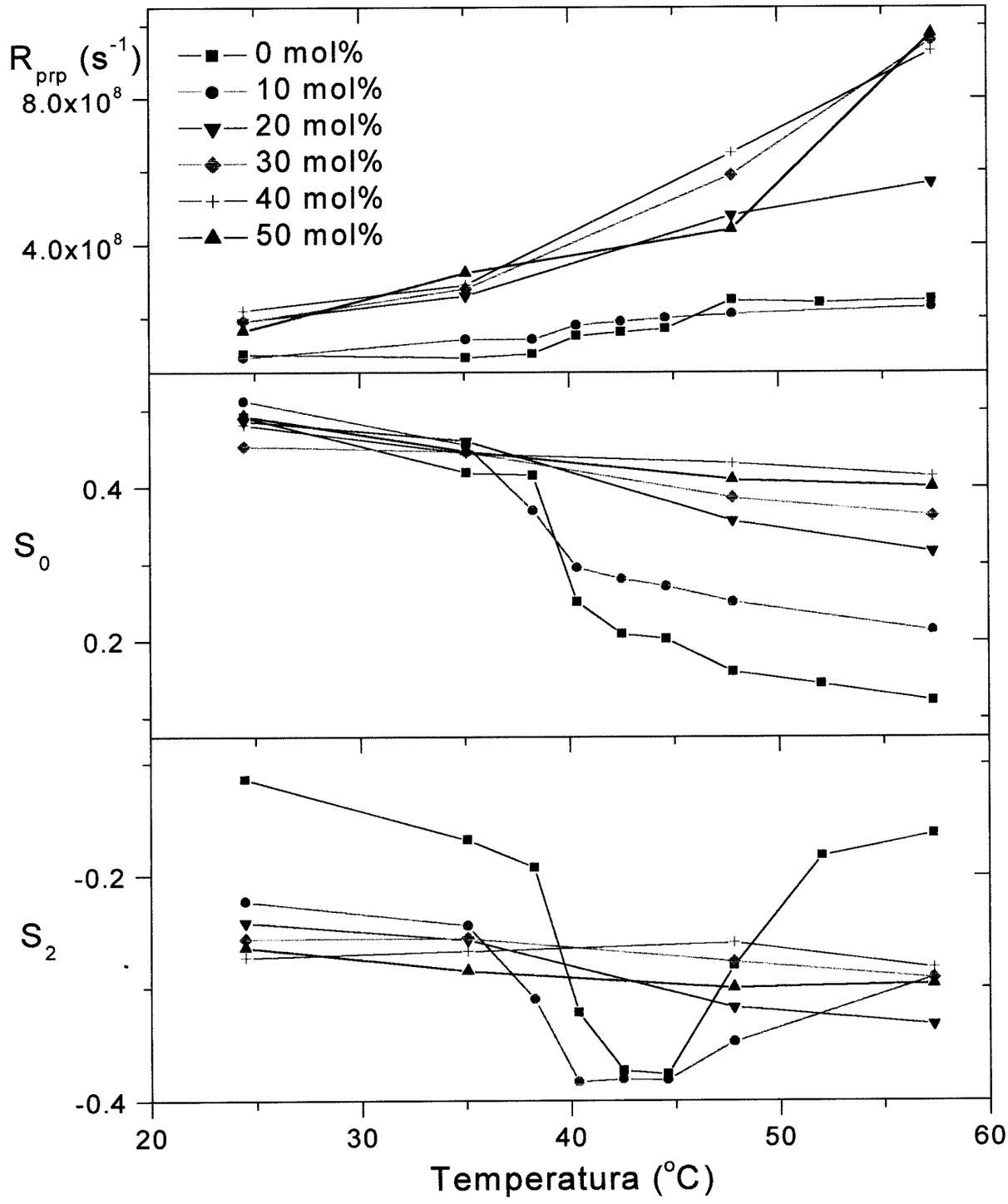


Figura II.3.16: Variação com a temperatura de $R_{\perp}$ (R_{prp}), S_0 e S_2 do marcador de spin 16-PC em dispersões de DPPC/Chol para várias concentrações de colesterol. Os parâmetros são obtidos a partir de simulações dos espectros de 2D-ELDOR do marcador para as diversas temperaturas e concentrações de colesterol.

Na **Figura II.3.16** vê-se com clareza o efeito do colesterol abolindo a transição gel para Lc dos lipídios DPPC à medida que sua concentração aumenta, criando nos gráficos daquela figura duas regiões distintas e limitadas por concentrações de colesterol em torno de 20 mol%. Assim, é possível concluir-se que a fase C no diagrama da **Figura II.3.14** deve estar dividida em pelo menos duas outras fases, pois para concentrações de colesterol em torno de 20 mol% já observa-se um padrão qualitativo e quantitativo correspondente a fase de Lo. Para tentar determinar essa fronteira com maior exatidão, medidas para [Chol]=15 mol% foram feitas (dados não apresentados), onde os espectros ainda mostram crescimento de picos cruzados e características espectrais de lipídios em fases gel (T=30°C) e Lc (T=50°C), o que indica a existência de uma fronteira entre 15 e 20 mol% dividindo a região C do diagrama de fase. O limite superior da região C em 25 mol%, bem como outras regiões de interesse no diagrama de fase acima, ainda carecem de uma investigação mais detalhada via 2D-ELDOR, que mostrou ser uma técnica bastante conveniente para este tipo de estudo.

II.3.2 Estrutura Dinâmica de Membranas Bleb

A aplicação de técnicas de EPR bidimensional ao estudo de membranas biológicas também mostrou-se frutífera, mas com algumas limitações temporárias. Como descrito na seção II.2.2, membranas bleb são membranas plasmáticas de mastócitos que mediam o processo de transmissão de sinal do meio extra para o intracelular para receptores de IgE (imunoglobulina E). Como há o interesse em tentar-se distingüir mudanças na organização dos lipídios quando da ligação do antígeno IgE às membranas (processo chamado de estimulação ou ativação daqui por diante), as medidas foram feitas em amostras não estimuladas e estimuladas, ou seja, membranas na ausência e na presença de IgE.

Os espectros de 2D-ELDOR Sc- do marcador de spin 16-PC em membranas bleb não estimuladas e membranas estimuladas a uma temperatura de 28°C estão colocados nas **Figuras II.3.17** e **II.3.18**, respectivamente. Os espectros para as demais temperaturas são similares a esses e, por isso, não são apresentados. A **Figura II.3.19** contém a variação com a temperatura dos parâmetros $R_{\perp}$ e S_0 obtidos das simulações dos espectros acima. Nessa figura pode-se observar a ausência de dados para membranas estimuladas em temperaturas superiores a 28°C. Isto se deve ao fato de haver um decaimento muito pronunciado do sinal do marcador de spin 16-PC durante as medidas para temperaturas acima desse limite. O processo de estimulação das células com o antígeno parece criar agentes que reagem com o nitróxido na membrana, matando o marcador de spin.

Apesar da dificuldade encontrada com as membranas estimuladas, os resultados de 2D-ELDOR na **Figura II.3.19** mostram que os lipídios em membranas bleb mostram um comportamento de $R_{\perp}$ e S_0 semelhante ao de dispersões de DPPC/Chol (1/1). Os valores de S_0 são bem menores do que aqueles obtidos em dispersões de DPPC/Chol (1/1), o que é um resultado esperado em vista da maior complexidade das membranas biológicas, que não garante uma estrutura altamente organizada como a fase Lo em membranas modelo. A presença de apenas uma componente nos espectros de 2D-ELDOR não significa que a membrana seja homogênea, já que marcadores podem estar presentes em outros domínios cuja estrutura leva a um decaimento muito rápido do sinal de EPR, que fica perdido dentro do tempo morto do espectrômetro. Pode-se afirmar, todavia, que as membranas bleb possuem porções significativas de sua estrutura em fase de líquido ordenado, que acredita-se seja a fase lipídica presente em "rafts"de lipídios, os quais suportam os receptores de IgE, como sugerido anteriormente (Holowka and Baird, 1996; Brown & London, 1998; Anderson, 1998).

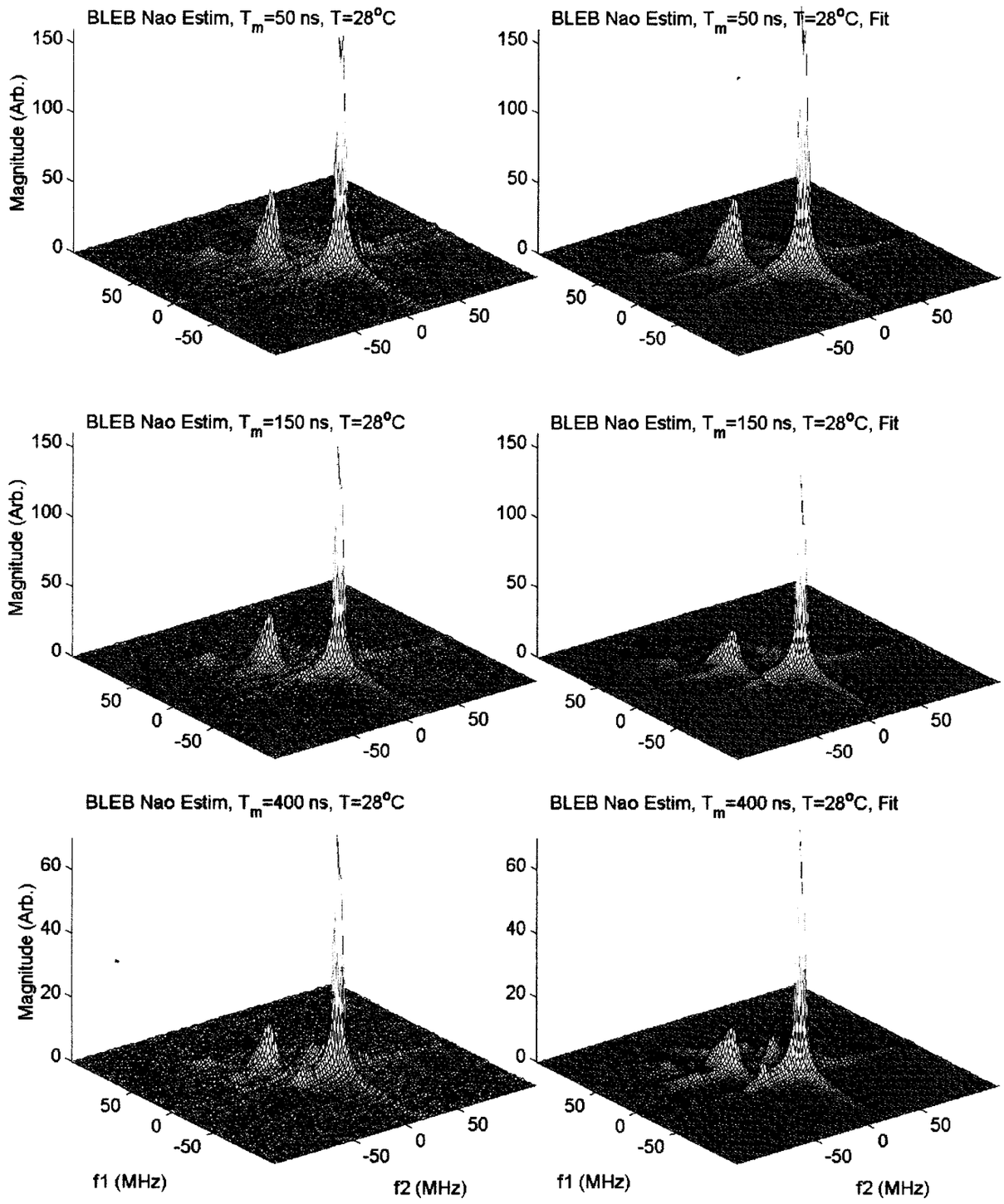


Figura II.3.17: Espectros experimentais (2D-ELDOR S_{c-}) e respectivas simulações do marcador de spin 16-PC em membranas bleb não estimuladas a T=28°C , 17,3 GHz e para uma série de tempos de mistura T_m.

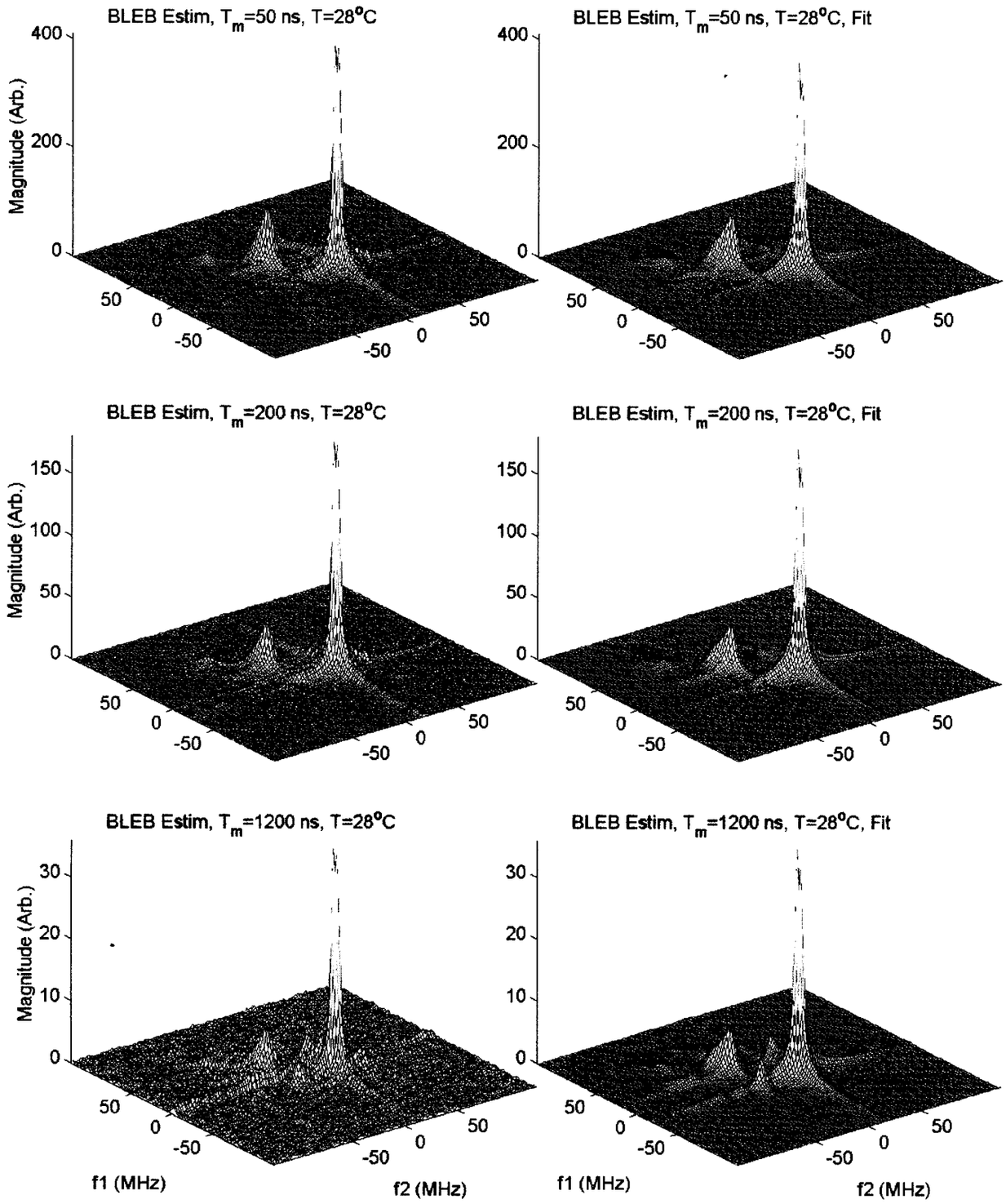


Figura II.3.18: Espectros experimentais (2D-ELDOR S_{c-}) e respectivas simulações do marcador de spin 16-PC em membranas bleb estimuladas a T=28°C , 17,3 GHz e para uma série de tempos de mistura T_m.

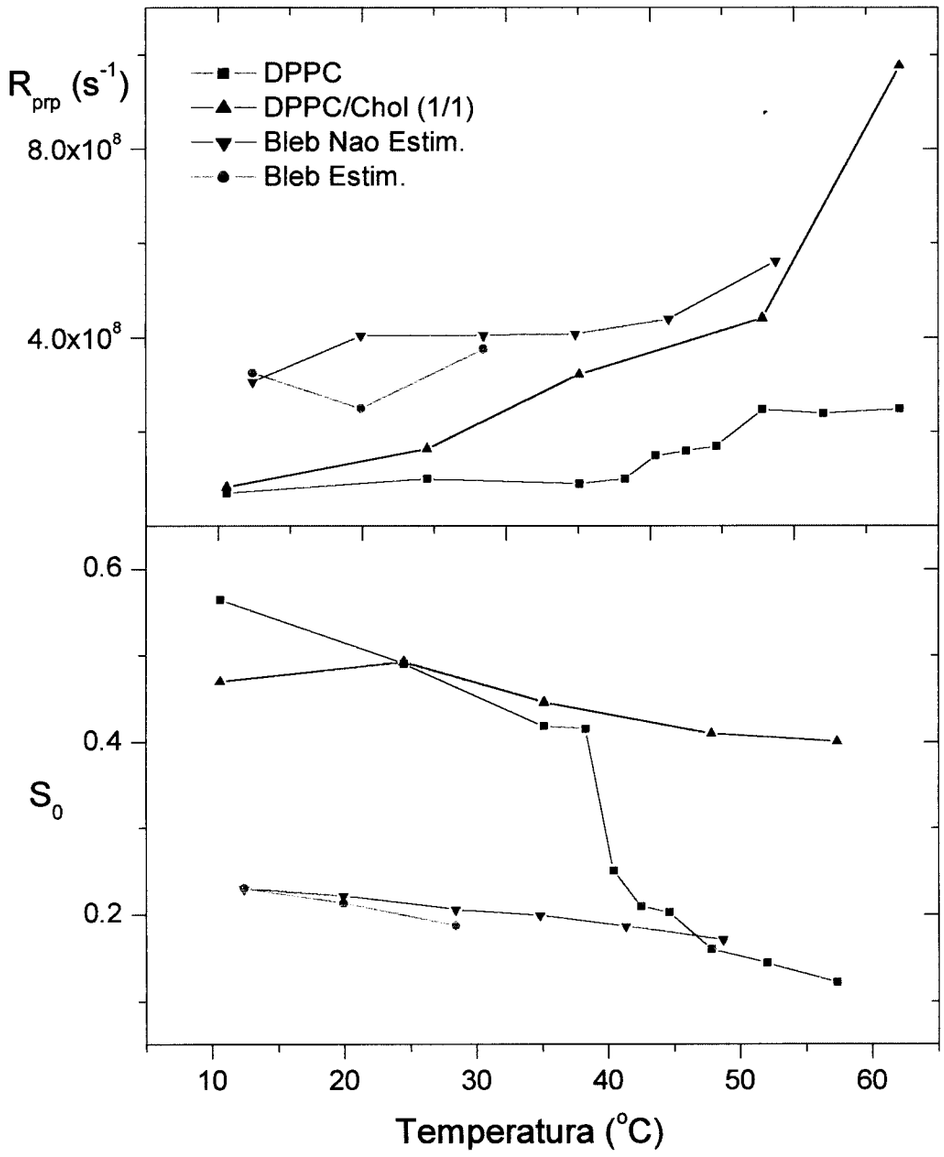


Figura II.3.19: Variação com a temperatura de $R_\perp$ (R_{prp}) e S_0 do marcador de spin 16-PC em membranas bleb não estimuladas e estimuladas comparados com os mesmos parâmetros em DPPC e DPPC/Chol (1/1). Os parâmetros são obtidos a partir de simulações dos espectros de 2D-ELDOR do marcador para as diversas temperaturas.

Apesar de, até o momento, não ter sido possível determinar claramente diferenças entre os espectros de membranas estimuladas daquelas não estimuladas, algumas análises preliminares dos espectros acima indicam que as amostras estimuladas apresentam

alargamentos homogêneos maiores do que membranas não ativadas, indicando maior ordenamento local em torno do marcador. Esta é uma diferença sutil, mas significativa e que carece de estudos mais detalhados das membranas bleb, talvez com a utilização de outros marcadores de spin para investigar regiões diferentes na membrana.

II.3.3 Interações Lipídios-Peptídeos: Lipídios "Boundary" vs "Bulk" em Membranas contendo Gramicidina A′

Interações lipídio-proteína e lipídio-peptídeo constituem uma linha de pesquisa em que 2D-ELDOR pode ser uma ferramenta bastante útil como demonstrado na presente seção. Aqui, toma-se o peptídeo Gramicidina A′ (GA) em membranas modelo de DPPC como objeto de estudo por EPR bidimensional e o interesse reside em se determinar os efeitos da presença de moléculas de GA sobre os lipídios na membrana.

A possibilidade de realizar experimentos de 2D-ELDOR com tempos mortos tão baixos quanto 20 ns, pulsos intensos de $\pi/2$ e tão curtos quanto 5 ns ou menos, de maneira a irradiar espectros tão largos quanto 220 MHz, bem como outros avanços tecnológicos recentes (Borbat *et al.*, 1997), permitiram, finalmente, uma distinção clara entre lipídios "boundary" (aqueles nas vizinhanças das moléculas de GA) e lipídios "bulk" como mostrado na **Figura II.3.20**, onde as mudanças espectrais pela presença de GA são muito mais dramáticas do que aquelas detectadas anteriormente por EPR-CW (Ge & Freed, 1999). Naquela figura, é mostrado também o espectro de 16-PC em DPPC puro para que possa ser feita uma comparação. Nas medidas de 2D-ELDOR, membranas de GA/DPPC com alta concentração de GA foram usadas como uma maneira de enfatizar a presença dos lipídios "boundary". Estes apresentam espectros de 2D-ELDOR com picos diagonais (autopeaks)

largos e sem nenhum pico cruzado (**Figura II.3.20**), comportamento de alguma forma similar àquele observado para lipídios na fase de Lo discutida anteriormente. Já os espectros de lipídios "bulk" têm linhas mais estreitas com picos cruzados substanciais e que, em princípio, correspondem ao espectro de lipídios na fase de Lc (a presença de GA também afeta a dinâmica de lipídios "bulk").

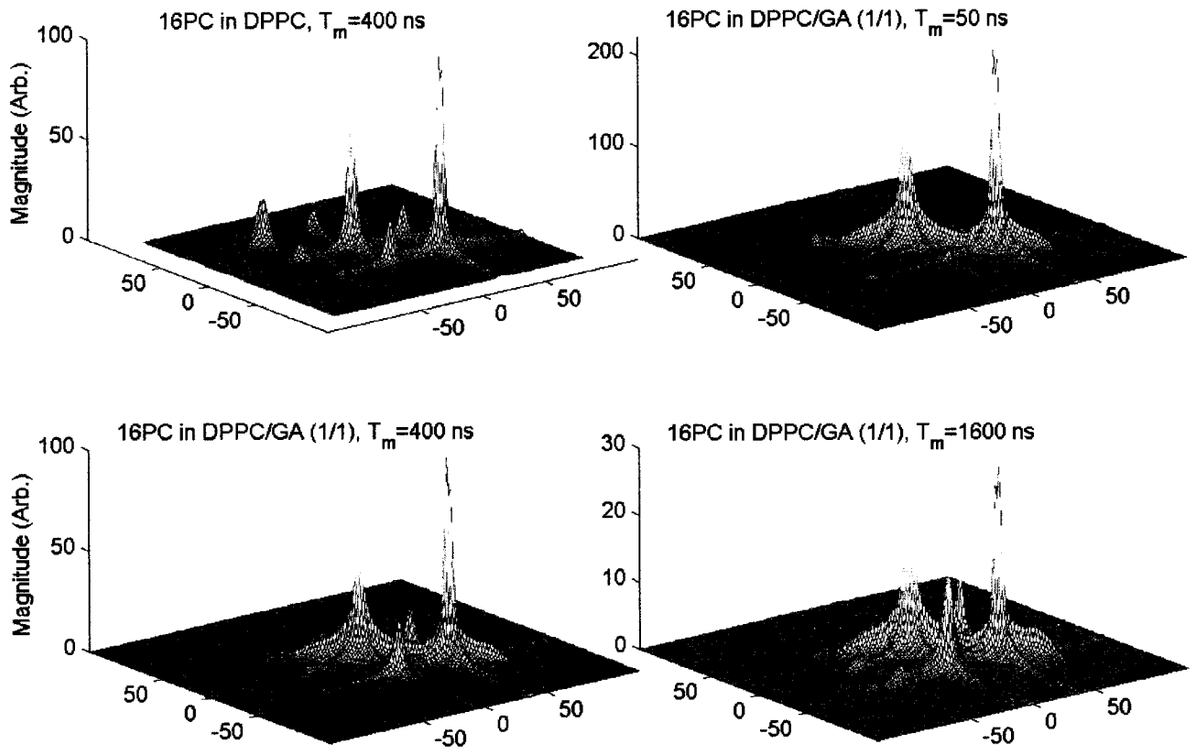


Figura II.3.20: Espectros experimentais (2D-ELDOR S_{c-}) do marcador de spin 16-PC em membranas de DPPC puro (alto à direita) e GA/DPPC (1/1) para T_m=50, 400, 1600 ns, em 17,3 GHz e T=71°C. O espectro de DPPC puro é mostrado por motivos de comparação.

A presença de moléculas de GA leva à formação de canais através da membrana, com desidratação das bicamadas lipídicas e, consequentemente, um "mismatch" hidrofóbico (McMullen & McElhaney, 1996) (**Figura II.3.21**). Para concentrações de GA superiores a

GA/DPPC=1/15 ocorre o rompimento de canais diméricos de GA com subsequente agregação de monômeros de GA e indução da fase lipídica hexagonal H_{II} (Killian, 1992; Van Echteld *et al.*, 1982). Ge & Freed (1999) sugeriram que a dobra da parte terminal das cadeias acílicas dos lipídios em torno das moléculas de GA é o mecanismo que suporta a quebra dos canais, com posterior agregação das moléculas de GA à medida que mais GA é adicionada à membrana (**Figura II.3.21**). Uma dobra do final das cadeias lipídicas é refletida nos espectros de EPR do marcador 16-PC como um parâmetro de ordem negativo (Ge & Freed, 1999), o que significa apenas que o eixo alinhado ao longo de z' não é z''' como definido no programa, mas x''' (x-ordem) ou y''' (y-ordem) (**Figura II.2.5**).

Uma vez sendo possível a medida de lipídios "boundary", passou-se para a etapa seguinte de um estudo completo de 2D-ELDOR que é a utilização dos programas de simulação na caracterização de tais lipídios. Neste ponto, o interesse reside, como esperado, na determinação das propriedades estruturais e dinâmicas em geral, mas com um aspecto especial no que tange à conformação estrutural desses lipídios "boundary", ou seja, se há ou não uma dobra da parte final das cadeias lipídicas onde está localizado o marcador 16-PC.

As simulações aqui realizadas apresentam dois pontos inéditos em termos de extensão da aplicabilidade dos programas NLSPMC: (1) pela primeira vez foi tratado o problema de simulações de EPR bidimensional contendo espectros com mais de uma componente e (2) realizaram-se simulações dos dados de EPR bidimensional também no modo SECSY, que, em se tratando de uma coleta de dados tipo eco, permite a separaçao entre alargamentos homogêneos e inomogêneos. O modo SECSY dos dados exprimentais é obtido mediante a transformação no domínio temporal $t_2 \rightarrow t_2 + t_1$ (Lee *et al.*, 1994).

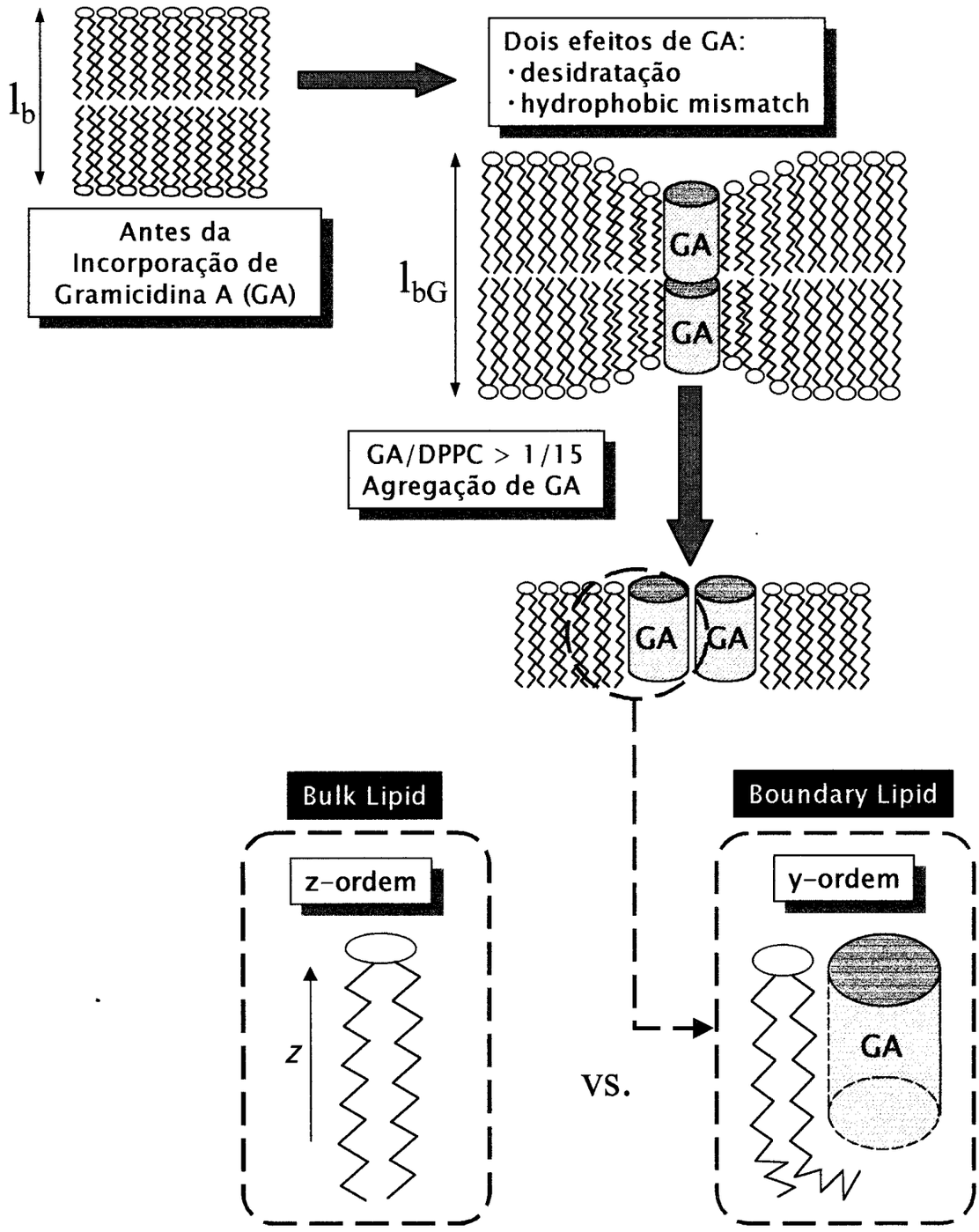


Figura II.3.21: Esquema resumindo os efeitos de moléculas de GA nas propriedados de biomembranas. Para concentrações superiores a GA/DPPC>1/15, ocorre agregação de GA. As definições de lipídios "boundary" e "bulk" também estão representadas.

A combinação de simulações de dados de 2D-ELDOR S_{c-} e SECSY foi fundamental para a obtenção de parâmetros física e quimicamente condizentes com a realidade, contribuindo para solucionar o problema de ambigüidade das simulações, quando mais de um conjunto de parâmetros fornecem espectros teóricos razoáveis. Para o caso de 16-PC em GA/DPPC as simulações dos dados em modo SECSY mostraram-se mais estáveis e confiáveis do que aquelas em que foram usados somente os dados de S_{c-}. Assim, os espectros foram primeiramente simulados em modo SECSY e o conjunto de parâmetros daí proveniente foi usado como ponto de partida para as simulações dos espectros 2D-ELDOR S_{c-}.

As simulações dos espectros multicomponentes do marcador 16-PC em DPPC/GA (1/1) a T=71°C e em 17,3 GHz e nos modos 2D-ELDOR S_{c-} e SECSY podem ser vistas nas **Figuras II.3.22** e **II.3.23**, onde são apresentados os resultados para os dois casos limites de ordem negativa (y-ordem) e positiva (z-ordem) dos lipídios "boundary", respectivamente. Apesar de somente os espectros para o valor mais longo de T_m serem mostrados naquelas figuras, as simulações foram feitas com todos os valores de T_m medidos.

Os parâmetros finais obtidos para cada modo e para os dois casos de ordenamento estão colocados na **Tabela II.3.3**. Daí, pode-se ver que os lipídios "bulk" têm alta mobilidade rotacional (com simetria axial), parâmetros de ordem e alargamentos inomogêneos pequenos, o que é compatível com lipídios na fase Lc em temperaturas elevadas. Além disso, uma comparação entre as diversas partes da **Tabela II.3.3** no que tange aos lipídios "bulk" leva à conclusão de que estes mostram características similares de mobilidade e ordenamento, independentemente, do modelo conformacional escolhido para o lipídio "boundary". Ou seja, o efeito da adição de GA não altera significativamente as propriedades dos lipídios "bulk".

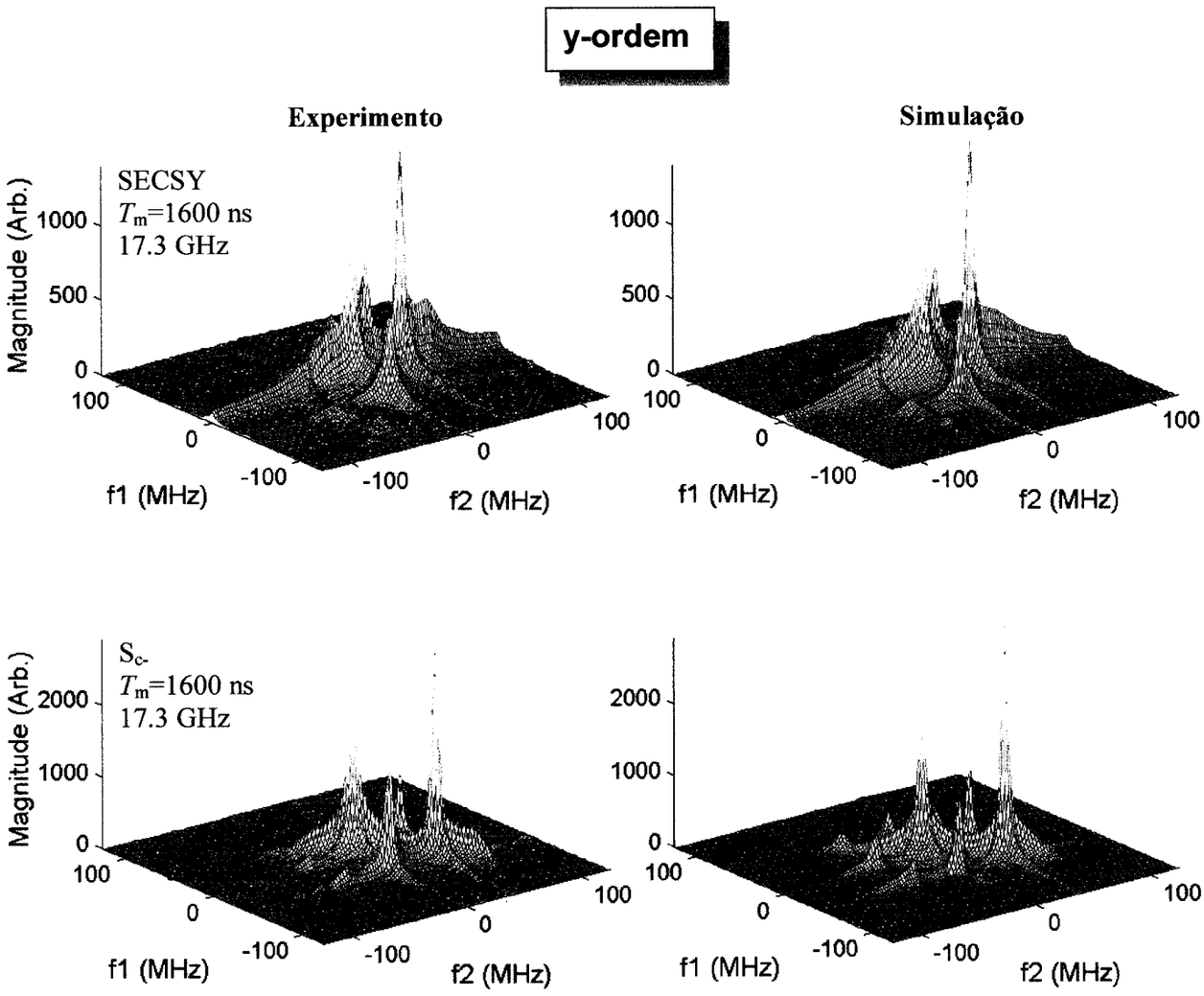


Figura II.3.22: Espectros de 2D-ELDOR do marcador 16-PC e simulações (y-ordem para lipídio "boundary") nos modos SECSY (painéis superiors) e S_{c-} (painéis inferiors) para os lipídios "bulk"e "boundary" em membranas de GA/DPPC (1/1). Somente os espectros correspondetes ao T_m mais longo são mostrados. Dados experimentais estão na coluna da esquerda com suas respectivas simulações à direita.

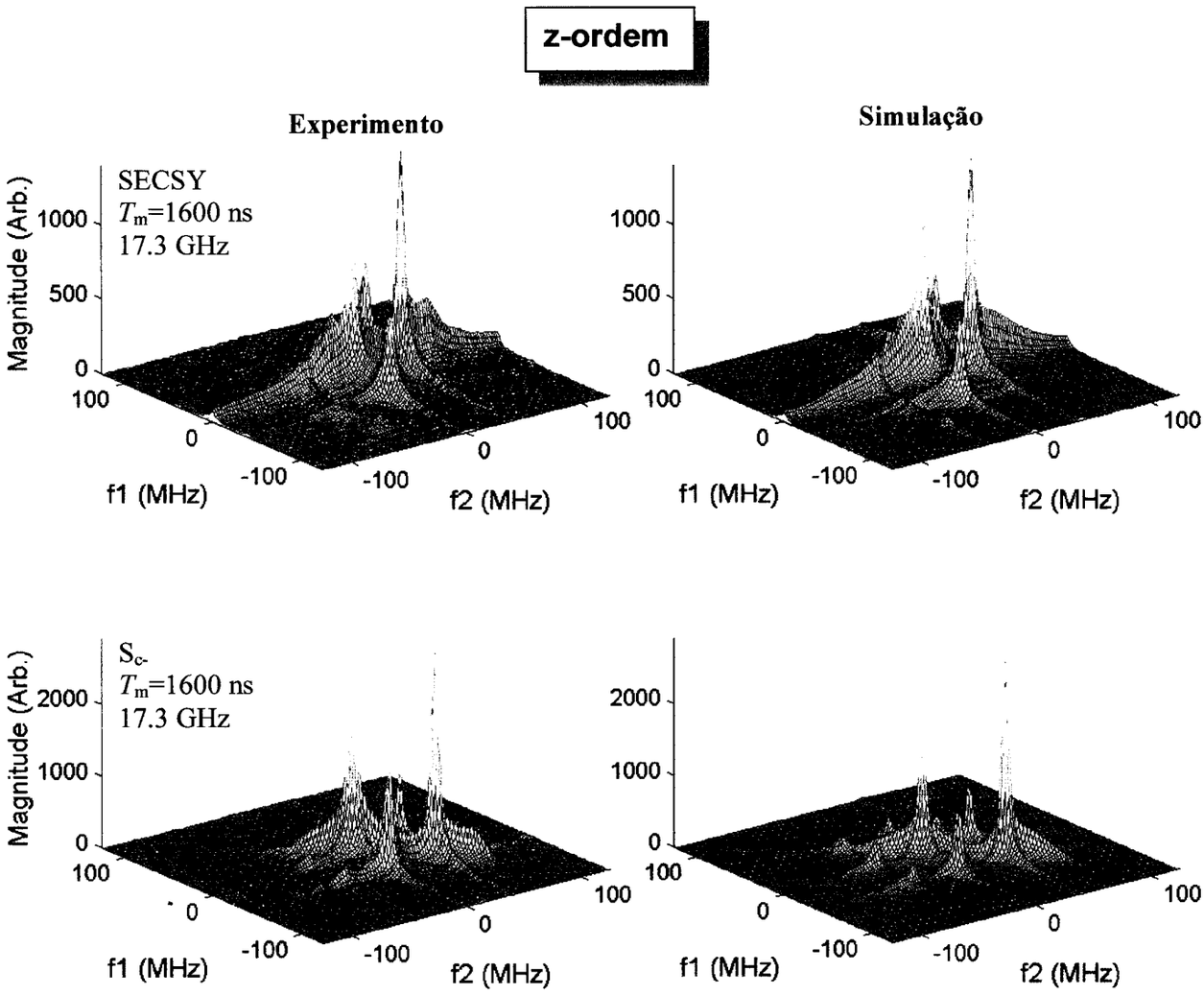


Figura II.3.23: Espectros de 2D-ELDOR do marcador 16-PC e simulações (z-ordem para lipídio "boundary") nos modos SECSY (painéis superiors) e S_{c-} (painéis inferiors) para os lipídios "bulk"e "boundary" em membranas de GA/DPPC (1/1). Somente os espectros correspondetes ao T_m mais longo são mostrados. Dados experimentais estão na coluna da esquerda com suas respectivas simulações à direita.

Tabela II.3.3: Parâmetros obtidos das simulações NLSPMC para lipídios "boundary" e "bulk" em dispersões de GA/DPPC (1/1) a 71°C.

(A) GA – S_{c-} - Ordem negativa (*y*-ordem) para lipídio "boundary":

Lipid	R_x (s^{-1})	R_y (s^{-1})	R_z(s^{-1})	S_{20}	S_{22}	T_2 (s)	Δ_g (Gauss)
Boundary	$0{,}20\times10^9$	$0{,}30\times10^9$	$0{,}11\times10^9$	-0,43	-1,05	$0{,}16\times10^{-6}$	3,8
Bulk	$0{,}73\times10^9$	$0{,}73\times10^9$	$7{,}3\times10^9$	0,06	-0,04	$0{,}45\times10^{-6}$	0,4

Boundary y-ordem: S_{20}= 0,86 e S_{22}=0,002 ⇒ S_x=-0,43 S_y=0,86 S_z=-0,43

(B) GA – S_{c-} - Ordem positiva (*z*-ordem) para lipídio "boundary":

Lipid	R_x (s^{-1})	R_y (s^{-1})	R_z(s^{-1})	S_{20}	S_{22}	T_2 (s)	Δ_g (Gauss)
Boundary	$0{,}37\times10^9$	$0{,}23\times10^9$	$0{,}12\times10^9$	0,73	0,12	$0{,}22\times10^{-6}$	4,1
Bulk	$0{,}67\times10^9$	$0{,}67\times10^9$	$6{,}7\times10^9$	0,06	-0,01	$0{,}31\times10^{-6}$	0,4

Boundary z-ordem: S_x=-0,29 S_y=-0,44 S_z=0,73

(C) GA – Secsy – Ordem negativa (*y*-ordem) para lipídio "boundary":

Lipid	R_x (s^{-1})	R_y (s^{-1})	R_z(s^{-1})	S_{20}	S_{22}	T_2 (s)	Δ_g (Gauss)
Boundary	$0{,}24\times10^9$	$0{,}32\times10^9$	$0{,}06\times10^9$	-0,22	-0,88	$0{,}23\times10^{-6}$	2,9
Bulk	$0{,}62\times10^9$	$0{,}62\times10^9$	$6{,}2\times10^9$	0,04	0,09	$0{,}32\times10^{-6}$	0,3

Boundary y-ordem: S_{20}=0,65 e S_{22}=0,17 ⇒ S_x=-0,22 S_y=0,65 S_z=-0,43

(D) GA – Secsy – Ordem positiva (*z*-ordem) para lipídio "boundary":

Lipid	R_x (s^{-1})	R_y (s^{-1})	R_z(s^{-1})	S_{20}	S_{22}	T_2 (s)	Δ_g (Gauss)
Boundary	$0{,}32\times10^9$	$0{,}23\times10^9$	$0{,}10\times10^9$	0,34	0,28	$0{,}29\times10^{-6}$	2,8
Bulk	$0{,}65\times10^9$	$0{,}65\times10^9$	$6{,}5\times10^9$	0,04	0,07	$0{,}27\times10^{-6}$	0,3

Boundary z-ordem: S_x=0,001 S_y=-0,341 S_z=0,340

Os lipídios "boundary", por sua vez, apresentam movimentos mais lentos, ordenamento muito maior e, consequentemente, maiores alargamentos Δ_g do que os lipídios "bulk" em quaisquer das simulações realizadas (**Tabela II.3.3**). Como dito anteriormente, tais simulações se mostraram muito mais intrincadas do que o esperado, muito provavelmente devido a uma arranjo estrutural complicado do lipídio "boundary".

Como dito anteriormente, parâmetros de ordem negativos como aqueles mostrados na **Tabela II.3.3A** e **C** indicam uma baixa probabilidade do radical nitróxido estar alinhado segundo o sistema de referência usado, ou seja, que há um ordenamento do tipo *x* ou *y*-ordem. Uma transformação de coordenadas como definido por Barnes & Freed (1998), portanto, leva a novos valores para S_0 e S_2 que mostram qual é o eixo de ordenamento correto, nesse caso, um ordenamento tipo *y*-ordem. Além disso, outra maneira conveniente de analisar tais parâmetros de ordem é transformá-los da simetria axial S_0 e S_2 em que são usualmente para coordenadas cartesianas S_x, S_y e S_z, onde:

$$S_x = \frac{1}{2}\sqrt{\frac{3}{2}}S_2 - S_0$$
$$S_y = -\frac{1}{2}\sqrt{\frac{3}{2}}S_2 - S_0$$
$$S_z = S_0$$

Uma análise dos parâmetros S_x, S_y e S_z em cada caso e lembrando que os conjuntos de parâmetros obtidos para os modos S_{c-} e SECSY devem concordar entre si, a menos dos valores de alargamentos, o que serve como uma maneira de escolha do modelo conformacional do lipídio "boundary". As taxas de difusão rotacional estão em excelente acordo quando comparados os resultados para S_{c-} e SECSY em cada conformação possível do lipídio "boundary". Assim, vê-se que é possível ajustar-se os modos S_{c-} e SECSY com um mesmo conjunto de parâmetros se o ordenamento do lipídio "boundary" é feito negativo, uma vez que os valores de $R_\perp$, $R_{//}$, S_x, S_y e S_z estão em excelente acordo entre os modos S_{c-} e SECSY (partes **A** e **C** na citada tabela). O mesmo não é obtido para um

ordenamento positivo (*z*-ordem) convencional para o lipídio "boundary", que em um caso indica um ordenamento grande do tipo z-ordem (**Tabela II.3.3B**-S_{c-}) e no outro indica ainda uma *z*-ordem muito mais baixo e, por conseguinte, com uma conformação desviada de *z*-ordem, possivelmente apontando já para um alinhamento do tipo *x* ou *y*-ordem (**Tabela II.3.3D**-SECSY). Outros dois pontos merecedores de nota se referem à condução do processo de simulação com um ordenamento positivo do lipídio "boundary", durante o qual, por várias vezes, os parâmetros de ordem convergiram para valores negativos e, ainda, que a subtração espectral entre experimento e simulação indica resultados ligeiramente melhores para o caso de *y*-ordem do lipídio "boundary". Com base nesses argumentos, pode-se sugerir que a conformação dos lipídios "boundary" é, muito provavelmente, aquela mostrada como *y*-ordem na **Figura II.3.21**, onde a cadeia acílica tem sua porção terminal curvada e envolvendo a molécula de GA, em uma configuração altamente ordenada como se depreende dos valores bastante altos para S_y na **Tabela II.3.3** e uma mobilidade rotacional caracterizada não mais por uma simetria axial, mas por um movimento completamente anisotrópico (tensor $\boldsymbol{R}$ completamente assimétrico, $R_x \neq R_y \neq R_z$) e mais complicado do que no caso das membranas modelo.

CONCLUSÃO

Com os projetos descritos ao longo da presente tese foi buscada a investigação em nível molecular de alguns sistemas de interesse biofísico através da técnica de Ressonância Paramagnética Eletrônica, que foi usada tanto em seu modo convencional (CW) no estudo da enzima clorocatecol 1,2-dioxigenase (CCD), quanto em seu modo pulsado na análise de problemas diversos ligados à estrutura dinâmica de biomembranas.

Na primeira parte do trabalho foram descritas as características que fazem da enzima clorocatecol 1,2-dioxigenase um sistema interessante a ser estudado e os respectivos resultados obtidos que, além de EPR convencional, também contaram com algumas informações oriundas das técnicas de dicroísmo circular (CD) e absorção ótica.

A enzima clorocatecol 1,2-dioxigenase foi por nós expressa e purificada através de um protocolo desenvolvido por Broderick & O'Halloran (1991) e Araújo *et al.* (2000). As amostras utilizadas envolveram a enzima CCD expressa com um flagelo de seis resíduos de Histidina necessários durante o procedimento de purificação e da enzima CCD clivada (chamada somente de CCD). As medidas de CD da enzima CCD com e sem o flagelo de 6His para várias temperaturas mostraram que a enzima apresenta folhas-β como maior contribuição à sua estrutura secundária

(**Tabela I.3.1**), resultado de acordo com aqueles obtidos por Araújo *et al.* (2000) e Broderick & O'Halloran (1991). Além disso, o enovelamento da CCD mostrou-se bastante estável em um intervalo de temperaturas de 10-40°C, no qual os espectros de CD sofreram poucas alterações. As medidas da atividade específica indicam temperaturas entre 20-25°C como sendo o intervalo em que tais enzimas funcionam com atividade máxima, ressaltando-se apenas que a atividade da enzima CCD é sempre cerca de cinco vezes maior do que aquela medida para a enzima com os resíduos de Histidina (**Figura I.3.6**). Esta diferença em atividade enzimática também foi observada por Araújo *et al.* (2000) em estudos feitos com variação de pH. Os espectros de EPR-CW indicam a presença do íon Fe(III) no sítio ativo de ambas as enzimas com simetria rômbica e estado de spin alto (**Figura I.3.7**, espectro da CCD6His é o mesmo que o da CCD clivada), como esperado para grupamentos não-heme daquele tipo. Este fato sugere que a grande diferença em atividade enzimática seja devida a impedimentos estéricos que impedem o substrato de entrar no bolsão onde está localizado o sítio ativo da enzima.

Com base nas medidas de CD e atividade enzimática por nós realizadas e descritas acima, foi escolhida a temperatura de 25°C para que realizássemos as medidas de EPR, assim como optou-se por trabalhar apenas com a enzima já clivada, visto que este é sua forma natural. Esses experimentos nos permitiram a caracterização completa do sítio ativo da enzima, com a determinação dos valores de g em banda X (g_x=g_y=g_z=4,2935), o que indica um valor de λ=E/D=1/3. Essas linhas são desdobradas em banda Q como visto no detalhe da **Figura I.3.7**, onde é observado um sinal axial com $g_{//}$=4,319 e $g_{\perp}$=4,213, indicando que o valor de λ não é exatamente 1/3. O cálculo dos desdobramentos de campo zero forneceu o valor:

D=(1,3±0,2) cm^{-1}, que está em acordo com valores usuais de D medidos para outras proteínas com Fe(III). A quantificação do número de íon Fe(III) por molécula de CCD forneceu o resultado de apenas um íon por molécula (**Tabela I.3.2**), que apesar de ser uma relação Fe/dímero pouco usual já foi observada em outras enzima tipo catecol dioxigenase (Nakai *et al.*, 1990; Chen & Lovell, 1990). A titulação com o substrato clorocatecol mostrou que o íon ferro passa do estado Fe(III) para Fe(II) durante o processo reacional, o que contradiz a afirmação sobre o mecaniso de reação sugerido por Broderick & O'Halloran (1991), onde o estado de valência do ferro é suposto constante durante a clivagem da molécula de O_2. Medidas cuidadosas com diferentes quantidades de substrato determinaram, através de um gráfico de Scatchard, a existência de um sítio de ligação para o clorocatecol na molécula de CCD, o que corrobora e reforça a existência de um íon Fe(III) por CCD citada acima, com uma constante de afinidade enzima-substrato k=(2,7±0,1)×10^{-6} M.

A segunda parte do projeto envolveu a utilização de um dos desenvolvimentos mais excitantes em termos das chamadas técnicas modernas de EPR, que é a técnica de 2D-ELDOR para o estudo da dinâmica molecular em biomembranas. Dentre as possibilidades de uso de 2D-ELDOR, mostramos no presente trabalho que a investigação de fases lipídicas em membranas e suas mudanças em função de transições de fase e de variações de parâmetros externos é uma das aplicações mais ricas e promissoras de EPR pulsado. Os efeitos da presença de colesterol em membranas modelo é um dos exemplos que enfatizam tais aplicações, onde espectros de 2D-ELDOR por nós mediddos apresentam diferenças marcantes como aquelas na **Figura II.3.1**. O interesse por tal tipo de sistema reside no fato de se saber que a presença de colesterol em concentrações elevadas em

biomembranas leva os lipídios a se organizarem no estado de líquido ordenado ao invés do usual estado de líquido cristalino (para temperaturas acima da transição gel-Lc). O estado de Lo está envolvido em diversos eventos celulares importantes, como o processo de sinalização da superfície celular, o que justifica o interesse por seu entendimento. Caracterizamos em detalhes membranas modelo de DPPC puro e DPPC/Chol (1/1) com os marcadores de spin 16-PC, CSL e DPPTC, que monitoraram diferentes regiões de tais membranas. Também medimos membranas de SM pura e SM/Chol (1/1) com o marcador 16-PC com o objetivo de observar possíveis diferenças nas propriedades do estado de Lo com a mudança do lipídio. A característica dos espectros de 2D-ELDOR que mais enfatiza diferenças entre as fases Lc e Lo é o desenvolvimento dos picos cruzados nos espectros da fase Lc e a sua ausência na fase Lo (desenvolvimento muito mais lento). Este fato permite a determinação da fase em que estão organizados os lipídios na membrana por pura inspeção visual. As simulações através do pacote de programas NLSPMC nos permitiram a quantificação de tais diferenças (**Tabela II.3.1**), de onde se obtém que as membranas em fase Lo têm maior fluidez e ordenamento na região das cadeias lipídicas do que a fase Lc, ao passo que, na região das cabeças polares dos fosfolipídios, a fluidez se mantém alta para a fase Lo, mas a presença das moléculas de colesterol ocasiona o enfraquecimento das interações entre os grupos polares nessa região, levando a uma diminuição dos parâmetros de ordem daí provenientes. A fase Lc apresenta maior mobilidade translacional (refletida no parâmetro ω_{exc}) do que a fase Lo tanto na região das cadeias lipídicas quanto na cabeça polar. Do ponto de vista das simulações, ainda, os lipídios DPPC e SM levam a membranas modelo com características semelhantes (**Tabela II.3.1**). Em seguida, estudamos as variações

das propriedades das fases Lc e Lo como função da temperatura, o que nos permitiu visualizar outro efeito da presença de colesterol na membrana que é a abolição da transição gel para Lc que ocorre em torno de 41°C para o lipídio DPPC. Por fim, em relação a membranas modelo, investigamos por 2D-ELDOR um dos lados do diagrama de fase proposto por Feigenson & Buboltz (2001), onde, a maior contribuição de 2D-ELDOR foi identificar a existência de duas fases diferentes dentro da fase definida como C na **Figura II.3.14**. Além disso, as simulações dos vários espectros medidos em função da concentração de colesterol nos permitiram o acompanhamento detalhado das mudanças estruturais ocorridas naquelas membranas modelo. Uma extensão natural da metodologia desenvolvida acima, é sua aplicação ao estudo de membranas biológicas. Nesse caso, a colaboração com o grupo da Prof(a). B. Baird nos permitiu o uso das chamadas membranas bleb (membrana plasmáticas com receptores para IgE). Através das medidas de 2D-ELDOR foi possível determinarmos a presença de domínios em fase de Lo em tais amostras, caracterizados por parâmetros cujo comportamento em função da temperatura é similar àquele obtido para membranas ricas em colesterol (**Figura II.3.19**). Infelizmente, não foi possível um estudo completo para posterior comparação entre os resultados obtidos com membranas bleb não estimuladas pelo antígeno e aquelas submetidas à presença de IgE.

Finalmente, demonstramos as virtudes de 2D-FT-EPR em estudos sobre o efeito do peptídeo Gramicidina A′ (GA) na dinâmica de membranas modelo. Os avanços tecnológicos recentes nos permitiram, pela primeira vez, a medida via 2D-ELDOR dos chamados lipídios "boundary" nesse tipo de amostra, que, dada a alta resolução e maior sensibilidade ao movimento das técnicas de EPR bidimensional,

fornecem um quantidade de informação muito maior que experimentos de EPR convencional, por exemplo. Mostramos claramente na **Figura II.3.20** que os espectros são constituídos de duas componentes, uma atribuída aos lipídios "bulk" já vista anteriormente por Patyal *et al.* (1997), e a outra correspondente aos lipídios "boundary". A presença de moléculas de GA não muda drasticamente as propriedades de mobilidade e ordem que seriam esperadas da membrana contendo apenas o lipídio "bulk", ou seja, mobilidade alta e baixo ordenamento das cadeias. Já espectros dos lipídios "boundary" apresentam características de um lipídio que, como esperado, se reorienta mais lentamente. As simulações de tais espectros, onde pela primeira vez usamos duas componentes em 2D-ELDOR e também os dados experimentais em modo SECSY ("spin-echo"), apontam para uma conformação dobrada (y-ordem ou ordem negativa) no final da cadeia acílicas dos lipídios "boundary", possivelmente oriunda do "mismatch" hidrofóbico causado pelas moléculas de GA (**Tabela II.3.3**). Além disso, se percebe que os lipídios "bulk" não são afetados pelo modelo escolhido para a simulação da componente "boundary".

Proposta para Trabalhos Futuros

Como é usual, ao final de um trabalho de tese, sempre há indicações de caminhos a serem seguidos para a continuação e finalização completa dos projetos desenvolvidos. Aqui isto não é diferente e podem ser colocados como aspectos interessantes a serem investigados, os seguinte:

(1) em relação à enzima clorocatecol 1,2-dioxigenase, o estudo detalhado do processo reacional na ausência de oxigênio, na tentativa de confirmar

modelos dessa reação disponíveis na literatura ou de estabelecer um outro condizente com nossas observações. Além disso, o uso de técnicas de EPR pulsado (ESEEM, em particualr) também ajudará na determinação de ligantes do íon Fe(III) durante tal processo reacional.

(2) em relação estudo de biomembranas, as possibilidades são enormes e envolvem a participação do grupo de Biofísica do IFSC-USP e do "Advanced Center for ESR Technology" da Universidade Cornell. Algumas delas podem ser facilmente citadas: o estabelecimento do diagrama de fase para misturas de DPPC/DLPC/Chol por EPR-CW segundo sugerido pelo Prof. G. Feigenson, ou seja, envolvendo medidas rápidas de EPR-CW com amostras varrendo todo o diagrama e, posteriormente, a escolha de outras regiões interessantes para o uso de 2D-ELDOR (como por exemplo, a posição no meio do diagrama, onde se passa por várias fases lipídicas); o estudo de membranas ternárias de DPPC/SM/Chol na tentativa de testar a afinidade diferenciada de colesterol por diferentes lipídios é também um objetivo factível; estudo de interações GA-lipídios agora com diferentes concentrações de GA e outras temperaturas, com o objetivo de entender o processo de formação da fase H_{II} induzida pela presença de GA.

Referências Bibliográficas

Abragam, A. (1960). *Principles of Nuclear Magnetism*, Oxford University Press, p. 333.

Altenbach, C.; S. L. Flitsch; H. G. Khorana; W. L. Hubbell. (1989). *Biochemistry* **28**, 7806.

Araújo, A. P. U.; G. Oliva; F. Henrique-Silva; R. C. Garratt; O. Cáceres; L. M. Beltramini. (2000). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **272**, 480.

Atherton, N. M. (1993). *Principles of Electron Spin Resonance*, Ellis Horwood and Prentice Hall, p. 482-483.

Barnes, J. F. & J. H. Freed. (1998). *Biophys. J.* **75**, 2532.

Berliner, L. J. (Ed.): B*iological Magnetic Resonance*, Plenum, New York, vols. 1-19.

Bhat, M. *et al.* (1993). *Arch. Biochem. Biophys.* **300**, 738.

Bloch, K. (1995). Cholesterol: evolution of the structure and function. *In Biochemistry of Lipid and Membranes*, D. E. Vance ad J. E. Vance (Eds). Benjamin/Cummings Publishing Co, Inc. Menlo Park, CA. 24.

Bloom, M.; E. Evans; O. G. Morritsen. (1991). *Q. Rev. Biophys.* **24**, 293.

Blumberg, W. E. & J. Peisach. (1973). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **222**, 539.

Borbat, P. P.; A. J. Costa-Filho; K. A. Earle; J. Moscicki; J. H. Freed. (2001). *Science* **291**, 266.

Borbat, P. P.; R. H. Crepeau; J. H. Freed. (1997). *J. Magn. Reson.* **127**, 155.

Bradford, M. M. (1976). *Analyt. Bochem.* **72**, 248.

Broderick, J. B. & T. V. O'Halloran. (1991). *Biochemistry* **30**, 7349.

Brown, D. A. & E. London. (1997). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **240**, 1.

Brown, D. A. & E. London. (1998). *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14**, 111.

Brown, D. A. & J. K. Rose. (1992). *Cell* **68**, 533.

Budil, D. E.; K. A. Earle; W. B. Lynch; J. H. Freed. (1989) em: *Advanced EPR Applications inBiology and Biochemistry*, A. Hoff (Ed.), Elsevier, Amsterdam, pp.307-340.

Budil, D. E.; S. Lee; S. Saxena; J. H. Freed. (1996). *J. Magn. Reson.* A**120**, 155.

Campbell, I. D. & R. A. Dwek. (1984). *Biological Spectroscopy*, Menlo Park, Benjamin, Cummings.

Cantor, R. C. & P. R. Schimmel. (1980). *Biophysical Chemistry – Part III: The behavior of biological macromolecules*, W. H. Freeman and Company, Nova Iorque, p. 849.

Castner, T., Jr.; G. S. Newell; W. C. Holton.; C. P. Slichter. (1960). *J. Chem. Phys.* **32**, 668.

Chen, Y. P. & C. R. Lovell. (1990). *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1971.

Costa-Filho, A.J.; Borbat, P. P.; Freed, J.H. "Lipid-Gramicidin A interactions: Boundary vs Bulk Lipis by 2D-ELDOR". (em preparação).

Costa-Filho, A.J.; Freed, J.H. "DPPC/Chol phase diagram: A 2D-ELDOR Study". (em preparação).

Costa-Filho, A. J.; Shimoyama, Y.; J. H. Freed. "A Dynamic Measure of Liquid-Ordered Phase – Disappearance of Cross-Peaks in 2D-ELDOR Spectroscopy" (em preparação).

Crepeau, R. H.; S. Saxena; S. Lee; B. Patyal; J. H. Freed. (1994). *Biophys. J.* **66**, 1489.

D'Argenio, D. A.; M. W. Vetting; D. H. Ohlendorf; L. N. Ornston. (1999). *J. Bacteriol.* **181**, 6478.

de Kruijf, B.; P. R. Cullis; A. J. Verkleij; M. J. Hope; C. J. A. Van Echteld; T. F. Taraschi; P. Van Hoogevest; J. A. Killian; A. Rietveld; A. T. M. Van Der Steen. (1985). *In Progress in protein-lipid interactions*, Vol. 1. A. Watts and J.J.H.H.M. De Pont (Eds.), Elsevier Scientific Publishers, Amsterdam.

Deligiannakis, Y.; A. Boussac; H. Bottin; V. Perrier; O. Bârzu; A. M. Gilles. (1997). *Biochemistry* **36**, 9446.

Don, R. H; A. J. Weightman.; H. J. Knackmuss; K. N. Timmis. (1985). *J. Bacteriol.* **161**, 85.

Fasman, G. D. (1996). *Circular Dichroism*; Plenum Press, Nova Iorque.

Ferrarini, A.; P. L. Nordio; G. T. Moro; R. H. Crepeau; J. H. Freed. (1989). *J. Chem. Phys.* **91**, 5707.

Field, K. A.; D. Holowka; B. Baird. (1995). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 9201.

Field, K. A.; D. Holowka; B. Baird. (1997). *J. Biol. Chem.* **272**, 4280.

Freed, J. H. (1967). *J. Phys. Chem.* **71**, 38.

Freed, J.H. (1987). Molecular rotational dynamics in isotropic and oriented fluids studied by ESR. *Em Roational Dynamics of Small and Macromolecules in Liquids*. T. Dorfmuller and R. Pecora (Eds.). Springer-Verlag, Germany 89-142.

Freed, J. H. (2000). *Annu. Rev. Phys. Chem.* **51**, 655.

Gaffney, B. & H. J. Silverstone. (1993). *Biological Magnetic Resonance*, Plenum Press, Nova Iorque, p. 1.

Gamliel, D. & J. H. Freed. (1990). *J. Magn. Reson.* **89**, 60.

Ge, M. & J. H. Freed. (1993). *Biophys. J.* **65**, 2106.

Ge, M. & J. H. Freed. (1999). *Biophys. J.* **76**, 264.

Ge, M.; K. A. Field; R. Aneja; D. Holowka; B. Baird; J. H. Freed. (1999). *Biophys. J.* **77**, 925.

Gorcester, J. & J. H. Freed. (1988). *J. Chem. Phys.* **88**, 4678.

Gorcester, J.; G. L. Millhauser; J. H. Freed. (1990). Two-Dimensional Electron Spin Resonance. *In Modern Pulsed and Continuous Wave Electron Spin Resonance*, L. Kevan and M. Bowman (Eds). Wiley, New York. 119-194.

Greenfield, N. J. (1996). *Anal. Biochem.* **265**, 1.

Han, S.; L. D. Eltis; K. N. Timmis; S. W. Muchmore; J. T. Bolin. (1995). *Science* **270**, 976.

Haynie, D. T. (2001). *Biological Thermodynamics*, Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Hoff, A. J. (Ed.) (1989). *Advanced EPR: Applications in Biology and Biochemistry*, Elsevier, Amsterdam.

Hoffman, B. M.; C. E. Davoust; P. E. Doan. (1996). *J. Magn. Res. A* **119**, 38.

Holowka, D. & B. Baird. (1996). *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **25**, 79.

Hoult, D. I. & R. E. Richards. (1975). *Proc. R. Soc. London Ser. A* **344**, 311.

Hubbell, W. L.; H. M. McConnell. (1971). *J. Am. Chem. Soc.* **93**, 314.

Hubell, W. L.; A. Gross; R. Langen; M. A. Lietzow. (1998). *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 649.

Hubbell, W. L.; D. S. Cafiso; C. Altenbach. (2000). *Nat. Struct. Biol.* **7**, 735.

Ingram, D. J. E. (1955). *Spectroscopy at radio and microwave frequencies*, Butterworths Scientific Publications, Londres, p.169.

Ipsen, J. H.; G. Karlstrom; O. G. Mouritsen; H. Wennerstrom; M. J. Zuckermann. (1987). *Biochim. Biophys. Acta.* **905**, 162.

Jeener, J.; B. H. Meier; P. Bachmann; R. R. Ernst. (1979). *J. Chem. Phys.* **71**, 4546.

Jeschke, G.; & A. Schweiger. (1996). *Mol. Phys.* **88**, 355.

Jost, P. C.; O. H. Griffith; R. A. Capaldi; G. A. Vanderkooi. (1973). *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* **70**, 480.

Kar, L.; E. Ney-Igner; J. H. Freed. (1985). *Biophys. J.* **48**, 569.

Kevan, L. & R. N. Schwartz. (Eds.) (1979), *Time-domain Electron Spin Resonance*, Wiley, New York.

Kevan, L. & M. K. Bowman. (Eds.) (1990). *Modern Pulsed and Continuous Wave ESR*, Wiley, New York.

Killian, J. A. (1992). *Biochim. Biophys. Acta.* **1113**, 391.

Kita, A.; S. Kita; I. Fujigawa; K. Inaka; T. Ishida; K. Horiike; M. Nozaki; K. Miki. (1999). *Structure* **7**, 25.

Lee, S.; B. D. Patyal; J. H. Freed. (1993). *J. Chem. Phys.* **98**, 3665.

Lee, S.; D. E. Budil; J. H. Freed. (1994). *J. Chem. Phys.* **99**, 7098.

Macura, S. & R. R. Ernst. (1980). *Mol. Phys.* **41**, 95.

Marsh, D. (1985). ESR probes for structure and dynamics of membranes. *In Spectroscopy and Dynamics of Molecular and Biological Systems*. P. M. Bayley and R. E. Dale (Eds). Academic Press, London. 209-238.

Meirovitch, E.; A. Nayeem; J. H. Freed. (1984). *J. Phys. Chem.* **88,** 3454.

Mims, W. B.; K. Nassau; J. D. McGee. (1961). *Phys. Rev.* **123**, 2059.

Mims, W. B. & J. Peisach. (1989) em: *Advanced EPR: Applications in Biology and Biochemistry*, A. J. Hoff (Ed.), Elsevier, Amsterdam, pp. 1-57.

Mouritsen, O. G. (1986). Physics of biological membranes. *In Physics in Living Matter*. D. Baeriswyl, M. Droz, A. Malaspinas, and P. Martinolli (eds.), Springer-Verlag, Berlin.

Nakai, C.; K. Horiike; S. Kuramitsu; H. Kagamiyama; M. Nozaki. (1990). *J. Biol. Chem.* **265**, 660.

Nakai, C.; T. Nakazawa; M. Nozaki. (1988). *Arch. Biochem. Biophys.* **267**, 701.

Nakanishi, K.; N. Berova; R. W. Woody. (1994) *Circular Dichroism- Principles and Applications*; VCH Publishers, Inc., Nova Iorque.

Nakazawa, T. & A. Nakazawa. (1970). *Methos Enzimology* 17A, Academic Press Inc., New York.

Neilson, J. W.; K. L. Josephson; S. D. Pillai; I. L. Pepper. (1992). *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 1271.

Nozaki, M.; S. Kotan; K. Ono; S. Senoh. (1970). *Biochem. Biophys. Acta* **220**,hh 213.

Ohlendorf, D. H.; J. D. Lipscomb; P. C. Weber. (1988). *Nature* **336**, 403.

Ohlendorf, D. H.; A. M. Orville; J. D. Lipscomb. (1994). *J. Mol. Biol.* **244**, 586.

Patyal, B. R.; R. H. Crepeau; D. Gamliel; J. H. Freed. (1990). *Chem. Phys. Letts.* **175,** 453.

Patyal, B. R.; R. H. Crepeau; J. H. Freed. (1997). *Biophys. J.* **73,** 2201.

Peisach, J.; W. E. Blumberg; E. T. Lode. (1971). *J. Biol. Chem.* **246**, 5877.

Perkins, E.J.; M. P. Gordon; O. Caceres; P. F. Lurquin. (1990). *J. Bacteriol.* **172**, 2351.

Pinkowitz, R. A. & P. J. Aisen. (1972). *J. Biol. Chem.* **247**, 7830.

Que, L., Jr.; J. D. Lipscomb; R. Zimmermann; E. Munck; N. R. Orme-Johnson; W. H. Orme-Johnson. (1976). *Biochim. Biophys. Acta* **452**, 320.

Que, L., Jr.; J. D. Lipscomb; E. Munck; J. M. Wood. (1977). *Biochim. Biophys. Acta* **485**, 60.

Riske, K. A.; M. J. Politi; W. F. Reed; M. T. Lamy-Freund. (1997). *Chem. Phys. Lipids* **89**, 31.

Salikhov, K. M. & Y. D. Tsvetkov. (1979) em: *Time-domain Electron Spin Resonance*, L. Kevan, R.N. Schwartz (Eds.), Wiley, New York, pp.231-277.

Schweiger, A. (1993). *Appl. Mag. Res.* **5**, 229.

Schneider, D. J. & J. H. Freed. (1989). Calculating slow motional magnetic resonance spectra: a user's guide. *In Biological Magnetic Resonance*. Vol 8. L. J. Berliner and J. Reuben (Eds). Plenum Publishing Corp., New York. 1-76.

Senda, T.; K. Sugiyama; H. Narita; T. Yamamoto; K. Kimbara; M. Fukuda; M. Sato; K. Yano; Y. Mitsui. (1996). *J. Mol. Biol.* **255**, 735.

Simons, K. & E. Ikonen. (1997). *Nature*. **387**, 569.

Siu, D. C.; A. M. Orville; J. D. Lipscomb; D. H. Ohlendorf; L. Que, Jr. (1992). *Biochemistry* **31**, 10443.

Slichter, C. P. (1990). *Principles of Magnetic Resonance*, Springer-Verlag, Alemanha.

Sugimoto, K.; T. Senda; H. Aoshima; E. Masai; M. Fukuda; Y. Mitsui. (1999). *Structure* **7**, 953.

Tanaka, H. & J. H. Freed. (1985). *J. Phys. Chem.* **89**, 350.

Thomann, H. & M. Bernardo. (1990). *Chem. Phys. Lett.* **169**, 5.

Toumadje, A.; S. W. Alcorn; W. C. Johnson. (1992). *Anal. Biochem.* **200**, 321

True, A. E.; A. M. Orville; L. L. Pearce; J. D. Lipscomb; L. Que, Jr. (1990). *Biochemistry* **29**, 10847.

Valliancourt, F. H.; S. Han; P. D. Fortin; J. T. Bolin; L. D. Eltis. (1998). *J. Biol. Chem.* **273**, 34887.

Vetting, M. W.; C. A. Earhart; D. H. Ohlendorf. (1994). *J. Mol. Biol.* **236**, 372.

Vetting, M. W. & D. H. Ohlendorf. (2000). *Structure* **8**, 429.

Vist, M. R. & J. Davis. (1990). *Biochemistry*. **29**, 451.

Walsh, T. A. & D. P. Ballou. (1983). *J. Biol. Chem.* **258**, 14413.

Watts, A. & J.J.H.H.M. De Pont (Eds.). 1986. Progress in Protein-Lipid Interactions. Vols1-2. Elsevier Scientific Publishers, Amsterdam.

Whittaker, J. W. & J. D. Lipscomb. (1984). *J. Biol. Chem.* **259**, 4476.

Wickman, H. H.; M. P. Klein; D. A. Shirley. (1965). *J. Chem. Phys.* **42**, 2113.

Wiler, M.; J. Granwehr; J. Forrer; A. Schweiger. (1998). *J. Magn. Res.* **133**, 46.