

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

Daniel Ferreira Silva

**Correlação estrutura-função da proteína ligante de ácidos graxos de
cérebro humano (B-FABP)**

São Carlos

2010

Daniel Ferreira Silva

**Correlação estrutura-função da proteína ligante de ácidos graxos de
cérebro humano (B-FABP)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Física de São Carlos, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciência.

Área de concentração: Física Aplicada.
Opção: Física Biomolecular.
Orientador: Prof. Dr. Antonio José da Costa Filho

São Carlos

2010

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação IFSC/USP

Silva, Daniel Ferreira

Correlação estrutura-função da proteína ligante de ácidos graxos de cérebro humano (B-FABP)./ Daniel Ferreira Silva;orientador Antonio José da Costa Filho.-- São Carlos, 2010.
169p.

Tese (Doutorado em Ciência - Área de concentração: Física Aplicada - Opção; Biomolecular) – Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo.

1. Interação proteína membrana. 2. Ressonância magnética do elétron. 3. Bicela isotrópica . 4. Vesícula. 5. Ressonância magnética nuclear. I. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Daniel Ferreira Silva

Tese apresentada ao Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Física Aplicada –
Opção: Física Biomolecular.

Aprovado(a) em: 22.11.2010

Comissão Julgadora

Prof(a). Dr(a). Antonio José da Costa Filho

Instituição: IFSC/USP

Assinatura



Prof(a). Dr(a). Eduardo Maffud Cilli

Instituição: UNESP

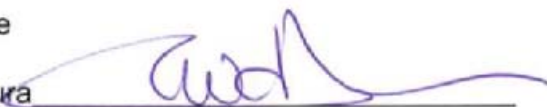
Assinatura



Prof(a). Dr(a). Claudia Elisabeth Munte

Instituição: IFSC/USP

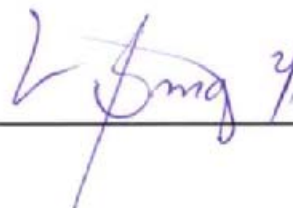
Assinatura



Prof(a). Dr(a). Alviclér Magalhães

Instituição: UNICAMP


Assinatura



Prof(a). Dr(a). Valmir Fadel

Instituição: UNESP

Assinatura



Dedicatória

À minha família, por ter sempre me incentivado e apoiado

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Joselirido e Janete, e aos meus irmãos Lucas e Thiago, pelo carinho, compreensão, paciência e apoio sempre presente. A Lourdes, pela sua dedicação durante todos esses anos.

A minha tia Carlota pela descontração, apoio, força e presença.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antônio José da Costa Filho, o Jabah, pela dedicação, amizade, paciência, alegria, companheirismo, inspiração, dedicação e que muito me motivou para realizar este projeto.

A colaboradora e amiga Profa. Dra. Cláudia Munte, por ter aceitado participar deste projeto. E ao Yonnes, companheiro no além mar.

Ao Prof. Dr. Hans Robert Kalbitzer, da Universidade de Regensburg, Alemanha, por ter apoiado este projeto

A Andressa, Bel, Fernando, Possato e Ester, solidários em vários momentos.

Ao jovem Ítalo Augusto Cavini, pela garra e vontade na participação deste projeto.

Aos amigos do grupo de Biofísica, que participaram e se fizeram presentes nesta jornada.

A Marisa Barbosa Aguiar e André Nashimura pelo apoio e companhia.

A toda assistência, sugestões, e críticas construtivas de profissionais talentosos e inteligentes da Universidade de São Paulo. Eu sou muito grato em compartilhar com todos eles essas experiências durante minha passagem pela USP.

A Iomar Barbosa Zaia, pela sua serenidade neste momento.

Epígrafe

“O que eu faço, é uma gota no meio de um oceano.

Mas sem ela, o oceano será menor.”

Madre Tereza de Calcutá

“O que sabemos é uma gota; o que ignoramos é um oceano.”

Isaac Newton

RESUMO

Silva, D. F. **Correlação estrutura-função da proteína ligante de ácidos graxos de cérebro humano (B-FABP)**. 2010. 169p. Tese (Doutorado) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Ácidos graxos são moléculas hidrofóbicas essenciais para a composição da estrutura física celular, para o metabolismo energético dos seres vivos e também para os caminhos de sinalização molecular no proteoma celular. No caso de deficiência no ácido graxo docosahexaenóico (*DHA*) e do ácido *eicosapentaenóico* (*EPA*) temos a depressão e a mudança do comportamento. O transporte destas moléculas hidrofóbicas no citosol celular é realizado por uma família de proteínas capazes de se ligar a esses ácidos graxos de maneira seletiva, com alta afinidade e de forma reversível. Esta família de proteína é conhecida como FABP, ou proteínas ligantes de ácido graxo. Para realizar esta função, as FABP possuem características únicas tanto na sua estrutura tridimensional quanto na dinâmica experimentada pelos vários elementos estruturais. Diversos trabalhos identificaram regiões relevantes e, com mutações realizadas em resíduos específicos, caracterizaram o mecanismo como a proteína interage com ligantes e com a bicamada lipídica para a realização da sua função, identificando um processo multi-estágio na interação com a bicamada lipídica. Contudo, a não realização de mutações em todos os resíduos da proteína pode deixar não-identificados regiões ou resíduos da proteína também envolvidos na sua função. Além disso, nunca foi caracterizado o que ocorre com os resíduos e com a estrutura da FABP quando a proteína está complexada com uma bicamada lipídica. No presente trabalho, escolhemos a B-FABP para estudar a interação com ligantes e o complexo proteína-membrana desta família de proteínas. Para isto, as técnicas de ressonância magnética nuclear ^{15}N -HSQC e eletrônica (RMN e RPE) foram utilizadas para acompanhar mudanças estruturais e dinâmicas ocorridas quanto de interações moleculares. Com a técnica de RPE e o uso de derivados de ácidos graxos marcados com radicais nitróxidos, monitoramos o sítio de ligação da molécula de ácido graxo e suas alterações quando na presença do surfactante SDS. No caso de RMN, foi usada em proteínas marcadas isotopicamente com ^{15}N na presença de bicelas isotrópicas de DMPC: DHPC na razão igual a um ($q = 1$), em uma concentração lipídica (C_L) de 4%. Nossos resultados além de identificar os mesmos resíduos já conhecidos na interação da FABP com modelos de membrana, também encontrou novos resíduos nunca antes associados à superfície de contato da FABP com a bicamada lipídica.

Palavras-chave: Interação proteína membrana. Ressonância magnética do elétron. Bicela isotrópica. Vesícula. Ressonância magnética nuclear.

ABSTRACT

Silva, D. F. **Structure-function correlation in the Fatty Acid Binding Protein from Human Brain (B-FABP)**. 2010. 169p. Tese (Doutorado) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Fatty acids are hydrophobic molecules essential to the cell structure, to the energetic metabolism of living organisms and to the molecular signaling pathways in the cell proteome. Depression and behavior alterations are two common consequences of deficiencies in docosahexanoic (DHA) and eicosapentaenoic (EPA) acids. The transport of such hydrophobic molecules in the cytosol is the main function of a family of proteins capable of making a selective, high affinity, and reversible binding of fatty acids. This family of proteins is known as FABPs (fatty acid binding proteins). To perform their function, FABPs have unique features in both their tridimensional structure and in the dynamics experienced by the several structural elements. Many reports have identified regions that are relevant to function and, through point mutations of specific residues, have characterized the mechanism used by the protein to bind its ligand and also to interact with lipid bilayers. However, the point mutation strategy relies heavily on the choice of residues such that missing residues can lead to the lack of identification of important elements involved in protein function. Moreover, the characterization of the protein-bilayer complex still deserves a more detailed investigation. In this work, we study the B-FABP protein in terms of its interaction with ligands as well as a membrane model system. We made use of magnetic resonance techniques, nuclear (NMR) and electronic (EPR), to probe structural and dynamical changes occurring upon intermolecular interaction. EPR and spin labeled fatty acids allowed us to monitor the ligand binding site in the protein structure and also its alterations in the presence of the surfactant SDS. NMR HSQC was used to gain information on the conformational changes of isotopically labeled protein in the presence of bicelles made of DMPC:DHPC ($q = 1$ and lipid concentration C_L of 4%). Our results confirmed relevant functional residues that had been previously identified and also pointed to new residues that had not been implicated as part of the contact surface before, thus widening our understanding of FABP-bilayer interaction.

Keywords: Membrane protein interaction. Electron magnetic resonance. Isotropic bicelle. Vesicles. Nuclear magnetic resonance.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** - MODELO DE ÁCIDO GRAXO LÁURICO, COMPOSTO DE 12 CARBONOS. EM VERMELHO TEMOS O ÂNGULO DA LIGAÇÃO ENTRE OS ÁTOMOS DE CARBONO. FIGURA ADAPTADA DE <WWW.BMRB.WISC.EDU/METABOLOMICS/MOL_SUMMARY/?MOLNAME=DO_DECANOIC_ACID> **38**
- FIGURA 2** - REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DOS ÁCIDOS GRAXOS NA FORMA TRANS (À ESQUERDA) E CIS (À DIREITA). ADAPTADO DA REFERÊNCIA WWW.WORLDOFMOLECULES.COM..... **399**
- FIGURA 3** - ESQUEMA DA MOLÉCULA DE DMPC (DIMERISTOIL FOSFATIDIL COLINA). PODEMOS NOTAR A INCLINAÇÃO DA CADEIA ACIL. DIFERENÇAS DE δ E Σ CONTRIBUI PARA A ESTRUTURA MOLECULAR ADOTADA PELA BICAMADA. EXTRAÍDO DE BIOMEMBRANES: MOLECULAR STRUCTURE AND FUNCTION (12) **41**
- FIGURA 4** - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA FASE LIPÍDEO-ÁGUA: A) GEL LAMELAR; B) LÍQUIDO CRISTALINO LAMELAR; C) HEXAGONAL TIPO II; D) HEXAGONAL TIPO I. "D", "D_L", "D_W" E "A" SÃO DIMENSÕES QUE CARACTERIZAM CADA UMA DESSAS FASES. FIGURA ADAPTADA (10). **43**
- FIGURA 5** - REPRESENTAÇÃO DA FORMA DE UMA BICELA COMPOSTA DE DHPC E DMPC. O DHPC, DE CADEIA CURTA, CONCENTRA-SE NA EXTREMIDADE DO DISCO. O DMPC, DE CADEIA LONGA, CONCENTRA-SE NA SUPERFÍCIE PLANA DO DISCO. ADAPTADO DE <[HTTP://WWW.CHEM.SCI.OSAKA-U.AC.JP/LAB/MURATA/RESEARCH/INDEX2.HTM](http://WWW.CHEM.SCI.OSAKA-U.AC.JP/LAB/MURATA/RESEARCH/INDEX2.HTM)> **45**
- FIGURA 6** - MODELO HIPOTÉTICO DE UMA PARTÍCULA LIPÍDICA COMO UMA MICELA INVERTIDA. FIGURA ADAPTADA DA REFERÊNCIA (24) **46**
- FIGURA 7** - MODELO DAS FASES ESTRUTURAIS VISTAS EM MISTURAS DE DMPC/DHPC. A CABEÇA DO DHPC É REPRESENTADA POR CÍRCULOS PREENCHIDOS. EM D TEMOS A FASE DE BICELA. FIGURA ADAPTADA DA REFERÊNCIA (25). **48**
- FIGURA 8** - OS MECANISMOS DE LIGAÇÃO MAIS COMUNS DE PROTEÍNAS PERIFÉRICAS DE MEMBRANA COM A BICAMADA LIPÍDICA. DA ESQUERDA PARA A DIREITA: A) LIGAÇÃO PROTEÍNA-PROTEÍNA, B) ELETROSTÁTICA, C) HÉLICE ANFIPÁTICA, D) HÉLICE TERMINAL E E) ÂNCORA LIPÍDICA. FIGURA ADAPTADA DA REFERÊNCIA (10). **51**
- FIGURA 9** - ESTRUTURA DE MEMBROS TÍPICOS DA SUPERFAMÍLIA DAS LIPOCAINAS. À ESQUERDA, TEMOS A PROTEÍNA LIGADORA DO ÁCIDO GRAXO COMO AS FABPS. O TRACEJADO AZUL INDICA QUE A PROTEÍNA ESTÁ VOLTADA PARA O CITOSOL. À DIREITA, TEMOS A PROTEÍNA LIGADORA DE ÁCIDO RETINOL, COMO AS RBPS. O TRACEJADO VERMELHO INDICA QUE A PROTEÍNA ESTÁ VOLTADA PARA O MEIO EXTRACELULAR. EM ROXO, O ÁCIDO GRAXO LIGADO NA PROTEÍNA. EXTRAÍDO DO SITE <[HTTP://OPM.PHAR.UMICH.EDU](http://OPM.PHAR.UMICH.EDU)> **52**
- FIGURA 10** - REPRESENTAÇÃO DOS DOIS MECANISMOS DISTINTOS UTILIZADOS PELAS LIPOCALINAS PARA A ENTREGA DO LIGANTE PARA UMA VESÍCULA. A CIMA, O MECANISMO DE TRANSFERÊNCIA DIFUSIONAL. ABAIXO, O

MECANISMO DE TRANSFERÊNCIA COLISIONAL. ADAPTADO DA REFERÊNCIA (33).....54

FIGURA 11 - REPRESENTAÇÃO DO ESQUEMA TOPOLÓGICO DE UMA FABP. AS DUAS FOLHAS- β FORMADAS PELAS FITAS- β ABCD E EFGHIJ FECHAM-SE FORMANDO UM BARRIL- β . A AUSÊNCIA DE LINHAS PONTILHADAS ENTRE AS FITAS- β D E E REPRESENTA A AUSÊNCIA DAS LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO PARA ESSAS FITAS. ADAPTADO DA REFERÊNCIA (30).....56

FIGURA 12 - SÍTIO ATIVO DO ÁCIDO OLÉICO (FIGURA DA ESQUERDA) E DO DHA (FIGURA DA DIREITA) NA B-FABP. EM DESTAQUE, OS RESÍDUOS QUE PARTICIPAM DA ACOMODAÇÃO DO ÁCIDO GRAXO NO SÍTIO ATIVO DA PROTEÍNA. ADAPTADO DA REFERÊNCIA (50).61

FIGURA 13 - SEQUÊNCIA DAS PROTEÍNAS HUMANAS H-FABP, B-FABP E I-FABP. EM VERMELHO, TEMOS AS REGIÕES BEM CONSERVADAS. EM AZUL, TEMOS AS REGIÕES POUCO CONSERVADAS. EM PRETO, TEMOS AS REGIÕES NÃO CONSERVADAS. OS SÍMBOLO %, !, \$ E # SÃO USADOS PARA UMA CONSERVAÇÃO DOS RESÍDUOS F OU Y (%), I OU V (!), L OU M (\$) E N, D, Q E E (#). ALINHAMENTO USANDO MULTALIN <[HTTP://MULTALIN.TOULOUSE.INRA.FR/MULTALIN/MULTALIN.HTML](http://MULTALIN.TOULOUSE.INRA.FR/MULTALIN/MULTALIN.HTML)>.....62

FIGURA 14 - ESQUEMA MOSTRANDO A CONSTRUÇÃO DA SEGUNDA DIMENSÃO, COM A INCLUSÃO DO TEMPO DE EVOLUÇÃO T_1 E DO PERÍODO DE MISTURA. EXTRAÍDO DE <[HTTP://NOBELPRIZE.ORG/NOBEL_PRIZES/CHEMISTRY/LAUREATES/1991/ERNST-LECTURE.HTML](http://NOBELPRIZE.ORG/NOBEL_PRIZES/CHEMISTRY/LAUREATES/1991/ERNST-LECTURE.HTML)>77

FIGURA 15 - RESULTADOS DO TESTE DE EXPRESSÃO DA B-FABP VISUALIZADOS EM GEL DE ELETROFORESE SDS-PAGE COM: (A) QUANTIDADE DE AÇÚCAR RECOMENDADA E (B) DUAS VEZES ESTA QUANTIDADE. NA COLUNA 1 TEMOS O MARCADOR DE MASSA (MWM) EXTERNO. NAS COLUNAS 2 E 8, A CULTURA NÃO INDUZIDA COM IPTG. NAS COLUNAS 3 E 9, TEMOS O RESULTADO PARA 6H DE EXPRESSÃO APÓS INDUÇÃO. NAS COLUNAS 4 E 10, 24H DE EXPRESSÃO. PARA AS COLUNAS 2,3 E 4 A EXPRESSÃO FOI REALIZADA A 22° C. NAS COLUNAS 8,9 E 10 A EXPRESSÃO FOI A 37° C. A COLUNA 7 NÃO FOI USADA. NAS COLUNAS 5 E 11 TEMOS O SOBRENADANTE DO MEIO DE CULTURA. NAS COLUNAS 6 E 12 TEMOS OS PELLETES.....83

FIGURA 16 - RESULTADO DA PURIFICAÇÃO DA B-FABP HUMANA. NA COLUNA 1, TEMOS O MARCADOR DE MASSA MOLECULAR (MWM). NA COLUNA 2, TEMOS O PERFIL DE MIGRAÇÃO ELETROFORÉTICA DAS CÉLULAS NA AUSÊNCIA DO MEIO INDUTOR. NA COLUNA 3, TEMOS O PERFIL PARA AS CÉLULAS APÓS 3:30H. NA COLUNA 4, O MEIO CELULAR INDUZIDO APÓS 16H. NA COLUNA 5, É MOSTRADO O PERFIL DE MIGRAÇÃO DO SOBRENADANTE DAS CÉLULAS LISADAS E SUBMETIDAS A INDUÇÃO POR 16H. NA COLUNA 6, TEMOS O PERFIL DE MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS APÓS LISE E CENTRIFUGAÇÃO. NA COLUNA 7, TEMOS O PERFIL ELETROFORÉTICO DO LISADO NÃO LIGADO. NA COLUNA 8, TEMOS A LAVAGEM COM 40 MM DE IMIDAZOL. NA COLUNA 9 COM 60 MM E NA COLUANA 10 COM 100 MM.84

FIGURA 17 - RESULTADOS DO PROCESSO DE CLIVAGEM DA CAUDA DE HIS DA B-FABP VISUALIZADOS EM GEL DE TRICINA. 0,2 MG/ML DE PROTEÍNA EM 1 ML DE TAMPÃO FOI INCUBADA COM: (A) 1,25 μ G DE TROMBINA, (B) 2,5 μ G DE TROMBINA, E (C) 5 μ G DE TROMBINA. A 1ª COLUNA É O MARCADOR DE MASSA (MWM), NA 2ª COLUNA TEMOS A PROTEÍNA SEM TROMBINA (0H DE CLIVAGEM), NA 3ª COLUNA COM 2 H, NO 4ª COM 3H, NO 5ª COM 4H, NO 6ª

5H, 7 ^a COM 6H, NO 8 ^a COM 7H, NO 9 ^a COM 8H E NO 10 ^a COM 24H DE CLIVAGEM.....	84
FIGURA 18 - ESPECTRO ¹⁵ N-HSQC DA B-FABP HUMANA. OS PICOS EM VERMELHO FORAM OBTIDOS COM A PROTEÍNA APÓS REMOÇÃO DO ÁCIDO GRAXO CONFORME DESCRITO NA SEÇÃO MATERIAIS E MÉTODOS. EM VERDE TEMOS A AQUISIÇÃO DO MESMO ESPECTRO SEM ESSE PROCEDIMENTO.	86
FIGURA 19 - ESPECTRO ¹⁵ N-HSQC DA B-FABP HUMANA. OS PICOS EM VERDE FORAM OBTIDOS COM A PROTEÍNA APÓS REMOÇÃO DO ÁCIDO GRAXO COM O USO SOMENTE DE LIPIDEX, CONFORME DESCRITO POR (REF). EM VERMELHO TEMOS A AQUISIÇÃO DO MESMO ESPECTRO UTILIZANDO O PROCEDIMENTO DE REMOÇÃO DO ÁCIDO GRAXO DESCRITO EM MATERIAIS E MÉTODOS.	87
FIGURA 20 - ESPETROS DE RPE DOS MARCADORES: (A) 5-; (B) 12-; (C) 16-SASL E (D) CAT-16 INCUBADOS COM B-FABP NA RAZÃO P:SL = 4. ESPECTROS DE LINHA CHEIA FORAM REALIZADOS COM 30 % SACAROSE. EM LINHA PONTILHADA, EM 15% SACAROSE E 4 M DE URÉIA. TODAS AS MEDIDAS FORAM REALIZADAS EM TAMPÃO TRIS-HCL PH 8,0.....	89
FIGURA 21 – ESPECTRO DE RPE DO MARCADOR CAT-16 NA SOLUÇÃO CONTENDO A PROTEÍNA B-FABP. ACIMA E EM PRETO TEMOS O ESPECTRO EXPERIMENTAL DA SONDA MAGNÉTICA. EM VERMELHO, O AJUSTE DO ESPECTRO EXPERIMENTAL SIMULADO COM O PROGRAMA NLLS. AS SETAS INDICAM AS COMPONENTES LIVRE (F) E LIGADO (B) À PROTEÍNA.....	91
FIGURA 22 - ESPECTRO DE RPE DO MARCADOR 5-SASL NA SOLUÇÃO CONTENDO A PROTEÍNA B-FABP. ACIMA E EM PRETO TEMOS O ESPECTRO EXPERIMENTAL DA SONDA MAGNÉTICA. EM VERMELHO, O AJUSTE DO ESPECTRO EXPERIMENTAL SIMULADO COM O PROGRAMA NLLS. AS SETAS INDICAM AS COMPONENTES LIVRE (F) E LIGADO (B) À PROTEÍNA.....	93
FIGURA 23 – ESPECTRO E RPE DP MARCADOR 12-SASL NA SOLUÇÃO CONTENDO A PROTEÍNA B-FABP. ACIMA E EM PRETO TEMOS O ESPECTRO EXPERIMENTAL DA SONDA MAGNÉTICA. EM VERMELHO, O AJUSTE DO ESPECTRO EXPERIMENTAL SIMULADO COM O PROGRAMA NLLS. AS SETAS INDICAM AS COMPONENTES LIVRE (F) E LIGADA (B) À PROTEÍNA.	94
FIGURA 24 - GRÁFICO DA SIMULAÇÃO DO 16-SASL NA SOLUÇÃO DA PROTEÍNA B-FABP. ACIMA E EM PRETO TEMOS O ESPECTRO EXPERIMENTAL DA SONDA MAGNÉTICA. EM VERMELHO, O AJUSTE DO ESPECTRO EXPERIMENTAL SIMULADO COM O PROGRAMA NLLS.....	95
FIGURA 25 - ESPECTROS DE RPE DO ÁCIDO ESTEÁRICO 5-DOXIL INCUBADO COM A B-FABP NA RAZÃO P:AS = 4:1. NA SEQUÊNCIA DOS ESPETROS DE CIMA PARA BAIXO TEMOS UMA TITULAÇÃO CRESCENTE DE SDS: 0 μM, 3 μM, 10 μM, 100 μM, 500 μM, 1 MM, 1.5 MM, 2 MM, 4 MM, 6.5 MM E 10 MM. A SETA EM PRETO E EM AZUL SINALIZAM UMA MUDANÇA DE MOBILIDADE DA COMPONENTE MAIS IMÓVEL NA CONCENTRAÇÃO DE 500 μM DE SDS. A CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA UTILIZADA FOI DE 160 μM, EM TAMPÃO TRIS-HCL 50 MM, PH 8.0.....	100
FIGURA 26 - ESPECTRO ¹⁵ N-HSQC DA B-FABP HUMANA (PDB 1JJX) EM SOLUÇÃO. AS MEDIDAS FORAM FEITAS EM TAMPÃO NAP 50 MM, NA CL 100 MM, PH 7,0. NO EIXO HORIZONTAL TEMOS OS VALORES DA RESSONÂNCIA DO PRÓTIEN EM PARTES POR MILHÃO (PPM) REFERENCIADOS AO DSS. NO EIXO	

VERTICAL TEMOS OS VALORES DA RESSONÂNCIA DO ^{15}N EM PPM REFERENCIADOS AO ^1H . FIGURA EXTRAÍDA DE (67)	102
FIGURA 27 - ESTRUTURA DA B-FABP MOSTRANDO AS REGIÕES DE INTERESSE: EM VERMELHO TEMOS AS HÉLICES- α I E II, EM AMARELO AS VOLTAS- β G-H E I-J, EM LARANJA AS VOLTAS- β C-D E E-F. EM LILÁS A FITA- β B E EM VERDE A HÉLICE 3_{10}	103
FIGURA 28 - PRIMEIRO QUADRANTE DO ESPECTRO ^{15}N -HSQC DA B-FABP (300 μM) SEM SDS, EM VERDE, E COM SDS 140 μM , EM VERMELHO. EM DESTAQUE, INDICADO POR SETAS, OS RESÍDUOS CUJO DESLOCAMENTO QUÍMICO FOI ALTERADO PELA PRESENÇA DO SDS	104
FIGURA 29 - SEGUNDO QUADRANTE DO ESPECTRO ^{15}N -HSQC DA B-FABP (300 μM) SEM SDS, EM VERDE, E COM SDS 140 μM , EM VERMELHO. EM DESTAQUE, INDICADO POR SETAS, OS RESÍDUOS CUJO DESLOCAMENTO QUÍMICO DELES FORAM ALTERADOS PELA PRESENÇA DO SDS.	105
FIGURA 30 - TERCEIRO QUADRANTE DO ESPECTRO ^{15}N -HSQC DA B-FABP SEM SDS, EM VERDE, E COM SDS 140 μM , EM VERMELHO. EM DESTAQUE, INDICADO POR SETAS, OS RESÍDUOS CUJO DESLOCAMENTO QUÍMICO DELES FORAM ALTERADOS PELA PRESENÇA DO SDS.....	107
FIGURA 31 - QUARTO QUADRANTE DO ESPECTRO ^{15}N -HSQC DA B-FABP SEM SDS, EM VERDE, E COM SDS 140 μM , EM VERMELHO. EM DESTAQUE, INDICADO POR SETAS, OS RESÍDUOS CUJO DESLOCAMENTO QUÍMICO DELES FORAM ALTERADOS PELA PRESENÇA DO SDS.....	108
FIGURA 32 - ESPECTROS ^{15}N -HSQC DA B-FABP NA CONCENTRAÇÃO DE 300 μM COM 440 μM (A), 880 μM (B), 1280 μM (C), 1680 μM (D), 2680 μM (E) E 8680 μM DE SDS (F).....	110
FIGURA 33 - GRÁFICO DA VARIAÇÃO DO DESLOCAMENTO QUÍMICO ($\Delta\delta$) DO ^1H PELA TEMPERATURA PARA O RESÍDUO A3 NA PRESENÇA (À ESQUERDA) E NA AUSÊNCIA (À DIREITA) DE BICELAS. EM VERMELHO, TEMOS OS RESULTADOS PARA A PROTEÍNA COM ÁCIDO OLÉICO, EM VERDE E EM AMARELO PARA DUAS SITUAÇÕES DA PROTEÍNA NÃO DELIPIADA, EM AZUL CLARO E TAMBÉM EM AZUL ESCURO PARA DUAS SITUAÇÕES DA PROTEÍNA DELIPIADA, E EM PRETO PARA A PROTEÍNA INCUBADA COM DHA.	119
FIGURA 34 - GRÁFICO DA VARIAÇÃO DO DESLOCAMENTO QUÍMICO ($\Delta\delta$) DO ^1H PELA TEMPERATURA PARA O RESÍDUO A3 NA PRESENÇA (À ESQUERDA) E NA AUSÊNCIA (À DIREITA) DE BICELAS. EM VERMELHO, TEMOS O RESULTADO PARA A PROTEÍNA COM ÁCIDO OLÉICO, EM VERDE, PARA A PROTEÍNA NÃO DELIPIADA, EM AZUL, A DELIPIADA E, EM PRETO A PROTEÍNA INCUBADA COM DHA.	114
FIGURA 35 - GRÁFICO DA VARIAÇÃO DO DESLOCAMENTO QUÍMICO ($\Delta\delta$) DO ^1H PELA TEMPERATURA PARA O RESÍDUO K9 NA PRESENÇA (À ESQUERDA) E NA AUSÊNCIA (À DIREITA) DE BICELAS.. EM VERMELHO TEMOS A PROTEÍNA COM ÁCIDO OLÉICO, EM AZUL CLARO, AZUL ESCURO E LILAS A PROTEÍNA DELIPIADA, EM VERDE E EM AMARELO A NÃO DELIPIADA E EM PRETO A PROTEÍNA INCUBADA COM DHA.	115
FIGURA 36 - GRÁFICO DA VARIAÇÃO DO DESLOCAMENTO QUÍMICO ($\Delta\delta$) DO ^1H PELA TEMPERATURA PARA O RESÍDUO Q14 NA PRESENÇA (À ESQUERDA) E NA AUSÊNCIA (À DIREITA) DE BICELAS. EM VERMELHO, TEMOS OS	

RESULTADOS PARA A PROTEÍNA COM ÁCIDO OLÉICO, EM AZUL CLARO, AZUL ESCURO E LILAS PARA A PROTEÍNA DELIPIDADA, EM VERDE PARA A NÃO DELIPIDADA E EM PRETO A PROTEÍNA INCUBADA COM DHA. 116

FIGURA 37 - GRÁFICO DA VARIAÇÃO DO DESLOCAMENTO QUÍMICO ($\Delta\delta$) DO ^1H PELA TEMPERATURA PARA O RESÍDUO N15 NA PRESENÇA (À ESQUERDA) E NA AUSÊNCIA (À DIREITA) DE BICELAS. EM VERMELHO, TEMOS OS RESULTADOS PARA A PROTEÍNA COM ÁCIDO OLÉICO, EM AZUL ESCURO PARA A PROTEÍNA DELIPIDADA, EM VERDE PARA A NÃO DELIPIDADA E EM PRETO PARA A PROTEÍNA INCUBADA COM DHA. 117

FIGURA 38 - ESPECTRO ^{15}N -HSQC DA B-FABP DELIPIDADA EM SOLUÇÃO COM BICELA. EM DESTAQUE, UMA AMPLIAÇÃO DA REGIÃO DOS PICOS PÍCOS DE RESSONÂNCIA DO RESÍDUO F16 E D17. 117

FIGURA 39 - GRÁFICO DA VARIAÇÃO DO DESLOCAMENTO QUÍMICO ($\Delta\delta$) DO ^{15}N PELA TEMPERATURA PARA O RESÍDUO E18 NA PRESENÇA (À ESQUERDA) E NA AUSÊNCIA (À DIREITA) DE BICELAS. EM VERMELHO, TEMOS OS RESULTADOS PARA A PROTEÍNA COM ÁCIDO OLÉICO, EM AZUL ESCURO, AZUL CLARO E LILÁS PARA A PROTEÍNA DELIPIDADA, EM VERDE A NÃO DELIPIDADA, E EM PRETO A PROTEÍNA INCUBADA COM DHA. 119

FIGURA 40 - GRÁFICO DA VARIAÇÃO DO DESLOCAMENTO QUÍMICO ($\Delta\delta$) DO ^{15}N PELA TEMPERATURA PARA O RESÍDUO M20 NA PRESENÇA (À ESQUERDA) E NA AUSÊNCIA (À DIREITA) DE BICELAS. EM VERMELHO, TEMOS OS RESULTADOS PARA A PROTEÍNA COM ÁCIDO OLÉICO, EM AZUL ESCURO, AZUL CLARO E LILÁS PARA A PROTEÍNA DELIPIDADA, EM VERDE PARA A NÃO DELIPIDADA E EM PRETO PARA A PROTEÍNA INCUBADA COM DHA. 120

FIGURA 41 - GRÁFICO DA VARIAÇÃO DO DESLOCAMENTO QUÍMICO ($\Delta\delta$) DO ^{15}N PELA TEMPERATURA PARA O RESÍDUO Y19 NA PRESENÇA (À ESQUERDA) E NA AUSÊNCIA (À DIREITA) DE BICELAS. EM VERMELHO, TEMOS OS RESULTADOS PARA A PROTEÍNA COM ÁCIDO OLÉICO, EM AZUL ESCURO, AZUL CLARO E LILÁS PARA A PROTEÍNA DELIPIDADA, EM VERDE PARA A NÃO DELIPIDADA, E EM PRETO PARA A PROTEÍNA INCUBADA COM DHA. 120

FIGURA 42 - GRÁFICO DA VARIAÇÃO DO DESLOCAMENTO QUÍMICO ($\Delta\delta$) DO ^{15}N PELA TEMPERATURA PARA O RESÍDUO K21 NA PRESENÇA (À ESQUERDA) E NA AUSÊNCIA (À DIREITA) DE BICELAS. EM VERMELHO, TEMOS OS RESULTADOS PARA A PROTEÍNA COM ÁCIDO OLÉICO, EM VERDE PARA A PROTEÍNA NÃO DELIPIDADA, EM AZUL PARA A DELIPIDADA E EM PRETO PARA A PROTEÍNA INCUBADA COM DHA. 121

FIGURA 43 - GRÁFICO DA VARIAÇÃO DO DESLOCAMENTO QUÍMICO ($\Delta\delta$) DO ^1H PELA TEMPERATURA PARA O RESÍDUO L23 NA PRESENÇA (À ESQUERDA) E NA AUSÊNCIA (À DIREITA) DE BICELAS. EM VERMELHO, TEMOS OS RESULTADOS PARA A PROTEÍNA COM ÁCIDO OLÉICO, EM AZUL ESCURO PARA A PROTEÍNA DELIPIDADA, EM VERDE PARA A NÃO DELIPIDADA E EM PRETO PARA A PROTEÍNA INCUBADA COM DHA. 122

FIGURA 44 - GRÁFICO DA VARIAÇÃO DO DESLOCAMENTO QUÍMICO ($\Delta\delta$) DO ^{15}N PELA TEMPERATURA PARA O RESÍDUO A22 NA PRESENÇA (À ESQUERDA) E NA AUSÊNCIA (À DIREITA) DE BICELAS. EM VERMELHO, TEMOS OS RESULTADOS PARA A PROTEÍNA COM ÁCIDO OLÉICO, EM AZUL ESCURO, AZUL CLARO PARA A PROTEÍNA DELIPIDADA, EM VERDE PARA A NÃO DELIPIDADA, E EM PRETO PARA A PROTEÍNA INCUBADA COM DHA. 122

FIGURA 45 - GRÁFICO DA VARIAÇÃO DO DESLOCAMENTO QUÍMICO ($\Delta\delta$) DO ^1H PELA TEMPERATURA PARA O RESÍDUO V25 NA PRESENÇA (À ESQUERDA) E NA

AUSÊNCIA (À DIREITA) DE BICELAS. EM VERMELHO, TEMOS OS RESULTADOS PARA A PROTEÍNA COM ÁCIDO OLÉICO, EM AZUL CLARO E AZUL ESCURO PARA A PROTEÍNA DELIPIDADA, EM VERDE, EM AMARELO E EM ESTRELA PARA A NÃO DELIPIDADA, E EM PRETO PARA A PROTEÍNA INCUBADA COM DHA. 123

FIGURA 46 - HETEROGENEIDADE DOS RESÍDUOS E72 E D76, PERTENCENTES À REGIÃO DO PORTAL, NA SOLUÇÃO SEM BICELA, FIGURAS DA DIREITA. À ESQUERDA, PICOS DESAPARECEM NO INTERVALO DE BAIXA TEMPERATURA PARA AMBOS OS RESÍDUOS..... 124

FIGURA 47 - ESTRUTURA DA B-FABP MOSTRANDO AS CADEIAS LATERAIS DOS RESÍDUOS DA REGIÃO DO PORTAL. EM VERMELHO, TEMOS AS CADEIAS LATERAIS DOS RESÍDUOS HIDROFÓBICOS L23, V25, W97 E F119. EM AZUL, AS CADEIAS LATERAIS DOS RESÍDUOS D76, R78 E K100, PORTADORES DE CARGA ELÉTRICA. OS RESÍDUOS DA VOLTA- β C-D NÃO FOI INCLUÍDO. TODAS AS CADEIAS LATERAIS APONTAM PARA DENTRO DO BOLSÃO DA PROTEÍNA (FIGURA BASEADA NO PDB 1JJX CONSTRUÍDA COM O PROGRAMA MOLMOL). 125

FIGURA 48 - GRÁFICO DA VARIAÇÃO DO DESLOCAMENTO QUÍMICO ($\Delta\delta$) DO ^1H PELA TEMPERATURA PARA O RESÍDUO F27 NA PRESENÇA (À ESQUERDA) E NA AUSÊNCIA (À DIREITA) DE BICELAS. EM VERMELHO, TEMOS OS RESULTADOS PARA A PROTEÍNA COM ÁCIDO OLÉICO, EM AZUL PARA A PROTEÍNA DELIPIDADA, EM VERDE PARA A NÃO DELIPIDADA, E EM PRETO PARA A PROTEÍNA INCUBADA COM DHA. 128

FIGURA 49 - GRÁFICO DA VARIAÇÃO DO DESLOCAMENTO QUÍMICO ($\Delta\delta$) DO ^{15}N PELA TEMPERATURA PARA O RESÍDUO T29 NA PRESENÇA (À ESQUERDA) E NA AUSÊNCIA (À DIREITA) DE BICELAS.. EM VERMELHO, TEMOS OS RESULTADOS PARA A PROTEÍNA COM ÁCIDO OLÉICO, EM AZUL ESCURO, AZUL CLARO PARA A PROTEÍNA DELIPIDADA, EM VERDE, EM AMARELO E EM ESTRELA PARA A NÃO DELIPIDADA, E EM PRETO PARA A PROTEÍNA INCUBADA COM DHA. 128

FIGURA 50 - GRÁFICO DA VARIAÇÃO DO DESLOCAMENTO QUÍMICO ($\Delta\delta$) DO ^{15}N PELA TEMPERATURA PARA O RESÍDUO R30 NA PRESENÇA (À ESQUERDA) E NA AUSÊNCIA (À DIREITA) DE BICELAS. EM VERMELHO, TEMOS OS RESULTADOS PARA A PROTEÍNA COM ÁCIDO OLÉICO, EM AZUL ESCURO, AZUL CLARO PARA A PROTEÍNA DELIPIDADA, EM VERDE PARA A NÃO DELIPIDADA, E EM PRETO PARA A PROTEÍNA INCUBADA COM DHA..... 128

FIGURA 51 - GRÁFICO DO $\Delta\delta$ DO ^{15}N PARA O RESÍDUO Q31 NA PRESENÇA (À ESQUERDA) E NA AUSÊNCIA (À DIREITA) DE BICELAS. EM VERMELHO TEMOS A PROTEÍNA COM ÁCIDO OLÉICO, EM AZUL A PROTEÍNA DELIPIDADA, EM VERDE A NÃO DELIPIDADA, E EM PRETO A PROTEÍNA INCUBADA COM DHA. 129

FIGURA 52 - GRÁFICO DA VARIAÇÃO DO DESLOCAMENTO QUÍMICO ($\Delta\delta$) DO ^1H PELA TEMPERATURA PARA O RESÍDUO V32 NA PRESENÇA (À ESQUERDA) E NA AUSÊNCIA (À DIREITA) DE BICELAS. EM VERMELHO, TEMOS OS RESULTADOS PARA A PROTEÍNA COM ÁCIDO OLÉICO, EM AZUL CLARO E AZUL ESCURO PARA A PROTEÍNA DELIPIDADA, EM VERDE E EM AMARELO PARA A NÃO DELIPIDADA, E EM PRETO PARA A PROTEÍNA INCUBADA COM DHA. 129

FIGURA 53 - GRÁFICO DA VARIAÇÃO DO DESLOCAMENTO QUÍMICO ($\Delta\delta$) DO ^{15}N PELA TEMPERATURA PARA O RESÍDUO N34 NA PRESENÇA (À ESQUERDA) E NA AUSÊNCIA (À DIREITA) DE BICELAS. EM VERMELHO, TEMOS OS

- RESULTADOS PARA A PROTEÍNA COM ÁCIDO OLÉICO, EM AZUL PARA A PROTEÍNA DELIPIDADA, EM VERDE PARA A NÃO DELIPIDADA, E EM PRETO PARA A PROTEÍNA INCUBADA COM DHA..... 130
- FIGURA 54** - GRÁFICO DA VARIAÇÃO DO DESLOCAMENTO QUÍMICO ($\Delta\delta$) DO ^1H PELA TEMPERATURA PARA O RESÍDUO G33 NA PRESENÇA (À ESQUERDA) E NA AUSÊNCIA (À DIREITA) DE BICELAS. EM VERMELHO, TEMOS OS RESULTADOS PARA A PROTEÍNA COM ÁCIDO OLÉICO, EM AZUL CLARO E AZUL ESCURO PARA A PROTEÍNA DELIPIDADA, EM VERDE PARA A NÃO DELIPIDADA, E EM PRETO PARA A PROTEÍNA INCUBADA COM DHA..... 131
- FIGURA 55** - GRÁFICO DA VARIAÇÃO DO DESLOCAMENTO QUÍMICO ($\Delta\delta$) DO ^1H PELA TEMPERATURA PARA O RESÍDUO V35 NA PRESENÇA (À ESQUERDA) E NA AUSÊNCIA (À DIREITA) DE BICELAS. EM VERMELHO, TEMOS OS RESULTADOS PARA A PROTEÍNA COM ÁCIDO OLÉICO, EM AZUL PARA A PROTEÍNA DELIPIDADA, EM VERDE PARA A NÃO DELIPIDADA, E EM PRETO PARA A PROTEÍNA INCUBADA COM DHA..... 132
- FIGURA 56** - GRÁFICO DA VARIAÇÃO DO DESLOCAMENTO QUÍMICO ($\Delta\delta$) DO ^{15}N PELA TEMPERATURA PARA O RESÍDUO T36 NA PRESENÇA (À ESQUERDA) E NA AUSÊNCIA (À DIREITA) DE BICELAS. EM VERMELHO, TEMOS OS RESULTADOS PARA A PROTEÍNA COM ÁCIDO OLÉICO, EM AZUL ESCURO E AZUL CLARO PARA A PROTEÍNA DELIPIDADA, EM VERDE PARA A NÃO DELIPIDADA, E EM PRETO PARA A PROTEÍNA INCUBADA COM DHA..... 134
- FIGURA 57** - GRÁFICO DA VARIAÇÃO DO DESLOCAMENTO QUÍMICO ($\Delta\delta$) DO ^{15}N PELA TEMPERATURA PARA O RESÍDUO S55 NA PRESENÇA (À ESQUERDA) E NA AUSÊNCIA (À DIREITA) DE BICELAS. EM VERMELHO, TEMOS OS RESULTADOS PARA A PROTEÍNA COM ÁCIDO OLÉICO, EM AZUL ESCURO E AZUL CLARO PARA A PROTEÍNA DELIPIDADA, EM VERDE PARA A NÃO DELIPIDADA, E EM PRETO PARA A PROTEÍNA INCUBADA COM DHA..... 135
- FIGURA 58** - GRÁFICO DA ESTRUTURA DA B-FABP MOSTRANDO AS CADEIAS LATERAIS DOS RESÍDUOS DA REGIÃO DO PORTAL VISTO POR CIMA. EM VERMELHO, TEMOS AS CADEIAS LATERAIS DOS RESÍDUOS HIDROFÓBICOS V35 E F57. EM AZUL, AS CADEIAS LATERAIS DOS RESÍDUOS POLARES T36, S55 E T56. TODAS AS CADEIAS LATERAIS APONTAM PARA DENTRO DO BOLSÃO DA PROTEÍNA (FIGURA BASEADO NO PDB 1JJX USANDO O PROGRAMA MOLMOL)..... 136
- FIGURA 59** - GRÁFICO DA VARIAÇÃO DO DESLOCAMENTO QUÍMICO ($\Delta\delta$) DO ^{15}N PELA TEMPERATURA PARA O RESÍDUO F57 NA PRESENÇA (À ESQUERDA) E NA AUSÊNCIA (À DIREITA) DE BICELAS. EM VERMELHO, TEMOS OS RESULTADOS PARA A PROTEÍNA COM ÁCIDO OLÉICO, EM AZUL PARA A PROTEÍNA DELIPIDADA, EM VERDE PARA A NÃO DELIPIDADA, E EM PRETO PARA A PROTEÍNA INCUBADA COM DHA..... 136
- FIGURA 60** - GRÁFICO DA VARIAÇÃO DO DESLOCAMENTO QUÍMICO ($\Delta\delta$) DO ^{15}N PELA TEMPERATURA PARA O RESÍDUO T53 NA PRESENÇA (À ESQUERDA) E NA AUSÊNCIA (À DIREITA) DE BICELAS. EM VERMELHO, TEMOS OS RESULTADOS PARA A PROTEÍNA COM ÁCIDO OLÉICO, EM AZUL CLARO E AZUL ESCURO PARA A PROTEÍNA DELIPIDADA, EM VERDE PARA A NÃO DELIPIDADA, E EM PRETO PARA A PROTEÍNA INCUBADA COM DHA..... 137
- FIGURA 61** - GRÁFICO DA VARIAÇÃO DO DESLOCAMENTO QUÍMICO ($\Delta\delta$) DO ^1H PELA TEMPERATURA PARA O RESÍDUO S82 NA PRESENÇA (À ESQUERDA) E NA AUSÊNCIA (À DIREITA) DE BICELAS. EM VERMELHO, TEMOS OS RESULTADOS PARA A PROTEÍNA COM ÁCIDO OLÉICO, EM AZUL PARA A

PROTEÍNA DELIPIDADA, EM VERDE PARA A NÃO DELIPIDADA, E EM PRETO PARA A PROTEÍNA INCUBADA COM DHA. 137

- FIGURA 62** - GRÁFICO DA VARIAÇÃO DO DESLOCAMENTO QUÍMICO ($\Delta\delta$) DO ^{15}N PELA TEMPERATURA PARA O RESÍDUO H93 NA PRESENÇA (À ESQUERDA) E NA AUSÊNCIA (À DIREITA) DE BICELAS. EM VERMELHO, TEMOS OS RESULTADOS PARA A PROTEÍNA COM ÁCIDO OLÉICO, EM AZUL ESCURO, AZUL CLARO E LILÁS PARA A PROTEÍNA DELIPIDADA, EM VERDE, EM AMARELO E EM ESTRELA PARA A NÃO DELIPIDADA, E EM PRETO PARA A PROTEÍNA INCUBADA COM DHA. 140
- FIGURA 63** - GRÁFICO DA VARIAÇÃO DO DESLOCAMENTO QUÍMICO ($\Delta\delta$) DO ^1H PELA TEMPERATURA PARA O RESÍDUO R106 NA PRESENÇA (À ESQUERDA) E NA AUSÊNCIA (À DIREITA) DE BICELAS. EM VERMELHO, TEMOS OS RESULTADOS PARA A PROTEÍNA COM ÁCIDO OLÉICO, EM AZUL ESCURO E AZUL CLARO PARA A PROTEÍNA DELIPIDADA, EM VERDE PARA A NÃO DELIPIDADA, E EM PRETO PARA A PROTEÍNA INCUBADA COM DHA. 140
- FIGURA 64** - GRÁFICO DA VARIAÇÃO DO DESLOCAMENTO QUÍMICO ($\Delta\delta$) DO ^{15}N PELA TEMPERATURA PARA O RESÍDUO Q95 NA PRESENÇA (À ESQUERDA) E NA AUSÊNCIA (À DIREITA) DE BICELAS. EM VERMELHO, TEMOS OS RESULTADOS PARA A PROTEÍNA COM ÁCIDO OLÉICO, EM AZUL ESCURO E AZUL CLARO PARA A PROTEÍNA DELIPIDADA, EM VERDE PARA A NÃO DELIPIDADA, E EM PRETO PARA A PROTEÍNA INCUBADA COM DHA. 140
- FIGURA 65** - GRÁFICO DA VARIAÇÃO DO DESLOCAMENTO QUÍMICO ($\Delta\delta$) DO ^1H PELA TEMPERATURA PARA O RESÍDUO R126 NA PRESENÇA (À ESQUERDA) E NA AUSÊNCIA (À DIREITA) DE BICELAS. EM VERMELHO, TEMOS OS RESULTADOS PARA A PROTEÍNA COM ÁCIDO OLÉICO, EM AZUL ESCURO E AZUL CLARO PARA A PROTEÍNA DELIPIDADA, EM VERDE PARA A NÃO DELIPIDADA, E EM PRETO PARA A PROTEÍNA INCUBADA COM DHA. 141
- FIGURA 66** - GRÁFICO DA VARIAÇÃO DO DESLOCAMENTO QUÍMICO ($\Delta\delta$) DO ^1H PELA TEMPERATURA PARA O RESÍDUO Y128 NA PRESENÇA (À ESQUERDA) E NA AUSÊNCIA (À DIREITA) DE BICELAS. EM VERMELHO, TEMOS OS RESULTADOS PARA A PROTEÍNA COM ÁCIDO OLÉICO, EM AZUL ESCURO, AZUL CLARO E ROXO PARA A PROTEÍNA DELIPIDADA, EM VERDE E EM AMARELO PARA A NÃO DELIPIDADA, E EM PRETO PARA A PROTEÍNA INCUBADA COM DHA. 142
- FIGURA 67** - ESPECTROS DE RPE DA B-FABP EM TAMPÃO TRIS-HCL 40 MM, PH 7,95, NA CL 100 MM. EM PRETO TEMOS VESÍCULAS DE DOPC 6 MM COM 0,5% DPPTC PARA O EXPERIMENTO CONTROLE. EM VERMELHO TEMOS O MESMO EXPERIMENTO COM A PRESENÇA DE 120 μM B-FABP COM UMA RELAÇÃO PROTEÍNA-LIPÍDIO CERCA DE 1:50. 165
- FIGURA 68** - ESPECTROS DE RPE DA B-FABP EM TAMPÃO TRIS-HCL 40 MM, PH 7,95, NA CL 500 MM. EM PRETO TEMOS VESÍCULAS DE DOPG 6 MM COM 0,5% DPPTC PARA O EXPERIMENTO CONTROLE. EM VERMELHO TEMOS O MESMO EXPERIMENTO COM A PRESENÇA DE 120 μM B-FABP COM UMA RELAÇÃO PROTEÍNA-LIPÍDIO CERCA DE 1:50. 165
- FIGURA 69** - ESPECTROS DE RPE DA B-FABP EM TAMPÃO TRIS-HCL 40 MM, PH 7,95. EM PRETO TEMOS VESÍCULAS DE DOPG 1.8 MM COM 0,8% DPPTC PARA O EXPERIMENTO CONTROLE. EM VERMELHO TEMOS O MESMO EXPERIMENTO COM A PRESENÇA DE 70 μM B-FABP COM UMA RELAÇÃO PROTEÍNA-LIPÍDIO CERCA DE 1:25. 165

- FIGURA 70** - ESPECTROS DE RPE DA B-FABP EM TAMPÃO TRIS-HCL 40 MM, PH 7,95. EM PRETO TEMOS VESÍCULAS DE POPG 1.8 MM COM 0,8% DPPTC PARA O EXPERIMENTO CONTROLE. EM VERMELHO TEMOS O MESMO EXPERIMENTO COM A PRESENÇA DE 250 μ M B-FABP COM UMA RELAÇÃO PROTEÍNA-LIPÍDIO CERCA DE 1:7. 166
- FIGURA 71** - ESPECTROS DE RPE DA B-FABP EM TAMPÃO TRIS-HCL 40 MM, PH 7,95, 10 MM CaCl_2 . EM PRETO TEMOS VESÍCULAS DE DOPC 6 MM COM 0,5% DPPTC PARA O EXPERIMENTO CONTROLE. EM VERMELHO TEMOS O MESMO EXPERIMENTO COM A PRESENÇA DE 60 μ M B-FABP COM UMA RELAÇÃO PROTEÍNA-LIPÍDIO CERCA DE 1:100. 166
- FIGURA 72** - ESPECTROS DE RPE DA B-FABP EM TAMPÃO TRIS-HCL 40 MM, PH 7,95, 10 MM CaCl_2 . EM PRETO TEMOS VESÍCULAS DE DOPG 6 MM COM 0,5% DPPTC PARA O EXPERIMENTO CONTROLE. EM VERMELHO TEMOS O MESMO EXPERIMENTO COM A PRESENÇA DE 60 μ M B-FABP COM UMA RELAÇÃO PROTEÍNA-LIPÍDIO CERCA DE 1:100. 166
- FIGURA 73** - ESPECTROS DE RPE DA B-FABP EM TAMPÃO TRIS-HCL 20 MM, PH 8,2. EM PRETO TEMOS VESÍCULAS DE DOPG 6 MM COM 0,5% 5-PC PARA O EXPERIMENTO CONTROLE. EM VERMELHO TEMOS O MESMO EXPERIMENTO COM A PRESENÇA DE B-FABP 60 μ M COM UMA RELAÇÃO PROTEÍNA-LIPÍDIO CERCA DE 1:7. 167
- FIGURA 74** - ESPECTROS DE RPE DA B-FABP EM TAMPÃO TRIS-HCL 20 MM, PH 8,2. EM PRETO TEMOS VESÍCULAS DE DOPC 6 MM COM 0,5% 5-PC PARA O EXPERIMENTO CONTROLE. EM VERMELHO TEMOS O MESMO EXPERIMENTO COM A PRESENÇA DE 60 μ M B-FABP COM UMA RELAÇÃO PROTEÍNA-LIPÍDIO CERCA DE 1:100. 167
- FIGURA 75** - ESPECTROS DE RPE DA B-FABP EM TAMPÃO TRIS-HCL 40 MM, PH 7,95, 10 MM CaCl_2 . EM PRETO TEMOS VESÍCULAS DE DOPC 6 MM COM 0,5% 7-PC PARA O EXPERIMENTO CONTROLE. EM VERMELHO TEMOS O MESMO EXPERIMENTO COM A PRESENÇA DE 60 μ M B-FABP COM UMA RELAÇÃO PROTEÍNA-LIPÍDIO CERCA DE 1:100. 167
- FIGURA 76** - ESPECTROS DE RPE DA B-FABP EM TAMPÃO TRIS-HCL 40 MM, PH 7,95, 10 MM CaCl_2 . EM PRETO TEMOS VESÍCULAS DE DOPG 6 MM COM 0,5% 7-PC PARA O EXPERIMENTO CONTROLE. EM VERMELHO TEMOS O MESMO EXPERIMENTO COM A PRESENÇA DE 60 μ M B-FABP COM UMA RELAÇÃO PROTEÍNA-LIPÍDIO CERCA DE 1:100. 168
- FIGURA 77** - ESPECTROS DE RPE DA B-FABP EM TAMPÃO TRIS-HCL 40 MM, PH 8,2, 10 MM CaCl_2 . EM PRETO TEMOS VESÍCULAS DE DOPC 6 MM COM 0,5% 10-PC PARA O EXPERIMENTO CONTROLE. EM VERMELHO TEMOS O MESMO EXPERIMENTO COM A PRESENÇA DE 90 μ M B-FABP COM UMA RELAÇÃO PROTEÍNA-LIPÍDIO CERCA DE 1:70. 168
- FIGURA 78** - ESPECTROS DE RPE DA B-FABP EM TAMPÃO TRIS-HCL 40 MM, PH 8,2. EM PRETO TEMOS VESÍCULAS DE DMPC:DMPG (30:70) 5 MM COM 0,8% DPPTC PARA O EXPERIMENTO CONTROLE. EM VERMELHO TEMOS O MESMO EXPERIMENTO COM A PRESENÇA DE 900 μ M B-FABP COM UMA RELAÇÃO PROTEÍNA-LIPÍDIO CERCA DE 1:6. 168
- FIGURA 79** - ESPECTROS DE RPE DA B-FABP EM TAMPÃO TRIS-HCL 40 MM, PH 8,2. EM PRETO TEMOS VESÍCULAS DE DMPC 5 MM COM 0,8% DPPTC PARA O EXPERIMENTO CONTROLE. EM VERMELHO TEMOS O MESMO EXPERIMENTO COM A PRESENÇA DE 900 μ M B-FABP COM UMA RELAÇÃO PROTEÍNA-LIPÍDIO CERCA DE 1:6. 169

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Classificação das FABPs em relação a sua localização. Adaptado da referência (31)..... **53**
- Tabela 2** - Parâmetros obtidos da simulação dos espectros de RPE dos marcadores 5-, 6-, 12-, 16- SASL e CAT-16. Na segunda linha de cada marcador temos os parâmetros da simulação da componente ligada. Em azul, o parâmetro hiperfino médio ao, da componente mais imobilizada do 12-SASL, mostra um ambiente mais hidratado na vizinhança do marcador de spin aprisionado no bolsão da proteína. Para cada célula, a primeira linha é a simulação da componente livre e a hidrofóbica a proteína..... **90**

Lista de Abreviaturas e Símbolos

Símbolo dos aminoácidos

Código de 3 letras	Código de 1 letra	Nome do aminoácido
Ala	A	Alanina
Arg	R	Arginina
Asn	N	Asparagina
Asp	D	Aspartato
Cys	C	Cisteína
Gln	Q	Glutamina
Glu	E	Glutamato
Gly	G	Glicina
His	H	Histidina
Iso	I	Isoleucina
Leu	L	Leucina
Lys	K	Lisina
Met	M	Metionina
Phe	F	Fenilalanina
Pro	P	Prolina
Ser	S	Serina
Thr	T	Treonina
Trp	W	Triptofano
Tyr	Y	Tirosina
Val	V	Valina

Abreviaturas

5-PC	1-palmitoil-2-(5-doxil stearoil) fosfatidilcolina
10-PC	1-palmitoil-2-(10-doxil stearoil) fosfatidilcolina
12-PC	1-palmitoil-2-(12-doxil stearoil) fosfatidilcolina
16-PC	1-palmitoil-2-(16-doxil stearoil) fosfatidilcolina
¹⁵N-HSQC	<i>Heteronuclear single quantum coherence</i>
BSA	Albumina do soro bovino
Cit C	Citocromo C
CD	<i>Circular Dichroism</i> , dicroísmo circular
DO	Densidade ótica
DHA	Ácido graxo docosaexaenóico
DHPC	1,2-diheptanoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina
DOPC	Dioleoil- <i>sn</i> -Glicero-3-fosfocolina
DOPG	Dioleoil- <i>sn</i> -Glicero-3-fosfoglicerol
DMPC	1,2-Dimiristoil- <i>sn</i> -Glicero-3-fosfocolina
DMPG	1,2-Dimiristoil- <i>sn</i> -Glicero-3-fosfoglicerol
DPPTC	Dipalmitoilfosfatidil tempo colina
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
EPA	Ácido eicosapentaenóico
FABP	<i>Fat Acid Binding Protein</i>
ExPASy	<i>Expert Protein Analysis System</i>
IPTG	isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
LB	<i>Luria-Bertani</i>
MOMD	<u>M</u> icroscopic <u>O</u> rdem and <u>M</u> acroscopic <u>D</u> isorder
MTSL	(1-oxy-2,2,5,5-tetramethylpyrroline-3-methyl) methanethiosulfonate

¹⁵ N	Isótopo atômico do Nitrogênio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NLLS	<i>Nonlinear Least-Square</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDB	<i>Protein Data Banking</i>
PEC	Parâmetro de Empacotamento Crítico
pET28	Vetor de clonagem
PE	L- α -fosfatidiletanolamina
POPC	1-palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina
POPG	1-palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoglicerol
PS	L- α -fosfatidilserina (sal de sódio)
pH	Concentração de íons, - $\log(H^+)$
pI	Ponto isoelétrico
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RPE	Ressonância Paramagnética Eletrônica
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulphate - Polyacrilamide Gel Electrophoresis</i> , eletroforese em gel de poliacrilamida- SDS
SUV	<i>Small Unilamellar Vesicle</i>
u.a.	Unidade arbitrária

SUMÁRIO

1	Introdução	37
1.1	Estrutura do ácido graxo	38
1.2	A biomembrana lipídica	39
1.2.1	A molécula de lipídeo e a bicamada	40
1.2.2	A concentração micelar crítica – CMC	42
1.2.3	Estrutura da membrana fosfolipídica	42
1.2.4	Assimetria lipídica da bicamada na biomembrana	45
1.2.5	Transição de fase de lipídeos	47
1.3	Proteínas de membranas	49
1.3.1	Proteínas integrais de membrana	50
1.3.2	Proteínas Periféricas de Membrana	50
1.4	A FABP citosólica: uma proteína periférica de membrana	52
1.4.1	Estrutura e Topologia das FABPs	56
1.4.2	Dinâmica da FABP	58
1.4.3	A proteína ligante de ácido graxo do cérebro humano (B-FABP)	60
2	Objetivos	67
3	Materiais e Métodos	71
3.1	Clonagem da B-FABP	71
3.2	Expressão e purificação da B-FABP	72
3.3	Preparação das vesículas	73
3.4	Preparação da proteína com ácido graxo marcado	74
3.5	Medidas de espectroscopia por RPE	74
3.6	Preparação das bicelas	75
3.7	Remoção do ácido graxo da B-FABP	75
3.8	Medidas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	76
4	Resultados e Discussões	83
4.1	Expressão e Purificação da B-FABP	83
4.2	Remoção do ácido graxo (delipidação da B-FABP)	85
4.3	Interação com as sondas 5-, 12-, 16-SASL e CAT-16	88
4.3.1	CAT-16	91
4.3.2	Ácido esteárico 5-doxil (5-SASL)	93

4.3.3	Ácido esteárico 12-doxil (12-SASL)	94
4.3.4	Ácido esteárico 16-doxil (16-SASL)	96
4.4	Titulação do SDS na B-FABP	97
4.4.1	Medidas de RPE do ácido esteárico 5-doxyl (5-SASL)	98
4.4.2	Medidas de RMN ¹⁵ N-HSQC da B-FABP titulada com SDS	100
4.5	Interação da B-FABP com modelos de membrana (RPE).....	111
4.6	Interação da B-FABP com modelos de membrana (RMN)	112
4.6.1	Região N-terminal	113
4.6.2	Região da Fita-β A	114
4.6.3	Região da Hélice-α I	118
4.6.4	Região da Hélice-α II	126
4.6.5	Volta-β entre a hélice-α II e fita-β B	134
4.6.6	Volta-β entre as fita-β C e D	134
4.7	Outros resíduos participantes do sitio de ligação do ligante	137
4.8	Mecanismo de ligação da B-FABP com membranas	143
4.8.1	Apo: bicela VS sem bicela	143
4.8.2	Holo (DHA): bicela VS sem bicela	144
4.8.3	Holo (Ácido oléico): bicela VS sem bicela	144
5	Conclusão.....	149
	REFERÊNCIAS	155

Introdução

1 Introdução

Ácidos graxos são moléculas hidrofóbicas essenciais para a composição da estrutura física celular, para o metabolismo energético dos seres vivos e também para os caminhos de sinalização molecular no proteoma celular. É através da alimentação que consumimos os ácidos graxos utilizados como fonte de energia e material para o funcionamento de nosso corpo. Aproximadamente 35% do total da necessidade humana diária de ácidos graxos são obtidos através da dieta. As carências desses ácidos graxos estão associadas a enfermidades. No caso de deficiência no ácido graxo docosahexaenóico (*DHA*) e do ácido *eicosapentaenóico* (*EPA*) temos a depressão e a mudança do comportamento (1)

Esses ácidos hidrofóbicos participam na composição de estruturas macromoleculares da célula, como os lipídios da biomembrana, as organelas, e também de algumas proteínas que possuem lipídio em sua composição. Diferentes membranas terão diferentes composições moleculares. Os tipos de ácido graxo e lipídio envolvidos na composição da membrana da célula e de suas organelas são fatores que alteram as propriedades físicas e químicas dessas membranas. Desta forma, diferentes membranas terão diferentes comportamentos a diferentes temperatura, *pH*, salinidade, força elástica, potencial elétrico e afinidade proteína-específica, por exemplo. Existe uma enorme diversidade de biomembranas, cada uma com características específicas em composição lipídica para atender a todas essas diferentes condições (2). Cada uma dessas características físico-químicas está associada com as propriedades necessárias para o desempenho funcional dessas estruturas (3).

A natureza hidrofóbica do ácido graxo dificulta o livre tráfico dessas moléculas pelos diversos tecidos dos seres vivos. Uma maneira que a natureza encontrou para contornar essa dificuldade foi construir proteínas transportadoras dessas moléculas hidrofóbicas. A albumina e as proteínas que se ligam a ácidos graxos (FABPs, do inglês *fatty acid binding proteins*) são exemplos de proteínas responsáveis pelo transporte intercelular e intracelular desses ligantes, protegendo essas moléculas hidrofóbicas do meio aquoso (4-6). Além de realizar o transporte, as FABPs também são capazes de fazer a entrega e captura do ácido graxo para a membrana

fosfolipídica. Já a internalização do ácido graxo do meio exterior para o interior celular é geralmente realizada pela célula por três mecanismos distintos. Isto pode ocorrer por difusão do ácido pela camada lipídica, por uma FABP de membrana favorecendo a passagem e também por um canal ou poro de um complexo monomérico ou oligomérico (7).

Diferentemente da albumina, as FABPs possuem alta especificidade de ligação a ácidos graxos. Assim, cada FABP liga um ácido graxo específico com maior afinidade do que outros ácidos (8). Os mecanismos que garantem essa afinidade específica estão codificados na estrutura terciária da proteína e na dinâmica de seus resíduos específicos.

1.1 Estrutura do ácido graxo

Existem em torno de 700 ácidos graxos conhecidos na natureza. Eles são formados por cadeias de átomos e hidrogênio com um radical ácido em uma das extremidades da cadeia carbônica. O ângulo da ligação dos átomos de carbono nessa cadeia é cerca de 109° (Figura 1). Cada átomo de carbono é numerado começando do grupo carboxílico (COOH).

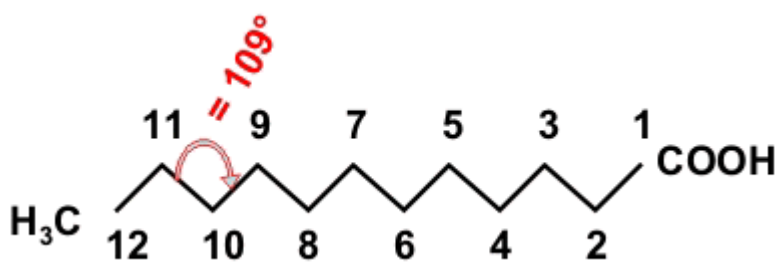


Figura 1 - Modelo de ácido graxo láurico, composto de 12 carbonos. Em vermelho temos o ângulo da ligação entre os átomos de carbono. Figura adaptada de www.bmrw.wisc.edu/metabolomics/mol_summary/?molname=dodecanoic_acid

Os ácidos graxos podem estar na forma saturada, situação em que os átomos de carbonos estão conectados apenas via ligações simples, ou não-saturada, com uma ou mais ligações duplas. No caso de apenas uma dupla ligação na cadeia, o ácido graxo é denominado monoinsaturado, no caso de duas ou mais ligações, chama-se poli-insaturado. A insaturação do ácido graxo pode ser de configuração *cis*

ou *trans* (Figura 2). Na configuração *trans*, os próximos dois átomos de hidrogênio

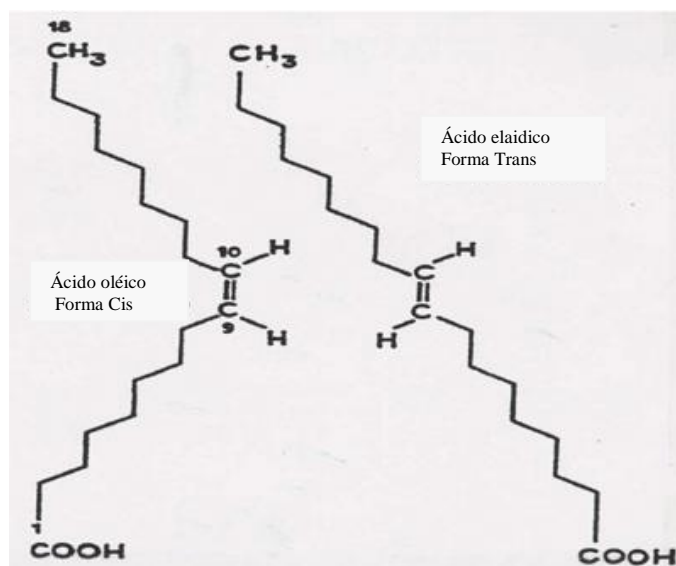


Figura 2 - Representação da estrutura dos ácidos graxos na forma *trans* (à esquerda) e *cis* (à direita). Adaptado da referência www.worldofmolecules.com

estão ligados do lado oposto da ligação dupla. Já na configuração *cis*, os átomos adjacentes de hidrogênio estão do mesmo lado da insaturação (9). Geralmente, as gorduras apresentam ácidos graxos saturados em sua composição, enquanto os óleos apresentam ácidos graxos não-saturados. Essas diferenças são caracterizadas nas propriedades físicas desses compostos em temperatura ambiente, como a viscosidade.

1.2 A biomembrana lipídica

A biomembrana lipídica é uma superfície fechada, semi-permeável, que possui um lado interno e um lado externo, assim definindo compartimentos. A biomembrana em uma célula eucariótica define numerosas organelas membranosas, cada uma possuindo composições, detalhes estruturais e funções únicas no equilíbrio da maquinaria do microorganismo. Elas fazem a comunicação entre o lado externo e interno da célula, controlando a entrada e saída de íons, catalisam reações transmembranares envolvendo reagentes de ambos os lados da membrana e o transporte molecular (10). Acredita-se que o proteoma da biomembrana corresponda

a cerca de 50% do proteoma de um ser vivo (11). Apesar deste número expressivo, essas biomembranas compartilham algumas propriedades estruturais e funcionais. Diversos estudos iniciais realizados com membranas de eritrócitos e utilizando diversas técnicas experimentais, permitiram aprender sobre esse sistema. Em 1972, o modelo do mosaico fluido foi proposto(12). Neste modelo, a membrana celular é um líquido bidimensional onde proteínas de membrana são uniformemente dispersas em um solvente lipídico. Ainda hoje, este modelo continua sendo um ponto de partida para muitas pesquisas em membranas, e suas formas modificadas tem contribuído com resultados interessantes (10).

Hoje, sabemos que uma única biomembrana lipídica pode conter mais de 100 tipos de lipídios diferentes, dando a diferentes biomembranas e organelas celulares uma distribuição de lipídios única (13). Os motivos desta diversidade ainda não são totalmente entendidos e carecem de uma descrição satisfatória. Porém, a biosíntese de lipídios e a maneira como são distribuídos para as diferentes membranas são conhecidas e cada vez mais se sabe que lipídios participam ativamente e de forma especializada em processos associados à membrana. Dentre esses processos temos a otimização da atividade enzimática, a regulação do crescimento celular, a estabilização da membrana para a formação correta de complexos proteína-membrana e o bom funcionamento de proteínas (14).

1.2.1 A molécula de lipídeo e a bicamada

A membrana lipídica é usualmente formada por uma bicamada fosfolipídica, sendo os glicerofosfolipídios aqueles mais comumente encontrados na biomembrana. Um glicerofosfolipídio é derivado de uma molécula de glicerol à qual se ligam duas cadeias de ácido graxo e um grupo fosfato contendo uma cabeça polar (Figura 3). Na presença de um solvente aquoso, essas moléculas anfifílicas são organizadas de tal forma que a cabeça polar hidrofílica, tanto da camada interna como da camada externa, ficam em contato com o meio aquoso (polar). Já a cadeia de carbono apolar (hidrofóbica) da molécula de lipídio da camada externa fica em contato com a cadeia de carbono da molécula lipídica da camada interna da

bicamada lipídica, criando um ambiente menos acessível à água no centro da bicamada lipídica. É a cadeia de ácido graxo sn-2 que se estende paralelamente ao plano da bicamada para os 2 primeiros carbonos (15). Outros trabalhos mostraram que existem variações desse arranjo fosfolipídico. A cadeia acilíca pode inclinar-se em relação à normal do plano da bicamada, aumentando a área molecular do lipídeo (16). Na Figura 3 abaixo, temos em destaque a região do grupo polar, o ângulo de inclinação da cadeia acilíca e a superfície molecular do fosfolipídio. Quando essa bicamada lipídica é fechada, definindo um lado interno e um lado externo, recebe o nome de vesícula. Essa forma de organização possui um papel fundamental tanto no funcionamento das células biológicas, como em aplicações tecnológicas, por

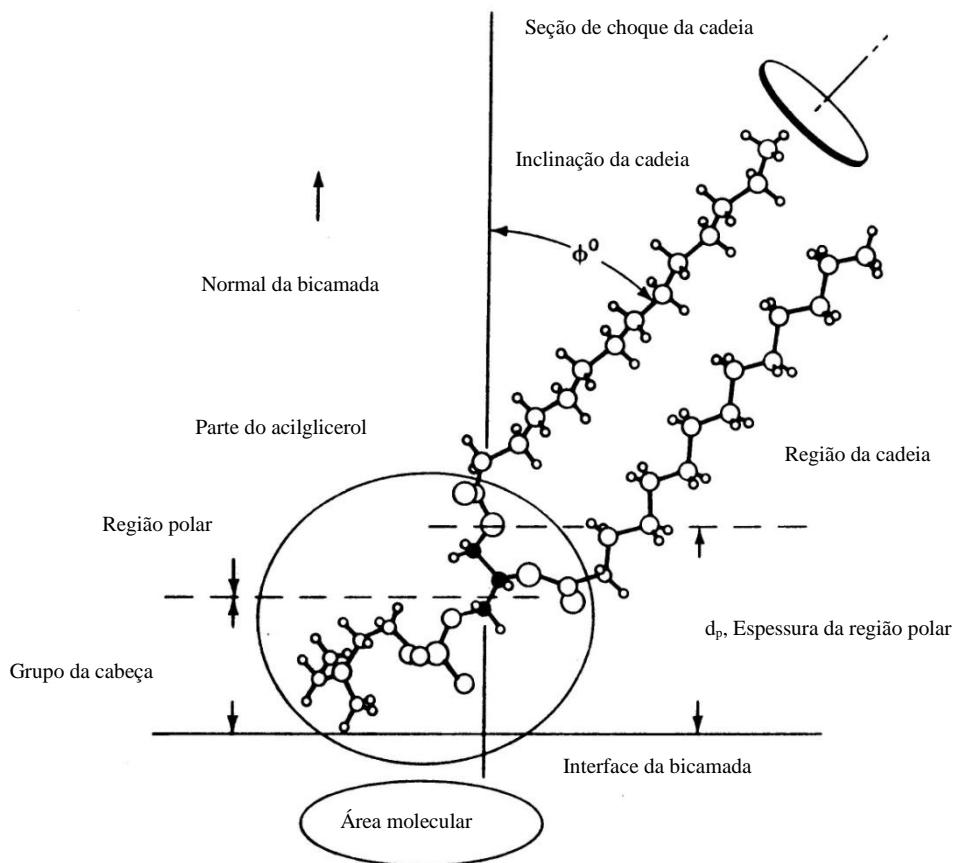


Figura 3 - Esquema da molécula de DMPC (Dimeristoil Fosfatidil Colina). Podemos notar a inclinação da cadeia acil. Diferenças de S e Σ contribui para a estrutura molecular adotada pela bicamada. Extraído de (10).

exemplo, o transporte de nano partículas para o interior de microorganismo (17).

1.2.2 A concentração micelar crítica – CMC

A forma com que as moléculas anfífilas, por terem características hidrofóbicas e hidrofílicas, tendem a se auto-organizar, limita a quantidade de moléculas monoméricas na solução aquosa. A partir de determinada concentração da molécula anfífila ocorre o surgimento de agregados moleculares, usualmente chamados de micelas. A partir deste ponto, definido como concentração micelar crítica (CMC), o incremento da quantidade de moléculas acarretará num aumento na concentração de micelas, sem aumento da forma monomérica da molécula anfífila. A CMC pode variar da concentração de nanomolar, para a maioria dos lipídios, até concentrações de milimolar para alguns ácidos graxos e detergentes (18).

1.2.3 Estrutura da membrana fosfolipídica

Diferentes fosfolipídios associam-se de diferentes formas na membrana, todos dependentes das características estruturais e químicas da molécula de lipídio. Estes diferentes empacotamentos do lipídio também definem a fase em que se encontram (10).

Em misturas de água e lipídio, mesmo para um único tipo de lipídio, existem diferentes formas de se organizar e empacotar o lipídio quando hidratado. A forma predominante dependerá também de parâmetros termodinâmicos como temperatura, pH, força iônica do meio, pressão, estequiometria e hidratação do lipídio. Podemos destacar fases predominantes em um sistema lipídio-água (Figura 4) (10):

- a) Fase líquida cristalina ou cristal líquido (L_{α}): é a fase usualmente pensada das biomembranas, com os lipídios organizados em uma bicamada fluida.
- b) Fase gel lamelar (L_{β}): é caracterizada também por uma bicamada. É formada em temperaturas mais baixas. O lipídio está mais empacotado, com uma área superficial molecular menor. Há um maior ordenamento das

cadeias acilícas, o que faz a bicamada nessa fase ter uma espessura e densidade maior do que na fase de cristal líquido.

- c) Fase Hexagonal I (H_I): a estrutura assumida pelos lipídios nessa fase é de cilindros. Os grupos polares estão do lado de fora em contato com a água. Os cilindros são organizados em um padrão hexagonal.
- d) Fase Hexagonal II (H_{II}): nesta fase, os lipídios também estão na forma de cilindros, mas a face do grupo polar é, neste caso, a superfície interna do cilindro, com uma coluna de água em seu interior. Também há um padrão hexagonal para o empacotamento dos cilindros.
- e) Fase de Bicela: esta fase é uma bicamada formada com a mistura de pelo menos dois tipos de lipídios, o que faz esse sistema ter um maior grau de complexidade. Um dos lipídios possui cadeias acil longa e o outro curta. Nessa fase, a bicamada não é uma superfície fechada, assumindo uma forma de discóide, com os lipídios curtos nas bordas do disco.

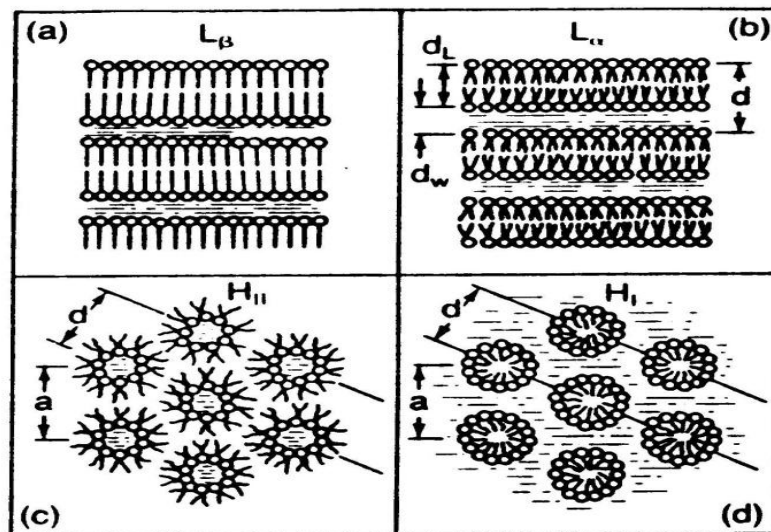


Figura 4 - Representação esquemática da fase lipídeo-água: a) gel lamelar; b) líquido cristalino lamelar; c) hexagonal tipo II; d) hexagonal tipo I. “d”, “ d_L ”, “ d_w ” e “a” são dimensões que caracterizam cada uma dessas fases. Figura adaptada (10).

Muitos dos lipídios encontrados em biomembranas não assumem uma fase estável em bicamada. De fato, somente os lipídios com um Parâmetro de Empacotamento Crítico (PEC) entre 1/2 e 1 tendem a formar uma bicamada. O PEC é a razão do volume v da molécula de lipídio por sua superfície S_0 e comprimento da cadeia acil l (10):

$$\frac{v}{lS_0} \quad (1)$$

Se o PEC é menor que 1/3, há a formação de micela esférica. Entre 1/3 e 1/2, a micela será globular ou cilíndrica. Já os valores entre 1/2 e 1 caracterizam a formação da bicamada e um valor maior do que 1 favorece a fase H_{II}.

A bicamada lipídica quando fechada em si mesma costuma ser usualmente chamada de vesícula, que podem ser multilamelares (como cascas de cebola) ou unilamelares. Quando o raio da vesícula é menor que 100 nm, temos uma vesícula unilamelar pequena. Quando é entre 100 nm e 500 nm temos uma vesícula unilamelar grande. Na escala de micrômetros ou mais, a vesícula é considerada gigante.

Quando a bicamada não é fechada nela mesma, com o formato de discóides, ela recebe o nome de bicela, assemelhando-se a uma micela em forma de disco, constituindo também uma fase do sistema lipídio-água (Figura 5). A formação dessa fase requer valores estequiométricos específicos de lipídios de cadeia longa e de cadeia curta. Essa relação estequiométrica usualmente é expressa pelo parâmetro q . Uma maneira para formar e manter a fase de bicela é que a razão q seja maior que um e a proporção massa/volume da concentração lipídica da solução seja maior que 2% (19-20). Este modelo de biomembrana, estudado intensivamente a partir da década de 90, é hoje uma alternativa mais plausível na reconstituição de proteínas de membranas em uma bicamada lipídica. Diferentemente das micelas, as bicelas são estruturas compostas de uma bicamada que mimetizam melhor a biomembrana (21). Uma bicela possui um diâmetro cerca de 30 nm e uma espessura cerca de 20 nm. No caso de medidas de RMN em alta resolução no meio aquoso, este sistema não se alinha com o campo magnético do espectrômetro, permitindo caracterizar mudanças em peptídeos e proteínas que interagem com a membrana (22).

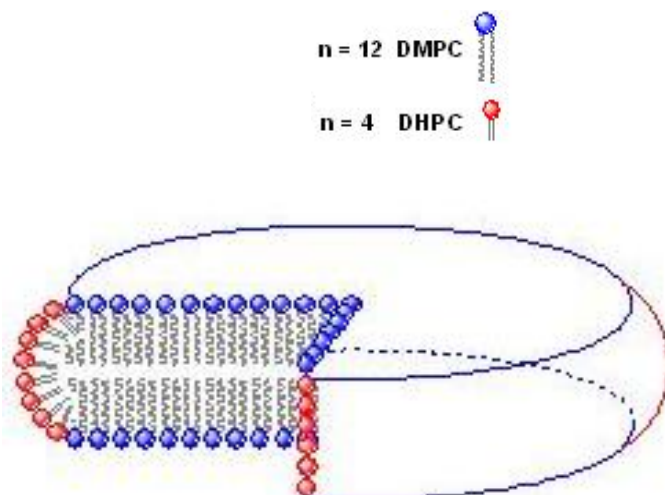


Figura 5 - Representação da forma de uma bicela composta de DHPC e DMPC. O DHPC, de cadeia curta, concentra-se na extremidade do disco. O DMPC, de cadeia longa, concentra-se na superfície plana do disco. Adaptado de <<http://www.chem.sci.osaka-u.ac.jp/lab/murata/research/index2.htm>>

1.2.4 Assimetria lipídica da bicamada na biomembrana

Diferentemente do modelo de mosaico fluido, o plano da bicamada pode ter tanto assimetria na distribuição de lipídios que levam a uma separação da composição lipídica e protéica da parte interna e externa da biomembrana quanto inomogeneidades de fase lateral no próprio plano de cada monocada. A face interna costuma ser mais carregada negativamente e ter maior concentração de açúcares. Já as diferenças de fase lateral geram heterogeneidades, observados em sistemas modelo, como a presença dos “micro-domínios lipídicos”, estáveis termodinamicamente e que também podem existir em biomembranas (23). Na Figura 6, temos um modelo de microdomínio lipídico, no caso, uma micela de fase invertida na bicamada lipídica.

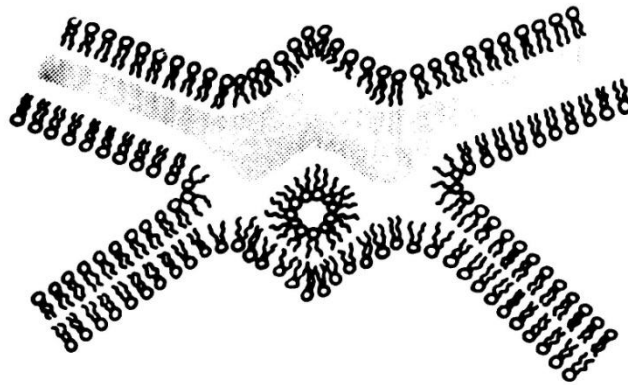


Figura 6 - Modelo hipotético de uma partícula lipídica como uma micela invertida. Figura adaptada da referência (24)

A formação da “partícula lipídica” é induzida pela presença de lipídios imiscíveis na membrana. Lipídios não miscíveis na membrana tendem a se aglomerar e até mesmo formar pequenas regiões com fase distinta da membrana (24). Este comportamento de misturas de lipídios em sistemas modelo é um campo crescente de pesquisa, fornecendo novos subsídios na compreensão de biomembranas reais. Para esses estudos são criados modelos de laboratório de membrana em bicelas, bicamada plana, em monocamada e em vesículas.

Essa assimetria observada em sistemas modelo permite que numa mesma membrana coexistam, de forma distinta, regiões em fase gel-lamelar com regiões em fase líquido-cristalino. Esta propriedade da bicamada lipídica fornece maior flexibilidade funcional para as biomembranas. Por exemplo, diferentes enzimas na mesma membrana podem, cada uma, estar em micro-domínios de lipídio para o qual a atividade delas é otimizada ou controlada especificamente por uma interação lipídica (10).

Este comportamento de misturas de lipídios em sistemas modelo é um campo crescente de pesquisa, fornecendo novos subsídios na compreensão de biomembranas reais. Para esses estudos são criados modelos de laboratório de membrana em bicelas, bicamada plana, em monocamada e em vesículas.

1.2.5 Transição de fase de lipídeos

Variações de parâmetros termodinâmicos como a pressão, temperatura, força iônica e outros agentes, como o colesterol, também influenciam a fase em que se encontram os lipídios, induzindo transições de fase. Variando-se a temperatura, uma solução hidratada de dimiristoil fosfatidilcolina (*DMPC*) pode sair da fase gel L_{β} para a fase de líquido cristalino L_{α} . Apesar de ser um fenômeno característico de agregados de lipídio, a biomembrana geralmente não apresenta transições de fase. Contudo, os estudos desses sistemas modelo mais simples são relevantes para a compreensão e uma melhor descrição da biomembrana e de seu funcionamento, com suas assimetrias e heterogeneidades. Estes estudos permitem determinar o papel de cada fosfolipídio na bicamada, como também de agentes perturbativos, como proteínas, colesterol e ácidos graxos. Dentre as técnicas utilizadas para isso temos a ressonância magnética nuclear (RMN) e a ressonância magnética eletrônica (RPE). Com estas técnicas é possível se obter uma descrição molecular do lipídio inserido na bicamada, e também, as características da transição de fase de sistemas modelo de membrana.

A fluidez da bicamada aumenta de duas ordens de grandeza durante a transição da fase gel para a fase líquido-cristalina no caso do DMPC (10). Em geral, a manutenção da fase gel é incompatível com o correto funcionamento da biomembrana. Uma maneira de quantificar essa fluidez da bicamada lipídica é com o uso de sondas usadas pela técnica de RPE, RMN e/ou fluorescência. No caso da RPE, é muito utilizado como sonda da bicamada um radical nitróxido ligado covalentemente à cadeia acíclica de um ácido graxo ou de um fosfolipídio, ou ainda, à região da cabeça polar.

No caso das bicelas, as transições de fase costumam ser mais complicadas. Misturas de DMPC/DHPC na razão molar de 4,5:1 possuem a fase de bicela no intervalo de temperatura de 32 °C a 36 °C (Figura 6d). Abaixo da temperatura de 21 °C, há a coexistência de micelas de DHPC e DMPC/DHPC (Figura 7a). Entre 22 °C e 24 °C, ocorre coexistência da fase micelar de DHPC com a fase gel da bicamada lipídica de DMPC (Figura 6b). Entre 26 °C e 32 °C, existe uma mistura de micelas de DHPC com bicamadas de DMPC/DHPC (Figura 6c) e, acima da temperatura de 36

$^{\circ}\text{C}$, há a fase de bicamada fluida coexistindo com a fase de micelas de DHPC (Figura 6e) (25). Contudo, outros estudos realizados em um sistema semelhante questionaram estes resultados (26).

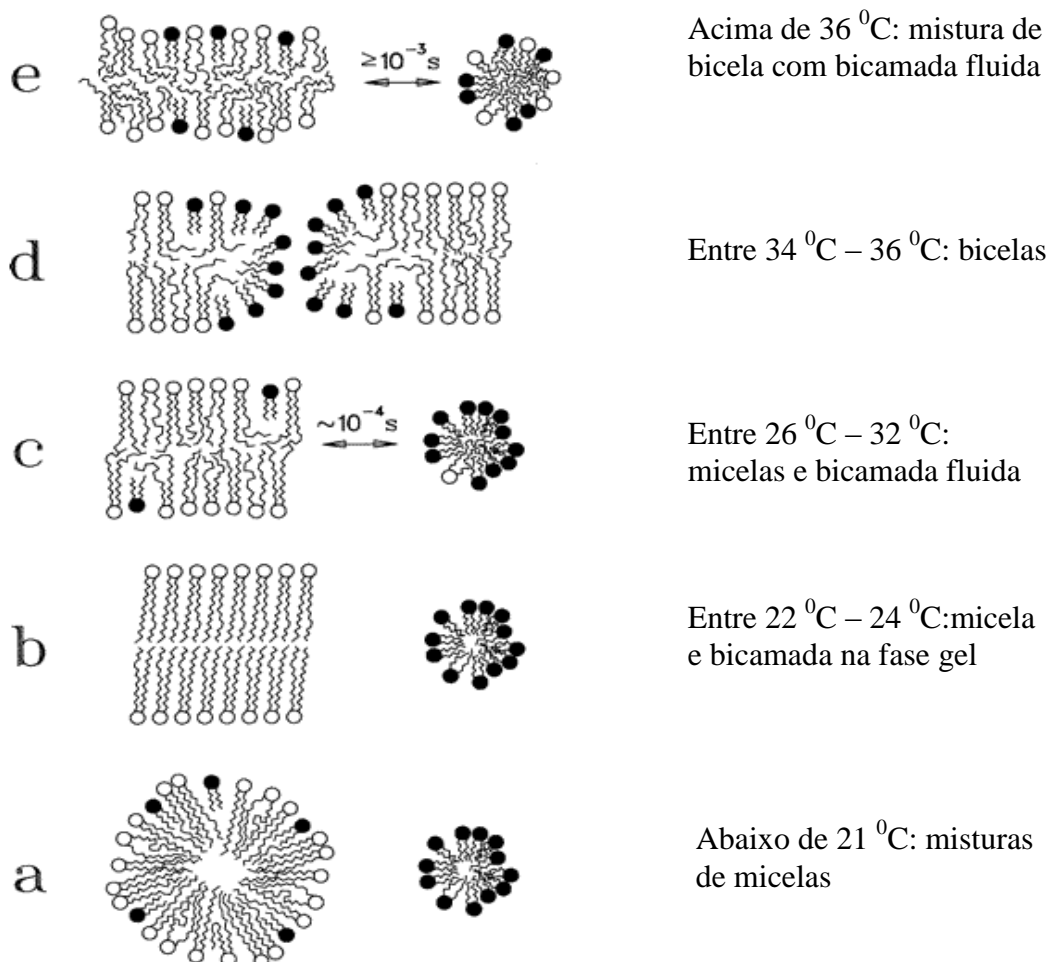


Figura 7 - Modelo das fases estruturais vistas em misturas de DMPC/DHPC. A cabeça do DHPC é representada por círculos preenchidos. Em d temos a fase de bicela. Figura adaptada da referência (25).

De maneira geral, os parâmetros q (razão DMPC:DHPC), C_L (concentração lipídica) e a temperatura são fatores determinantes para a formação e para as propriedades da bicela (20, 25). Misturas de DMPC e DHPC com um parâmetro q menor ou igual a dois favorecerá o surgimento de bicelas isotrópicas de baixa dimensão (menor que SUVs) (27). Estas bicelas de baixo q não se alinham com o campo magnético (bicelas isotrópicas), o que favorece o estudo por RMN em

solução. Apesar da intensa pesquisa na área, pouco se sabe sobre os efeitos de uma proteína no diagrama de fase de uma mistura de bicelas.

1.3 Proteínas de membranas

Atualmente existem mais de 60.000 estruturas de proteínas conhecidas e, dessas, por volta de 2.000 são proteínas de membrana. Tal desproporção não é devido a uma limitação funcional das biomembranas. Há, sim, uma dificuldade muito maior em se trabalhar com os sistemas protéicos lipossolúveis, principalmente os integrais de membrana. Contudo, isso não diminui a importância desses sistemas, porque são eles que fazem o intercâmbio entre o meio exterior da célula e o meio interior, como também a comunicação entre as diversas organelas internas da célula.

Os lipídios e suas diversas formas de aglomerados dão o suporte estrutural para a formação de uma bicamada estável e fluida que é ocupada por proteínas. As diversas associações possíveis entre proteína e a bicamada lipídica caracterizam e/ou determinam a função dos diversos tipos de biomembrana da célula e de suas organelas. Essas proteínas associadas a uma bicamada lipídica são chamadas de proteínas de membrana. Elas podem ser proteínas periféricas ou proteínas integrais de membrana. A separação desses dois tipos de proteínas de membrana não depende da maneira com que a proteína está associada à membrana e sim da força dessa interação com a bicamada lipídica. As proteínas integrais de membrana estão muito mais coesas e integradas na bicamada do que as proteínas periféricas. Variações no pH, temperatura ou força iônica são suficientes para desconectar uma proteína periférica de membrana. No entanto, para remover uma proteína integral é necessária a dissolução da bicamada lipídica com o uso, muitas vezes, de surfactantes.

Essa característica das proteínas periféricas de membrana, em contraste às integrais, determina o seu método de purificação. Em geral, os métodos usuais de proteínas hidrossolúveis são válidos na purificação de proteínas periféricas. Existem proteínas periféricas de membrana que atingem concentrações de 3 mM, como as

FABPs – proteínas capazes de fazer a captura, transporte e entrega do ácido graxo entre as diversas organelas e membranas do interior da célula.

1.3.1 Proteínas integrais de membrana

Proteínas integrais de membranas estão permanentemente e fortemente associadas à membrana. Elas podem ser transmembranar, com estruturas presentes em ambos os lados da bicamada lipídica, com a cadeia polipeptídica da proteína atravessando a bicamada uma ou mais vezes, ou podem ser monotópicas, localizadas em apenas um dos lados da bicamada lipídica, como é o caso da prostaglandina H2 sintetase envolvida em processos inflamatórios, na doença coronariana e na disfunção renal (28). Proteínas integrais de membrana incluem uma diversidade de representantes como enzimas, transportadores, canais, receptores, proteínas do metabolismo energético e de adesão celular (23).

Os resíduos envolvidos pelos lipídios da bicamada são normalmente resíduos apolares e/ou hidrofóbicos. Estes resíduos adquirem uma estrutura secundária típica de hélice ou fita- β quando em um ambiente hidrofóbico, como o favorecido pela bicamada. As proteínas integrais de biomembrana, além de estarem associadas à bicamada lipídica, podem, concomitantemente, estar associadas ao citoesqueleto e outras estruturas da célula.

1.3.2 Proteínas Periféricas de Membrana

As proteínas periféricas de membrana, como o próprio nome diz, atuam na periferia da bicamada lipídica. Elas aderem na superfície da bicamada por meio de mecanismo elétricos, associação hidrofóbica não específica, lipídios ligados covalentemente à proteína e usados como âncoras ou com uma ligação específica lipídeo-proteína ou ligadas a uma proteína integral de membrana (29). Esses

mecanismos de ligação são fortes o suficiente para a realização da função dessas proteínas, mas fracos quando comparados à ligação de uma proteína integral de membrana com a bicamada. Fazem parte desse grupo de proteínas periféricas de membrana as enzimas, como as lipases, os domínios estruturais mediadores da ligação de outras proteínas com a membrana, como por exemplo, o domínio estrutural C2 que media a interação das proteínas quinases com a bicamada, as proteínas transportadoras de pequenas moléculas hidrofóbicas, como as FABPs, o citocromo-C que é uma proteína transportadora de elétrons, e, por fim, temos os polipeptídeos, como os peptídeos antimicrobianos. Na Figura 8, temos um modelo para estes mecanismos de ligação de uma proteína periférica de membrana com a bicamada lipídica.

A afinidade de proteínas periféricas com composições lipídicas específicas permite um controle da ligação entre a proteína e a bicamada lipídica. Proteínas que interagem controlada e reversivelmente com os lipídios da biomembrana são chamadas de proteínas amfitrópicas (30). Muitas das proteínas periféricas de membrana, quando ligadas à bicamada, alteram sua estrutura terciária em acordo com a composição lipídica na sua vizinhança. Regiões que estavam enoveladas podem desenovelar-se, como também pode ocorrer a formação ou dissociação de oligômeros (31).

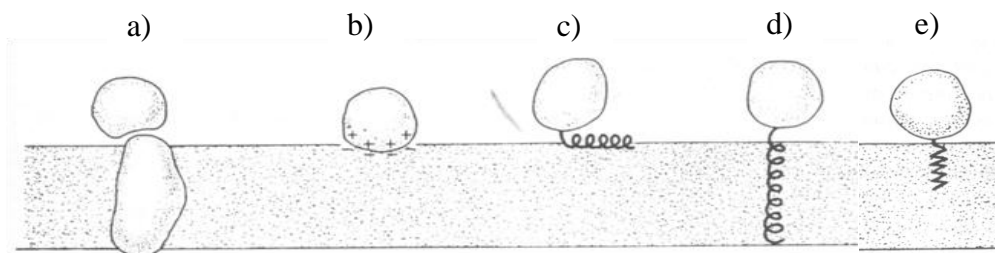


Figura 8 - Os mecanismos de ligação mais comuns de proteínas periféricas de membrana com a bicamada lipídica. Da esquerda para a direita: a) ligação proteína-proteína, b) eletrostática, c) hélice anfipática, d) hélice terminal e e) âncora lipídica. Figura adaptada da referência (10).

1.4 A FABP citosólica: uma proteína periférica de membrana

A FABP citosólica é uma proteína monomérica de aproximadamente 14,4 kDa pertencente à superfamília das lipocainas e encontradas largamente em diversos organismos (32). Neste grupo, temos duas famílias de proteínas. Uma dessas famílias é de proteínas com estrutura semelhante às proteínas ligantes do ácido retinol (RBPs). A outra família é de proteínas semelhantes às FABPs propriamente ditas. As diferenças dessas duas famílias de proteínas podem ser visualizadas, de forma grosseira, nas distintas estruturas apresentadas nas figuras a seguir. Na Figura 9, à esquerda, temos um modelo da FABP ligada na parte interna da bicamada lipídica. A maior característica para esta família de proteínas é a presença de duas hélices (em vermelho). Na Figura 9 à direita, há somente uma hélice para as CRBPs, além da interação com a biomembrana acontecer pelo seu lado exterior. O arranjo das fitas- β também é diferente para estas duas famílias de proteínas.

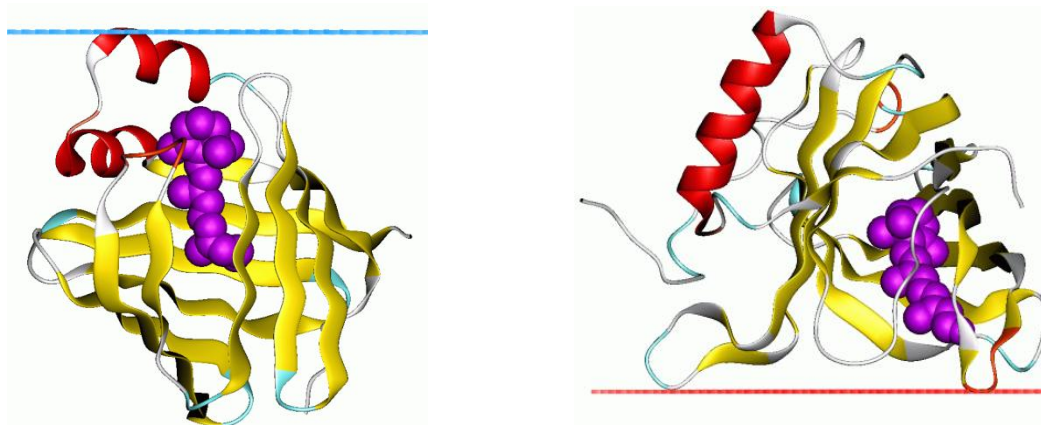


Figura 9 - Estrutura de membros típicos da superfamília das lipocainas. À esquerda, temos a proteína ligadora do ácido graxo como as FABPs. O tracejado azul indica que a proteína está voltada para o citosol. À direita, temos a proteína ligadora de ácido retinol, como as RBPs. O tracejado vermelho indica que a proteína está voltada para o meio extracelular. Em roxo, o ácido graxo ligado na proteína. Extraído do site <<http://opm.phar.umich.edu>>

As proteínas ligantes de ácidos graxos humanas são expressas seletivamente e foram nomeadas em acordo com o tecido do qual foram primeiramente isoladas. Assim, do inglês, temos a L-FABP do fígado (*Liver*), a H-FABP do coração (*Heart*), a

B-FABP do cérebro (*Brain*), a M-FABP do tecido muscular (*Muscle*) e assim sucessivamente para as outras FABPs. Na Tabela 1 é apresentada uma relação das diversas formas como essas proteínas são conhecidas, assim como o tecido em que elas geralmente são expressas em maior quantidade (33).

Tabela 1 - Classificação das FABPs em relação a sua localização. Adaptado da referência (31).

Nome	Outros nomes	Tecido de expressão
FABP1	L-FABP, proteína Z, h-FABP	Fígado, intestino, rim, pulmões
FABP2	I-FABP, gFABP	Intestino
FABP3	H-FABP, MDGI	Coração, glândulas mamárias, músculos esqueléticos
FABP4	A-FABP, ALBP, aP2, p15,	Tecido adiposo, macrófagos
FABP5	E-FABP, PA-FABP, C-Fabp, LP2, Mal-1, Dall, S-Fabp, Klbp, Le-Lbp Inibidor melanogênico,	Estômago, células endoteliais, testículos, células adiposas, retina, cristalino, células mamárias, língua, placenta, cérebro, pulmões e coração
FABP6	ILBP, ILBP, BABP, I15P IL-FABP, Gastrotrop	Íleo
FABP7	B-FABP, BLBP, MRG, R-FABP	Cérebro, Bulbo olfativo
FABP8	M-FABP, Mielina, P2, PMP2	Células de Schwann
FABP9	T-FABP, TLBP, PERF15	Testículos
CRBP I	cRBP I	Fígado, pulmões, intestino, rim,
CRBP II	cRBP II	Intestino delgado
CRABP I	cRABP I	Testículos, cérebro, rim, pele
CRABP II	cRABP II	Pele, glândulas adrenais

Praticamente, todas as FABPs se enquadram na categoria de proteínas anfitrópicas, a exceção sendo a L-FABP. Estudos por fluorescência demonstraram que as FABPs podem entregar o ácido graxo para a bicamada lipídica por dois mecanismos distintos: colisional ou difusional (34, 35). A L-FABP e a cRBP II parecem ser as únicas FABPs que possuem um mecanismo difusional para entrega do ácido graxo. Na Figura 10, temos uma representação esquemática desses dois processos de entrega do ácido graxo para a bicamada lipídica. Neste experimento, utilizando um ácido graxo como sonda fluorescente, os autores concluíram que a L-FABP e a I-FABP, proteínas encontradas em maior concentração nas células de absorção do intestino, interagem com vesículas de forma difusional e colisional, respectivamente. Contudo, a interação da I-FABP para entrega de ácido graxo foi diferente da interação para a captura do mesmo, além de fortemente dependente da composição lipídica da vesícula (34, 36-38). As presenças de esfingomielina e

colesterol na bicamada diminuíram essa taxa de entrega em 30% e 20%, respectivamente. Já a adição de PE de ovo não teve efeito na taxa de entrega do ácido graxo da I-FABP para a vesícula. Porém, quando adicionados fosfolípidios ácidos na composição lipídica da vesícula, a I-FABP apresentou um aumento na taxa de entrega de três vezes para o fosfatidil inositol e de noventa vezes para a cardiolipina. Além disso, foi reportado que o aumento da força iônica do meio inibe essa entrega para o caso dos fosfolípidios carregados (34, 36). Verificou-se, também, como a fase da membrana influencia essa taxa de entrega. Vesículas de

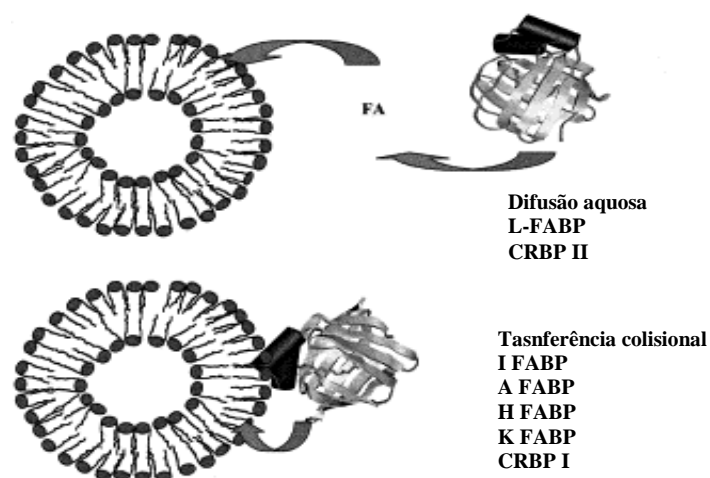


Figura 10 - Representação dos dois mecanismos distintos utilizados pelas Lipocalinas para a entrega do ligante para uma vesícula. A cima, o mecanismo de transferência difusional. Abaixo, o mecanismo de transferência colisional. Adaptado da referência (33).

DPPC e DMPC a 25 °C, na fase gel e fluida respectivamente, não influenciaram a taxa de entrega do ácido graxo pela L-FABP, mas para a I-FABP houve um acréscimo de quatro vezes na taxa de entrega do ácido graxo para a membrana na fase gel (34). As variações da taxa de entrega do ácido graxo encontrados por esses autores para diversas composições lipídicas demonstram que a célula dispõe de diferentes mecanismos de controle e que domínios lipídicos específicos podem funcionar como alvo da entrega do ácido graxo.

Experimentos posteriores trataram do caminho inverso: a captura do ácido graxo de modelos de bicamada por FABPs (39). Nesses experimentos também foi verificado que a remoção do ácido graxo ocorre por mecanismos diferentes para a L-FABP e I-FABP. Para a L-FABP, foi verificada uma transferência por um mecanismo difusional, semelhante a uma transferência de ácido graxo de vesícula para vesícula

(SUV para SUV)^a. Outra evidência por esse mecanismo foi que o aumento da concentração de aceitadores, no caso a L-FABP, não influenciou significativamente na taxa de transferência. Novamente, o aumento da concentração de sal no meio aquoso influenciou a taxa de captura do ácido graxo da vesícula de POPC pela L-FABP. Isto ocorre devido a uma dificuldade de solubilização de moléculas anfifílicas em meio salino (*salting-out effect*). O coeficiente de partição relativo do ácido graxo encontrado pelos autores para uma composição L-FABP:POPC-SUV (mol:mol) foi de 18:1, indicando uma forte preferência pela proteína. Todos os experimentos foram realizados a 24 °C e pH 7,4.

Neste mesmo trabalho, foi observado para a I-FABP que o coeficiente de partição relativo encontrado para o ácido graxo foi em torno de dez vezes mais baixo do que na L-FABP na composição I-FABP:POPC-SUV. A taxa de transferência de ácido graxo de SUVs doadoras também foi independente da concentração de I-FABP aceitadora, mas foram de duas a três vezes maiores do que a transferência de ácido graxo de SUVs para a L-FABP. Porém, quando se aumenta a quantidade de SUVs doadoras, a taxa de transferência para a I-FABP aumenta linearmente com a concentração de SUVs. Enquanto a composição lipídica pouco influencia a taxa de transferência da SUV para a L-FABP, na I-FABP uma SUV de 25% mol de cardiolipina incrementou em quinze vezes a taxa de transferência em relação à SUVs de POPC. Para SUVs feitas com PS e POPG favoreceu um aumento da taxa de transferência do ácido graxo de duas a três vezes. Também para uma composição molar com 10% de PE e 25% de cardiolipina verificou-se um aumento da taxa de entrega do ácido graxo da SUV para a I-FABP. Como essa composição não altera a carga líquida da rede de fosfolípidios, os autores concluíram que o ordenamento do lipídio, alterado pela presença do PE, foi o motivo do aumento da taxa de entrega.

Esses experimentos levaram os autores a acreditarem que a conformação adotada pela I-FABP para entrega do ácido graxo é diferente da conformação adotada para a sua captura, e hipotetizaram que a mudança conformacional sofrida pela I-FABP para o sequestro do ligante da membrana ocorre mais lentamente do que a formação do complexo proteína-membrana, sendo este o motivo que limita a taxa de transferência do ácido graxo da membrana para I-FABP. Isso é suportado

^a SUV – *Small Unilamellar Vesicle*

pelos diferentes estruturas tridimensionais da proteína obtidas tanto na forma *apo*, como na forma *holo* (40). Essas estruturas demonstraram mudanças conformacionais na proteína, principalmente na região das hélices. Contudo, até hoje não foi possível se obter uma estrutura da FABP complexada com a membrana fosfolipídica com ácido graxo e/ou sem ácido graxo.

1.4.1 Estrutura e Topologia das FABPs

A estrutura dessa proteína já foi extensivamente estudada por difratometria de raios-x em cristais de proteína e por RMN tanto na forma *apo* como na forma *holo*. As estruturas encontradas para as FABPs foram bem semelhantes, compartilhando um mesmo motivo tridimensional para a entrega e captura do ácido graxo, com uma conservação média dos resíduos em torno de 50%. As diferenças encontradas foram mais presentes nas regiões das voltas- β .

Um esquema topológico característico de proteínas FABPs pode ser visto na Figura 11. Ele consiste de 10 fitas- β antiparalelas que costumam variar de 4 a 10

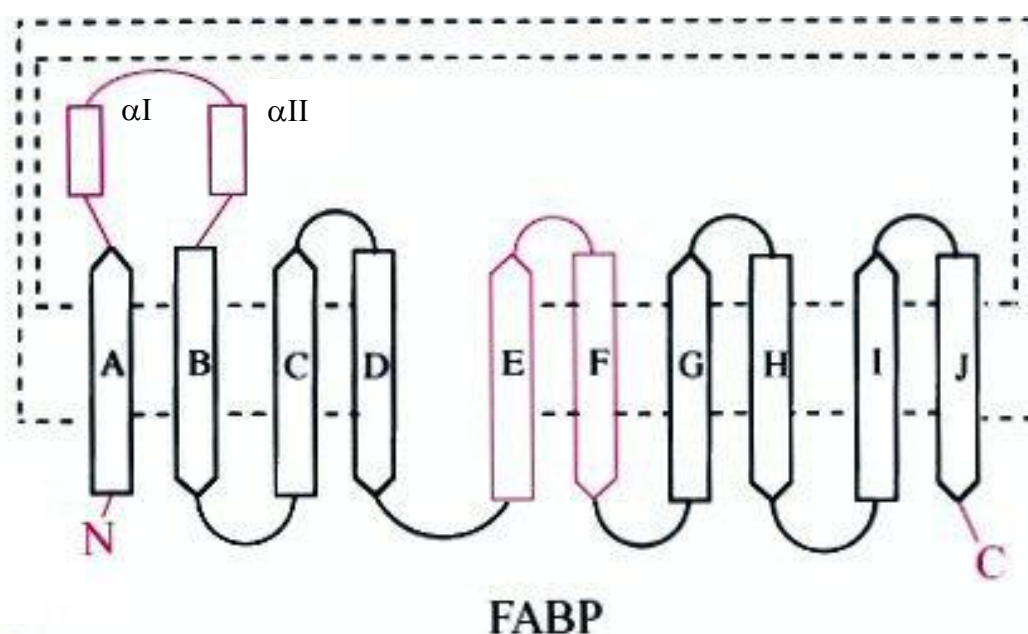


Figura 11 - Representação do esquema topológico de uma FABP. As duas folhas- β formadas pelas fitas- β ABCD e EFGHIJ fecham-se formando um barril- β . A ausência de linhas pontilhadas entre as fitas- β D e E representa a ausência das ligações de hidrogênio para essas fitas. Adaptado da referência (30).

resíduos e nomeadas de A a J. Tais fitas estão arranjadas em 2 folhas pregueadas quase ortogonais formando um barril- β . A estrutura deste barril é mantida por uma sequência de ligações de hidrogênio que conectam os resíduos de fitas- β vizinhas, com exceção das fitas β D e β E (32).

Esta ausência de ligação de hidrogênio permite o preenchimento desse espaço com as cadeias laterais dos resíduos dessas duas fitas- β . Outra característica da estrutura são as duas hélices antiparalelas α I e α II na região N-terminal, formando um motivo hélice-loop-hélice, uma espécie de tampa ou portal do barril.

As proteínas ligantes de ácido graxo adipocito (A-), cérebro (B-), epiderme (E-), coração (H-) FABP são as que apresentaram maior grau de identidade seqüencial dentro da família das FABPs. Contudo, a I-FABP, também compartilha algumas propriedades com essas outras FABPs, como a estrutura geral da proteína e das moléculas de água no seu interior, sua afinidade por ácidos graxo e a interação com modelos de membrana na entrega e captura de ácido graxo. Em especial, a H- e M-FABP tem sido as mais estudadas da família das FABPs, sendo estas as que possuem o maior grau de semelhança com a B-FABP.

Diferente de proteínas globulares usuais, as FABPs possuem em seu núcleo, uma cavidade com moléculas de água. Os dados estruturais, tanto de RMN como de difratometria, da A-, I-, H- e M-FABP demonstraram que poucas moléculas de água são deslocadas após a ligação com o ácido graxo, e que muitas dessas moléculas próximas da cauda alifática mantinham-se na mesma posição tanto na forma *apo* como na *holo* da proteína. Num trabalho com a M-FABP foi observado e enfatizado que a estrutura desta proteína, resolvida por difratometria de raios-X, possui uma rede de ligações de hidrogênio envolvendo as moléculas de água (41). Essas moléculas interagem com os grupos ionizáveis ou polares das cadeias laterais e com a cadeia principal dos resíduos no interior da cavidade. Mais especificamente, essa rede de ligações de hidrogênio envolve moléculas de água e as cadeias laterais dos resíduos R106, R126 e Y128 do sítio de ligação do ligante, estendendo-se, ainda até os resíduos E72 e D76. Estes dois últimos resíduos estão próximos do *GAP* entre as fitas- β D e E e conectam a rede molecular de água do interior da cavidade da H-FABP com o solvente externo. Mais ainda, num trabalho de RMN com a H-FABP bovina, foi verificado que a troca dessas moléculas de água com o solvente é muito lenta (42). Esses autores observaram que os prótons da cadeia lateral da T74, S82 e

H93 são inacessíveis ao solvente tanto na forma *apo* quanto na forma *holo*. Estudos de dinâmica molecular demonstraram que a taxa de troca das moléculas de água, enterradas nessa cavidade, com as moléculas do solvente podem ser até duas ordens de grandeza mais lenta do que a taxa de troca das moléculas de água na superfície externa da FABP com o solvente (40).

Tal casca de moléculas de água em contato com os resíduos hidrofílicos no interior da cavidade é posicionada entre a cadeia acil do ligante e estes resíduos da proteína. Estas moléculas de água promediam a ligação da proteína com o ácido graxo, que também possui o grupo carboxilato interagindo diretamente ou através de moléculas de água com os resíduos conservados R126 e a Y128. Já a cauda de carbono do ácido graxo faz interação de van der Waals com resíduos hidrofóbicos ou com moléculas de água que estão ligadas em resíduos polares no interior da cavidade.

1.4.2 Dinâmica da FABP

Muitos estudos de dinâmica de proteínas, boa parte realizados por RMN, conduziram a um questionamento de qual é o papel da dinâmica dos resíduos de uma proteína em sua função. Em contraste ao mecanismo de *induced-fit*, tradicionalmente lecionado e inserido em muitos livros de Bioquímica, foi postulado um mecanismo alternativo de *selected-fit* para a interação proteína-proteína ou proteína-ligante (43). Esse mecanismo de ligação alternativo é fundamentado nos diversos estados conformacionais adotados por certas proteínas, ou parte dela, para uma mesma energia. Nesse modelo, o estado ligado é atingido por uma interação do ligante com a proteína em uma dessas conformações possíveis.

Alguns trabalhos realizados por RMN com as FABPs mostraram que certos resíduos dessa família de proteínas possuem uma flexibilidade natural, inclusive populando mais de uma conformação acessível (44, 45). Porém, Constantine *et al* concluíram que existe um “*dynamic induced-fit*” relacionado à variabilidade conformacional de certos resíduos dessa família de proteínas (44).

Essa dinâmica relativamente lenta, com mais de uma conformação estável visualizadas por espectros de RMN, parece ter uma função nas FABPs. Em um trabalho com a I-FABP foi observado que esta proteína na forma *apo* possui diferenças significativas da forma *holo* na dinâmica dos seus resíduos (46). Também foi observada mais de uma conformação para certos resíduos dessa FABP. Mais ainda, simulações de dinâmica molecular com os ligantes miristato, palmitato e oleato, (47) constataram que diferentes resíduos estão envolvidos na ligação com diferentes ligantes e que moléculas de água participam diretamente e de maneiras distintas nessa interação (30).

A região do portal

Os resultados acima descritos parecem estar relacionados com a função de entrega, transporte e captura do ácido graxo pela maquinaria celular. Para isso, a célula dispõe de diversas FABPs, cada uma delas envolvendo variações de resíduos específicos, favorecendo alterações finas tanto nos motivos estruturais da proteína como também na sua dinâmica. Isto permite a modulação da interação da proteína com o ácido graxo e/ou membrana lipídica, controlando a entrada e saída do ligante de proteínas distintas ou de domínios específicos da biomembrana.

Diversos trabalhos sinalizaram a região das hélices e dos loops em contato com elas como sendo uma “tampa” ou “portal” pelo qual o ligante é internalizado ou externalizado pela FABP de forma controlada. Em um desses trabalhos, uma variante mutante da I-FABP sem as hélices- α foi construída por engenharia genética (37, 48). Esses autores observaram que a taxa de transferência do ácido graxo para a membrana foi diferente para a I-FABP e para a sua variante sem as hélices do portal. Ambas as I-FABPs tiveram um comportamento parecido quando incubadas em vesículas unilamelares pequenas (SUV) constituídas de fosfatidilcolina de ovo e de 1-palmitoil-2-(12-((7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino)dodecanoil)-sn-glicero-3-fosfocolina (EPC:NBD), ou seja, sem carga elétrica líquida. Mas, quando as vesículas eram carregadas negativamente com o uso de fosfatidilserina (PS) ou cardiolipiana (CL), a I-FABP nativa foi até 10 vezes mais eficiente na transferência do ácido graxo para a vesícula. Além disso, o uso do citocromo-c como agente

competidor na ligação com a bicamada demonstrou que a I-FABP desprovida das hélices é deslocada facilmente pela presença do citocromo-c.

É conhecido da estrutura das FABPs que a hélice- α II possui interações terciárias com a volta- β localizada entre as fitas- β C-D, provavelmente sendo um elemento chave no mecanismo de funcionamento da região do portal. As estruturas obtidas por RMN da forma *apo* e *holo* da I-FABP mostraram que na ausência do ligante, essas estruturas estão mais desordenadas e com menos interações terciárias do que quando o ligante está na proteína. Um trabalho com mutantes envolvendo resíduos localizados na hélice- α II também demonstrou que a taxa de entrega do ácido graxo foi aumentada em quatro vezes quando introduzido uma carga positiva nesta hélice através da mutação T28K, resultado similar ao obtido para a A-FABP, que possui uma lisina na hélice- α II (49). A mutação K59I da I-FABP, também levou a um aumento de duas vezes na taxa de entrega em relação à proteína nativa. Já os mutantes K22I e K22E diminuíram em três vezes essa transferência e a proteína mutante não foi mais sensível às características lipídicas da membrana aceitadora (49).

Essas propriedades das FABPs são consistentes com a especificidade da ligação com a membrana alvo, como também com o ligante. A interação da proteína com seu alvo parece ocorrer através de uma transição conformacional da região do portal em um processo multi-estágio indo de um estado fechado, mais rígido, para um estado aberto e mais desordenado, quando em contato com fosfolípidos. Além disso, a formação do complexo proteína-membrana durante o processo de captura do ligante é diferente da formação do complexo proteína-membrana para o processo de entrega para a membrana alvo. Uma possibilidade é que essa variação conformacional induza a participação de resíduos distintos para a formação desses dois diferentes complexos proteína-membrana.

1.4.3 A proteína ligante de ácido graxo do cérebro humano (B-FABP)

As células que compõem o tecido cerebral possuem na estrutura da membrana fosfolipídica alta concentração dos ácidos araquidônicos, do DHA e do EPA.

Diversos estudos citam que a deficiência de ácidos graxos n-6, como o DHA, é compatível com mudanças do comportamento, eletroretinograma alterado, decréscimo da atividade visual e da capacidade de aprendizado (50). Pela modulação da concentração de ácidos graxos também foi demonstrado que é possível se influenciar a expressão gênica, o crescimento celular e a função de enzimas, canais iônicos, membranas e receptores (51). Há um consenso de que a produção da B-FABP está envolvida em um sistema de captura, transporte e entrega de ácidos graxos tanto para o DHA como o EPA, ou dos precursores requeridos para a formação do DHA. Este papel para B-FABP garante um fornecimento contínuo de DHA para o desenvolvimento do sistema nervoso central. Experimentos visando silenciar a expressão da B-FABP também foram compatíveis com mudanças do comportamento (52).

Para a B-FABP humana, a ligação do DHA e do ácido oléico acontece de formas ligeiramente diferentes. Na Figura 12 a seguir temos a região do sítio ativo obtida da estrutura cristalográfica desses dois complexos de proteína-ligante (53). A cadeia acil do ácido oléico interage mais com as cadeias laterais dos resíduos hidrofóbicos da proteína. Na região de insaturação, região da ligação dupla entre os carbonos 9 e 10 (C9=C10) da cadeia acil, o contato de van der Waals (VDW) desta região ocorre com o resíduo F16 da B-FABP. Além deste resíduo, os resíduos V25, T29, G33, S55, F57, K58, T60, A75, D76, F104 e M115 também realizam contatos (VDW) com a cadeia acil do ácido oléico. Já o DHA, além destes mesmos resíduos, a sua cadeia acil também possui contatos com os resíduos Y19, M20, L23, V32,

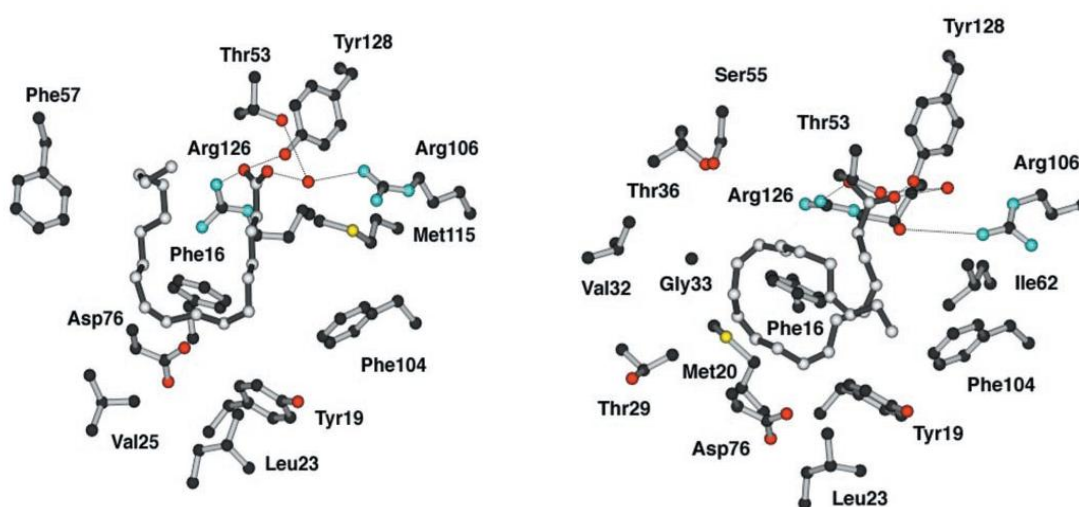


Figura 12 - Sítio ativo do ácido oléico (figura da esquerda) e do DHA (figura da direita) na B-FABP. Em destaque, os resíduos que participam da acomodação do ácido graxo no sítio ativo da proteína. Adaptado da referência (50).

T36, I62, E72, T73, T74, R78, Q95, L117, com exceção para os resíduos F57, K58 e M115 que estão em contato com o ácido oléico e não realizam essa interação com o ácido DHA. No DHA, a insaturação C4=C5 é mantida em contato com o anel aromático da F104. Diferentemente do ácido oléico, que possui apenas uma insaturação, as outras insaturações C7=C8, C10=C11, C13=C14, C16=C17 e C19=C20 do DHA formam ligações internas entre elas mesmas, ajudando na estabilização helicoidal adotada por esse ácido graxo no interior da B-FABP. Ambas as ligações da cabeça polar desses ácidos se dão diretamente com as cadeias laterais dos resíduos R126 e Y128 e, com a mediação de uma molécula de água, com os resíduos R106 e T53. É essa sinergia das interações hidrofóbicas e entálpicas (eletrostática e de vdw) que determina a alta seletividade da B-FABP com esses dois ligantes e a função dessa proteína no transporte do ácido graxo na maquinaria celular.

Assim como na H-FABP, a B-FABP também possui uma rede de ligações de hidrogênio feitas pelas moléculas de água no interior da proteína. O alinhamento das sequências da B-FABP e H-FABP podem ser visualizados na Figura 13 a seguir:

```

      1      10      20      30      40      45
      |-----+-----+-----+-----+-----|
H-FABP  DAFLGTHKLVDSKNFDDYMKSLGVGFATRQVASHTKPTTIIIEKNG
B-FABP  EAFCATHKLTNSQNFDEYMKALGVGFATRQVGNTKPTVIISQEG
I-FABP  FDSTHWYDRSENYDKFHEKMGVNIYKRKLAAHDNLKLITQEG
Consensus .aF..THK1..S.N%D.%k.$GYgfatRqva..tkpt.iI.q#G

      46      55      65      75      85      90
      |-----+-----+-----+-----+-----|
H-FABP  DILTLKTHSTFKNTEISFKLGVFEDETTADDRKYKSIYTLDGGKL
B-FABP  DKVYIRTLSTFKNTEISFQLGEEFDETTADDRNCKSVVSLDGDKL
I-FABP  NKFTYKESSAFRNIEVVFELGVTFNYNLADGTELRGTSLEGNKL
Consensus #k.t.kt.StFkNtE!sF.LGveF#ettADdr..ks.vsL#G.KL

      91      100      110      120      130133
      |-----+-----+-----+-----+-----|
H-FABP  VHLQKH--DGQETTLVRELIDGKLILTLTHGTAVCTRTYEKEA
B-FABP  VHIQKH--DGKETNFVREIKDGKMYMTLTFGDVVAVRHYEKA
I-FABP  IGKFKRTDNGNELNTVREIIGDELVQTYVVEGVEAKRIFKKD
Consensus !h.qKw..#G.Etn.VREiidgk$.Tlt.g.vva.R.%eK..

```

Figura 13 - Sequência das proteínas humanas H-FABP, B-FABP e I-FABP. Em vermelho, temos as regiões bem conservadas. Em azul, temos as regiões pouco conservadas. Em preto, temos as regiões não conservadas. Os símbolos %, !, \$ e # são usados para uma conservação dos resíduos F ou Y (%), I ou V (!), L ou M (\$) e N, D, Q e E (#). Alinhamento usando multalin < <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>>.

Podemos observar que os resíduos T53, E72, T74, D76, S82, H93, R106, R126 e Y128 com que as moléculas de água interagem na H-FABP são resíduos conservados na B-FABP. Com exceção da S82 e H93, todos eles fazem parte do sítio ativo do ácido oléico ou do DHA na B-FABP. Outra característica marcante é a variação nos resíduos que compõem o cap c-terminal de ambas as hélices. Na hélice- α I temos um resíduo hidrofílico, a S22 (H-FABP), substituído pelo resíduo hidrofóbico alanina (B-FABP) e lisina (I-FABP). Na hélice- α II temos a sequência de resíduos A33-S34-M35 (H-FABP) substituída pela sequência G33-N34-V35 (B-FABP) e H33-D34-N35 (I-FABP). Já os resíduos pertencentes às voltas- β na região do portal são idênticos, exceção para I-FABP que possui em uma de suas volta- β não conservação (resíduos F119-V122 na B-FABP). São essas semelhanças e diferenças entre a H-FABP, I-FABP e B-FABP que possibilitam um estudo comparado entre elas.

Até hoje, não há uma estrutura da FABP complexada em uma bicamada lipídica. Com isso, não há informação a respeito da estrutura e dinâmica da bicamada lipídica e da FABP neste complexo. Contudo, com o uso de técnicas para obtenção de bicelas isotrópicas é possível a realização de um estudo por RMN da proteína na presença destes modelos de membrana. Marcações sítio dirigidas em proteína mutante (*Site Directed Spin Label*) também podem fornecer informação a respeito da estrutura e dinâmica da B-FABP na presença de uma bicamada lipídica.

Sendo assim, nesse trabalho, estudamos a interação da B-FABP com modelos de membrana visando preencher essa falta de informação para este sistema. Para isto, utilizamos da técnica de RMN e de RPE tanto em membranas marcadas como na proteína marcada.

Objetivos

2 Objetivos

Apesar da grande quantidade de experimentos com as FABPs, pouco se sabe sobre o complexo FABP-membrana, sendo que até hoje não há uma estrutura 3-D da FABP complexada em uma bicamada lipídica. Na tentativa de obtermos mais informação sobre tal sistema proteína-membrana, utilizamo-nos de bicelas isotrópicas e da técnica de RMN para a realização de tais estudos. A técnica de RPE com o uso de marcadores magnéticos em vesículas também foi utilizada na tentativa de caracterizarmos a bicamada lipídica na presença da FABP. A proteína escolhida para tais estudos foi a B-FABP humana.

Com isso, pretendemos fornecer mais subsídios para a compreensão dos mecanismos envolvidos para o funcionamento desta família de proteínas na entrega e captura de ácidos graxos, e na ligação com a membrana lipídica na maquinaria celular.

Materials e Métodos

3 Materiais e Métodos

3.1 Clonagem da B-FABP

Com a finalidade de expressar a B-FABP humana em bactéria, foram sintetizados oligonucleotídeos específicos (descritos abaixo) baseados na sua seqüência codificante, depositada no GenBank sob o número de acesso D88648. Os oligonucleotídeos, além de flanquearem a seqüência de interesse, também possuíam sítios para as endonucleases de restrição, *NdeI* e *XhoI*, que permitiram a clonagem no vetor de expressão bacteriano pET28a.

Em uma colaboração com a Prof. Dra. Paula Ulian Araujo e a especialista de laboratório Andressa P. Alves Pinto, do Grupo de Biofísica “Sérgio Mascarenhas”, no Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, inicialmente foi isolada a ORF (fase aberta de leitura) da B-FABP utilizando-se como molde 1,0 µg de uma biblioteca de cDNA de cérebro fetal humano (Invitrogen), juntamente com 1,0 µM dos oligonucleotídeos flanqueadores (B-FABP F-*NdeI* e B-FABP-R-*XhoI*), 0,2 mM de dNTPs, 1 unidade de *High Fidelity PCR Enzyme Mix* (Fermentas), 5 µL de 10X *High Fidelity PCR Buffer + MgCl₂* (Fermentas) e água para volume final de 50 µL. A reação de amplificação foi realizada em termociclador (*Mastercycler gradient Eppendorf*) sob as seguintes condições: 2 minutos a 94 °C, seguido de 35 ciclos (1 minuto a 94 °C, 30 segundos a 55 °C e 1 minuto e 30 segundos a 68 °C) finalizando com 20 minutos a 68 °C. O produto amplificado de aproximadamente 400 pb foi fracionado em gel de agarose 2%, seguido de purificação com o *kit Wizard SV gel and pCR clean-up system* (Promega), segundo as recomendações do fabricante. O fragmento de DNA purificado foi inserido no plasmídeo pTZ57R/T (*Inst/Aclone™ PCR Product Cloning Kit*- Fermentas) e propagado em células de *E. coli* DH5α. A análise da fidelidade das seqüências foi feita por sequenciamento automático de DNA. O plasmídeo foi então digerido com as enzimas de restrição para liberação do fragmento de DNA desejado, assim como foi feita a linearização do plasmídeo pET28a(+) com as mesmas enzimas (*NdeI* e *XhoI* (Fermentas)). Após a ligação do fragmento codificando a B-FABP ao vetor pET28a, usando a T4 DNA ligase, o novo

vetor de expressão foi utilizado para transformar células de *E. coli* BL21(DE3), a fim de expressar a proteína recombinante.

Primers utilizados para amplificação:

B-FABP F-NdeI	5' TTCCATATGGTGGAGGCTTTCTGTGCTACCTGGAAGC
B-FABP-R-XhoI	5' CCCTCGAGTTATGCCTTCTCATAGTGGCGAACAGCAACCAC

3.2 Expressão e purificação da B-FABP

A proteína B-FABP foi subclonada no vetor de expressão pET28a. A construção foi transformada na célula hospedeira *Escherichia coli* BL21(DE3). Uma única colônia foi usada para inocular 5 mL de meio de cultura Luria-Bertani (LB) contendo 20 µg/mL de kanamicina e deixada para crescer *overnight* a 37° C. O pré-inóculo foi adicionado a 500 mL de meio LB com 20 µg/mL do antibiótico kanamicina. A cultura cresceu a 37° C até que a densidade óptica em 600 nm atingisse 0,5-0,6. A expressão da proteína foi induzida com 250 µM de isopropil-β-D-tiogalactopiranosideo (IPTG). Após 20 horas a 20° C e com 220 rpm de agitação, as células foram centrifugadas a 2.400g e 4° C por 15 minutos. O pelet celular foi armazenado a -20° C ou utilizado imediatamente, suspenso em tampão de lise Tris-HCl 50 mM, 10 mM Imidazol, pH 8,0. As células, em banho de gelo, foram rompidas com 30 s de sonicação intercalado com 60 s de repouso. Essa sequência foi repetida dez vezes. As células rompidas foram descartadas após centrifugação a 20.000g e 4° C por 30 minutos.

Para as medidas de RMN, a B-FABP foi expressa usando o mesmo protocolo. Contudo, utilizamos meio de cultura M9 contendo amônia enriquecida com ¹⁵N e quatro vezes a concentração de glicose usual.

O sobrenadante foi carregado em uma coluna de níquel Ni-NTA e lavado extensivamente com tampão de lise equivalente a dez vezes o volume da coluna e vinte vezes o volume de coluna com tampão de lise mais imidazol 40 mM. A eluição foi realizada com o tampão de lise e com o uso de um gradiente contendo imidazol em 60 mM, 80 mM e 100 mM. Após isso, a proteína teve a cauda de histidina, oriunda da construção utilizada, clivada com a enzima trombina. Um teste de

clivagem foi realizado para determinarmos a melhor quantidade de trombina para a remoção da *His-tag* da B-FABP. Para isso, três tubos de eppendorf com 1 mL de B-FABP, em tampão de lise acrescido de NaCl 100 mM, na concentração de 0,2 mg/mL de proteína cada um, receberam 1,25 µg, 2,5 µg e 5 µg de trombina, com uma relação final trombina:fabp de 1:160, 1:80 e 1:40, respectivamente. Alíquotas foram retiradas regularmente para controle através de eletroforese em gel de tricina.

A concentração da proteína foi determinada com um espectrofotômetro operando no comprimento de onda de 280 nm, utilizando o valor do coeficiente de extinção molar de 0,956 para a B-FABP^b. O rendimento da proteína por litro de cultura foi de cerca de 20 mg. O resultado do processo de purificação foi visualizado através de eletroforese em gel de poliacrilamida em dodecil sulfeto de sódio (SDS).

3.3 Preparação das vesículas

Os fosfolipídeos DMPG (1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-(fosfo-rac-(1-glicerol)) e DMPC (1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina) foram obtidos da empresa Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL, USA), assim como os marcadores de spin fosfolipídicos 1-palmitoil-2-(n-doxil esteroil) fosfatidilcolina (n = 5, 7, 10) e dipalmitoilfosfatidil-tempo-colina (DPPTC). As vesículas de DMPG, DMPC contendo marcadores de spin foram feitas a partir de soluções estoque em clorofórmio. Volumes adequados a cada experimento foram secados sob um fluxo de N₂ no interior de tubos de ensaio. Posteriormente, as amostras foram mantidas em pressão reduzida por 3 horas para retirar vestígios de clorofórmio. As vesículas foram preparadas pela adição da solução tampão com a desejada concentração de sal. Com um bastonete de vidro, o filme-fino de lipídeo foi solto da parede de vidro dos tubos de ensaios, seguido por agitação em vórtex na temperatura de 22° C. As amostras foram colocadas em banho quente e sonicadas por 1 hora acima da transição de fase dos lipídeos. Todas as soluções vesiculares tornaram-se translúcidas durante a sonicação. A concentração final dos marcadores foi de 70 µM

^b Esse valor foi obtido do programa de bioinformática ProtParam <<http://ca.expasy.org>>

em 100 μ L, sendo separadas em duas partes: uma completada com tampão e a outra com tampão mais proteína.

3.4 Preparação da proteína com ácido graxo marcado

O marcador 4-(N-N-dimetil-N-hexadecil) amônio-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil-iodado (CAT-16) e o ácido esteárico de cadeia marcada n-doxil (n = 5, 12, 16-SASL) foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). As soluções dos marcadores de spin dissolvidos em clorofórmio foram secadas no interior de tubos de ensaio sob a ação de um fluxo de nitrogênio N₂. Posteriormente, foram mantidas em pressão reduzida por 3 horas para remoção de vestígios de clorofórmio. Em seguida, uma solução de proteína em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 foi adicionada ao filme seco. Com o uso de um bastonete de vidro o filme de ácido esteárico foi removido da superfície interna do tubo de vidro e a solução foi gentilmente homogeneizada. A razão final de proteína e marcador de spin foi P:SL = 4, com a concentração de ácido esteárico marcado igual a 40 μ M. A solução proteína-ácido esteárico marcada com o 5-SASL também foi titulada com SDS nas concentrações finais de SDS em 3 μ M, 10 μ M, 100 μ M, 500 μ M, 1 mM, 1,5 mM, 2 mM, 4 mM, 6,5 mM e 10 mM para a medida do espectro de RPE.

3.5 Medidas de espectroscopia por RPE

As medidas de RPE foram realizadas com um espectrômetro VARIAN E-109. Uma célula chata com a solução protéica e/ou lipídica foi utilizada para o acondicionamento da mistura vesícula, vesícula/proteína e proteína/ácido esteárico. Espectros de RPE dos marcadores de spin foram adquiridos na banda-X (9,5 GHz) e em uma temperatura de 22 °C. Outros parâmetros de aquisição foram: amplitude de modulação de 1,0 G, frequência de modulação de 100 kHz, potência de microndas em 20 mW e uma verredura de campo de 100 G.

3.6 Preparação das bicelas

Os fosfolípidios liofilizados (AVANTI Polar Lipids) DMPC (1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina) e DHPC (dihexadecilfosfatidilcolina) foram misturados numa razão de 1:1, com uma concentração lipídica $C_L = 8\%$ ^c para uma concentração final de 140 mM tanto para o DMPC como para o DHPC, para um volume de 1 mL em 50 mM de fosfato de sódio, 100 mM de cloreto de sódio NaCl e 0,5 mM de EDTA e 10% ²H₂O em pH 7,0. Após homogeneizar o lipídeo e o tampão, a solução foi colocada em um sonicador por 30 minutos. Após a sonicação, a seguinte sequência foi realizada: congelamento em nitrogênio líquido, aquecimento a 60° C seguido por 10 minutos de sonicação até a mistura lipídica adquirir uma configuração transparente e mais homogênea. A solução de bicelas foi armazenada em freezer a -80 °C. A amostra proteína/bicela foi preparada retirando 250 µL da solução lipídica e os adicionado a 250 µL de solução de proteína expressa em meio mínimo M9 (com ¹⁵N), obtendo uma C_L final de 4% e uma concentração final protéica de 150 µM na solução.

3.7 Remoção do ácido graxo da B-FABP

Para remoção de um eventual ácido graxo internalizado na proteína B-FABP durante o processo de expressão, a solução protéica foi misturada com uma solução lipídica de DMPC na concentração final de 10 mM em tampão fosfato de sódio 50 mM e pH 7,0. Para remoção do lipídeo, a amostra foi ultra centrifugada a 300.000g por uma hora. Este procedimento foi realizado duas vezes (incubação em vesícula

^c A C_L é obtida pela seguinte fórmula:
$$C_L = \left(\frac{m(DMPC) + m(DHPC) + \dots}{m(Buffer)} \right)$$
, onde m é a massa da substância.

de DMPC), seguido de duas ultracentrifugações para a remoção do excesso de lipídeo da solução. Depois, a solução protéica foi colocada em uma resina lipidex 1000 (PerkinElmer - EUA), à temperatura de 25° C, *overnight*, para remoção de vestígios de lipídeos. A remoção dos lipídeos foi observada com o uso de experimentos ^{15}N -HSQC por RMN.

3.8 Medidas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

O experimento 1-D

Os núcleos magnéticos possuem uma largura espectral, ou seja, um intervalo de freqüências de ressonância característico, sendo a localização da linha de ressonância dentro desse intervalo dependente do ambiente químico que o núcleo em estudo experimenta. Uma forma rápida e simples de obter um espectro de RMN, numa amostra em um espectrômetro moderno, é a excitação em paralelo dos núcleos com um pulso não seletivo. Isso é possível com um pulso curto no domínio do tempo em relação às freqüências de ressonância características do sistema em estudo. Este pulso no domínio das freqüências será representado por uma superposição de ondas de diferentes freqüências e amplitudes, podendo interagir ressonantemente com os spins nuclear em estudo. Uma vez os núcleos excitados e com a magnetização fora do equilíbrio pela absorção de energia do pulso de excitação, a magnetização relaxa buscando o equilíbrio. O sinal gerado na bobina de detecção (lei de faraday) pela relaxação da magnetização é o *FID* (do inglês: *Free Induction Decay*). Este sinal é gerado pela magnetização transversal, a componente ortogonal ao campo magnético principal. Esta magnetização é resultante de uma superposição das várias freqüências e intensidades associadas aos núcleos magnéticos em diferentes ambientes químicos. O *FID* é gravado no domínio do tempo, e isto permite integrar o sinal com a repetição (acumulações) do experimento, aumentando a razão sinal-ruído. Como o *FID* está no domínio do

tempo, para obter o espectro de RMN, é necessário realizar uma transformação matemática no *FID* gravado. Essa transformação permite obter as frequências e suas respectivas amplitudes presentes no *FID*. Essa manipulação matemática dar-se o nome de transformada de Fourier

A construção da segunda dimensão

Em experimentos bidimensionais, a construção da segunda dimensão (dimensão indireta) pode ser realizada adicionando-se ao experimento 1-D um período de evolução t_1 e um período de mistura (Figura 14). O período t_1 é variado progressivamente e em cada período de aquisição um *FID* é adquirido. A quantidade de períodos t_1 define o número de linhas do espectro 2-D, ou seja, a resolução da segunda dimensão (dimensão indireta). A intensidade e variação do sinal, para cada *FID* gravado, será uma função S de t_1 e t_2 . A Transformada de Fourier de $S(t_2, t_1)$ em relação a t_1 e t_2 fornece o espectro bidimensional desejado.

Em experimentos 2-D heteronucleares, o espectro resultante (Figura 14) possui picos fora da diagonal, resultado da transferência de coerência entre os spins ocorrida durante o período de mistura por algum mecanismo de interação. Dependendo do tipo de mistura, caminhos de relaxação distintos podem ser escolhidos, e as correlações dos picos no espectro bidimensional de RMN terão significados diferentes. Os dois mecanismos mais importantes são: a interação dipolar (pelo espaço) e o acoplamento escalar (pela ligação química). Explorando esses mecanismos de transferência de coerência, os experimentos básicos 2-D foram formulados, sendo que cada um deles traz informações distintas e complementares da amostra em estudo. Em particular, no presente trabalho, utilizamos experimentos ^{15}N -HSQC que correlaciona a ressonância do próton ligado ao ^{15}N , resultando em uma “impressão digital” da cadeia principal de uma amostra protéica. Alterações nessas correlações (intensidade, posição) indicam, portanto, mudanças na estrutura ou na dinâmica conformacional da amostra. Variando a temperatura podemos utilizar do experimento ^{15}N -HSQC para sondar o

comportamento da proteína B-FABP humana na presença e na ausência de ligantes e/ou micro-domínios lipídicos, ou seja, as bicelas.

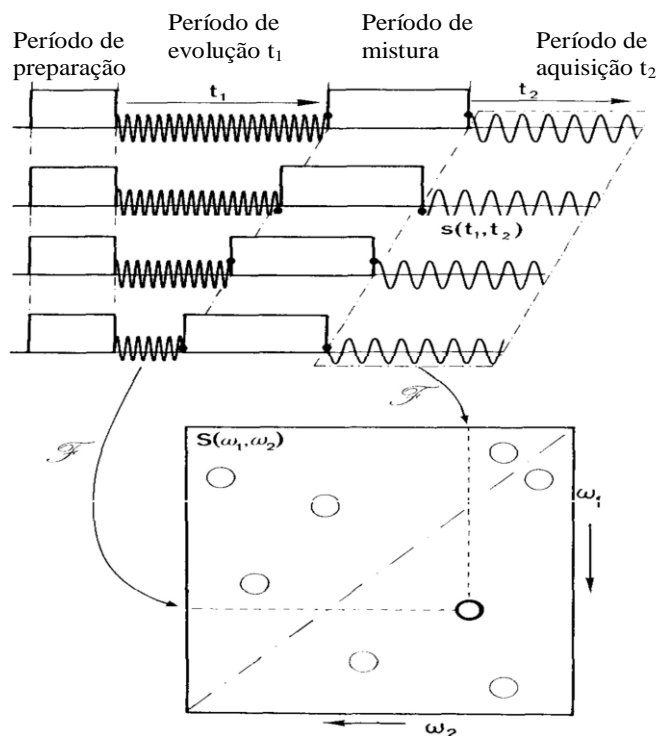


Figura 14 - Esquema mostrando a construção da segunda dimensão, com a inclusão do tempo de evolução t_1 e do período de mistura. Extraído de <http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1991/ernst-lecture.html>

Descrição dos Experimentos

A amostra recombinante marcada com ^{15}N e purificada foi preparada em 150 μM na condição apo e holo, com e sem bicela em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0, NaCl 100 mM, NaN_3 1 mM e 8% D_2O .

Todos os experimentos foram realizados em espectrômetro Bruker AMX 600 gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer (UniRegensburg, Instituto de Biofísica, Alemanha) operando na frequência do próton em 600 MHz, equipado com crio-sonda e com um controlador de temperatura acoplado. O deslocamento químico do ^1H foi referenciado em relação ao ácido 4,4-dimetil-4-

silapentane-1-sulfônico (DSS 50 μM). O deslocamento químico do ^{15}N foi referenciado usando a razão do fator giromagnético entre o ^1H e o ^{15}N . Nas medidas em que não foi possível usar o DSS (interação do DSS com a proteína *apo*), utilizou-se o grupo amido da cadeia lateral do resíduo N34 como referência^d.

Os experimentos bi-dimensionais ^{15}N -HSQC sensível a fase (State-TPPI) e com desacoplamento durante a aquisição foram realizados na proteína marcada. A seqüência de pulso 3-9-19 com o uso de gradientes foi realizada para suprimir o sinal da água. A matrix de dados consistiu de 256 experimentos na dimensão t_1 e 2048 pontos experimentais na dimensão t_2 , com largura espectral de 13,979 ppm para o ^1H e 33 ppm para o ^{15}N . O sinal adquirido (*fid*) foi mediado com a aquisição de 8 scans por incremento em t_1 . Para o processamento dos dados foi usada uma janela Gaussiana com largura de -6 Hz e 4096 pontos, sendo 2048 pontos preenchidos com zeros, para a dimensão t_2 . Para a dimensão t_1 usamos 4096 pontos e uma janela Gaussiana com largura de -8 Hz e predição linear. O valor central da função janela foi ajustado para que ele ocorresse em 12% do tempo de aquisição para a dimensão t_2 e 10% do tempo de aquisição para a dimensão t_1 .

As amostras foram equilibradas na temperatura desejada por pelo menos 15 minutos antes da aquisição dos dados de RMN. Os experimentos foram obtidos em intervalos de 5^o C, da temperatura de 5^o C até 50^o C, seguido no final, por um experimento ^{15}N -HSQC a 25^o C para verificar a integridade e reversibilidade da amostra. Todos os experimentos bidimensionais foram intercalados por espectros unidimensionais. Os dados foram processados usando o programa *TopSpin NMR da Bruker*.

Com isso, o espectro de RMN 2-D ^{15}N -HSQC da B-FABP obtido pode ser mapeado e comparado, nas diversas condições de ligante e/ou modelos de membrana presentes, com o espectro 2-D ^{15}N -HSQC da B-FABP (*pdb 1JJX*) realizado nas mesmas condições por *Rademacher et al (54)*.

^d Este referenciamento do espectro fez parte do projeto de iniciação científica do aluno Ítalo Augusto Cavini

Resultados e Discussões

4 Resultados e Discussões

4.1 Expressão e Purificação da B-FABP

A realização dos estudos espectroscópicos pretendida passou, inicialmente, pela produção da proteína ligante de ácido graxo de cérebro (B-FABP) em sua forma recombinante. Este processo foi feito segundo descrito na seção Materiais e Métodos. Com o objetivo de aperfeiçoar a expressão da B-FABP, testes variando-se a concentração de açúcar do meio M9 (não enriquecido isotopicamente) e a temperatura de expressão foram realizados. Como resultado foi obtido um aumento significativo da expressão quando a concentração de açúcar foi de duas vezes e quatro vezes maior do que o recomendado de 0,4% (m/v) (55). Outro fator que influenciou a expressão protéica foi a temperatura. A expressão a 20° C foi mais eficiente do que aquela realizada em 37° C. Os resultados dessa etapa podem ser visualizados na Figura 15, onde se mostra o gel de eletroforese de poliacrilamida.

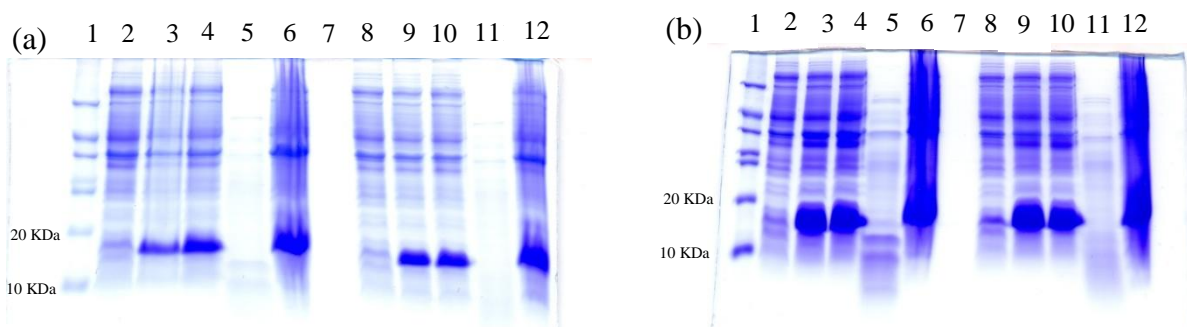


Figura 15 - Resultados do teste de expressão da B-FABP visualizados em gel de eletroforese SDS-PAGE com: (a) quantidade de açúcar recomendada e (b) duas vezes esta quantidade. Na coluna 1 temos o marcador de massa (MWM) externo. Nas colunas 2 e 8, a cultura não induzida com IPTG. Nas colunas 3 e 9, temos o resultado para 6h de expressão após indução. Nas colunas 4 e 10, 24h de expressão. Para as colunas 2,3 e 4 a expressão foi realizada a 22° C. Nas colunas 8,9 e 10 a expressão foi a 37° C. A coluna 7 não foi usada. Nas colunas 5 e 11 temos o sobrenadante do meio de cultura. Nas colunas 6 e 12 temos os pellets.

Assumindo, assim, as condições otimizadas com os experimentos acima, procedemos com a purificação da B-FABP utilizando para isto uma coluna de Ni equilibrada com tampão de lise (v. Materiais e Métodos). A proteína ligada contendo uma cauda de Histidinas se liga à coluna cromatográfica e é, então, submetida a um

gradiente crescente de imidazol de 10 mM até 100 mM, espaçados em intervalos de 10 mM de Imidazol. O resultado deste procedimento pode ser visualizado abaixo (Figura 16).

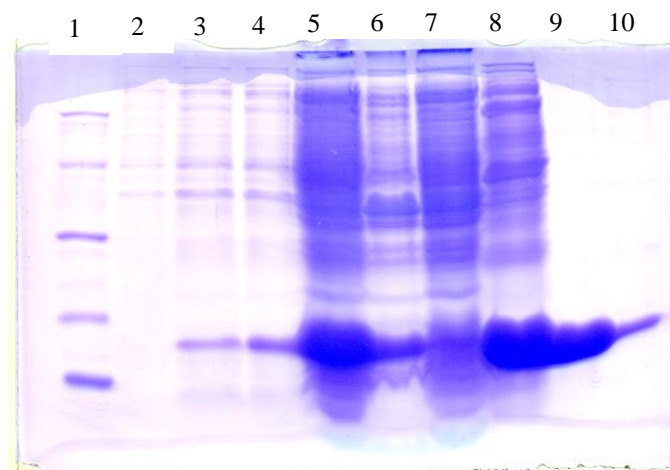


Figura 16 - Resultado da purificação da B-FABP humana apresentados na forma de gel de poliacrilamida SDS-PAGE.. Na coluna 1, temos o marcador de massa molecular (MWM). Na coluna 2, temos o perfil de migração eletroforética das células na ausência do meio indutor. Na coluna 3, temos o perfil para as células após 3:30h. Na coluna 4, o meio celular induzido após 16h. Na coluna 5, é mostrado o perfil de migração do sobrenadante das células lisadas e submetidas a indução por 16h. Na coluna 6, temos o perfil de migração das células após lise e centrifugação. Na coluna 7, temos o perfil eletroforético do lisado não ligado. Nas colunas 8, 9 e 10, temos os resultados após lavagem com 40, 60 e 100 mM de imidazol.

Uma vez de posse da proteína purificada por afinidade, passamos à etapa de remoção da cauda de Histidina presente na estrutura da B-FABP através de sua clivagem com trombina. Para verificarmos a quantidade ótima de trombina a ser utilizada nesse processo, um teste de clivagem foi realizado. Na Figura 17 temos o resultado do teste de clivagem da proteína. O melhor resultado foi alcançado após uma incubação de 24h e utilizando-se 1 μ g de trombina para cada 40 μ g de proteína a ser clivada (Figura 17c).

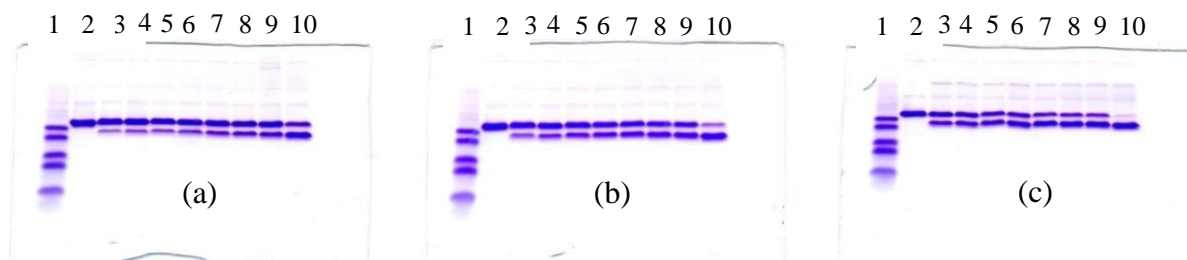


Figura 17 - Resultados do processo de clivagem da cauda de His da B-FABP visualizados em gel de tricina. Uma solução contendo 0,2 mg/mL de proteína em 1 mL de tampão foi incubada com: (a) 1,25 μ g de trombina, (b) 2,5 μ g de trombina, e (c) 5 μ g de trombina. A 1ª coluna é o marcador de massa (MWM), na 2ª coluna temos a proteína sem trombina (0h de clivagem), na 3ª coluna com 2 h, no 4ª

com 3h, no 5^a com 4h, no 6^a 5h, 7^a com 6h, no 8^a com 7h, no 9^a com 8h e no 10^a com 24h de clivagem.

As etapas descritas na presente seção serviram, portanto, para produzirmos a proteína B-FABP em quantidade e grau de pureza adequados aos experimentos de ressonância magnética tanto eletrônica quanto nuclear, cujos resultados estão apresentados nas seções subsequentes.

4.2 Remoção do ácido graxo (delipidação da B-FABP)

Na busca por mudanças conformacionais induzidas pela ligação de uma determinada molécula é fundamental que se tenha um bom experimento controle feito na ausência do ligante e com o qual os dados experimentais obtidos na sua presença possam ser comparados. Para que pudéssemos obter este experimento controle, ou seja, de espectros da proteína na ausência de ácidos graxos, foi necessário que estabelecêssemos um procedimento que retirasse da estrutura protéica moléculas de ácidos graxos que por ventura estivessem presentes ao final dos processos de expressão e purificação da B-FABP.

O processo de remoção do ácido graxo por nós utilizado consistiu da incubação da proteína com um excesso de vesículas lipídicas, seguida de ultracentrifugação e passagem pela coluna Lipidex, comercialmente disponível e usualmente empregada para este fim. A verificação do sucesso deste procedimento se deu através da aquisição de espectros de RMN ¹⁵N-HSQC. Na Figura 18 podemos visualizar uma região ampliada de dois espectros ¹⁵N-HSQC sobrepostos: aquele referente à proteína antes (em verde) e após (em vermelho) o processo de remoção do ácido graxo. Para esta região selecionada, identificamos três resíduos, no caso L117, K9, F104 e Y128, que tiveram seus deslocamentos químicos ($\Delta\delta$) alterados após o processo de delipidação. Em todos estes resíduos podemos observar o surgimento de mais um pico de ressonância após o processo de delipidação da proteína. Os picos duplos associados a cada resíduo e surgidos na vizinhança do pico original, representam uma mudança do ambiente químico vivenciados pelos grupos amida destes resíduos. Como os referidos três resíduos se encontram no sítio de ligação, podemos inferir que passam a experimentar mudança

entre dois ambientes químicos distintos, resultado também da maior liberdade conformacional adquirida com a retirada da molécula de ácido graxo.

Para outras regiões do espectro, também foram identificados outros resíduos que sofreram mudanças semelhantes. As mudanças para todos os resíduos podem ser acompanhadas nos termogramas realizados para a B-FABP na seção 4.6..

O processo de remoção do ácido graxo por nós utilizado consistiu da incubação da proteína com um excesso de vesículas lipídicas, seguida de ultracentrifugação e passagem pela coluna Lipidex, comercialmente disponível e usualmente empregada para este fim. A verificação do sucesso deste procedimento se deu através da aquisição de espectros de RMN ^{15}N -HSQC. Na Figura 18 podemos visualizar uma região ampliada de dois espectros ^{15}N -HSQC sobrepostos:

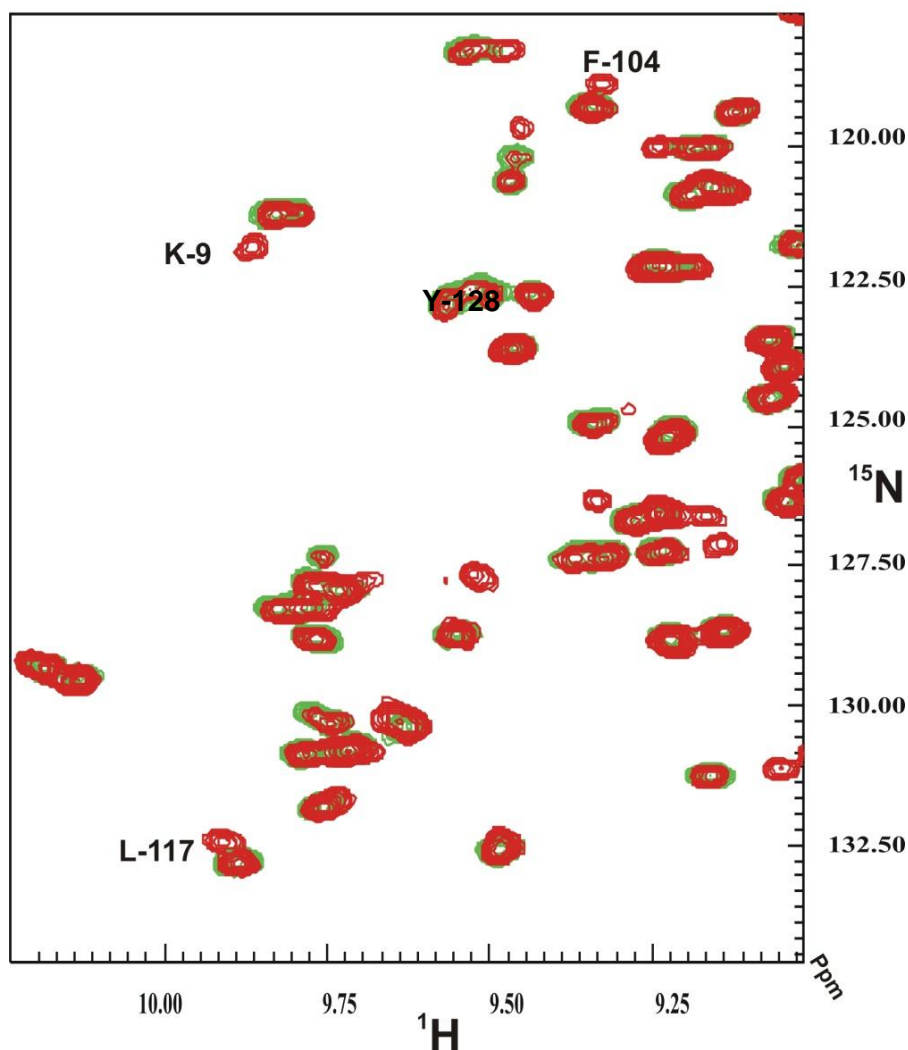


Figura 18 - Espectro ^{15}N -HSQC da B-FABP humana. Os picos em vermelho foram obtidos com a proteína após remoção do ácido graxo conforme descrito na seção materiais e métodos. Em verde temos a aquisição do mesmo espectro sem esse procedimento.

aquele referente à proteína antes (em verde) e após (em vermelho) o processo de remoção do ácido graxo. Para esta região selecionada, identificamos três resíduos, no caso L117, K9, F104 e Y128, que tiveram seus deslocamentos químicos ($\Delta\delta$) alterados após o processo de delipidação. Em todos estes resíduos podemos observar o surgimento de mais um pico de ressonância após o processo de delipidação da proteína. Os picos duplos associados a cada resíduo e surgidos na vizinhança do pico original representam uma mudança do ambiente químico vivenciado pelos grupos amida destes resíduos.

Para outras regiões do espectro, também foram identificados resíduos que sofreram mudanças semelhantes. As mudanças para todos os resíduos podem ser acompanhadas nos termogramas realizados para a B-FABP e mostrados na seção 4.6.

Para comparação, repetimos o processo de delipidação realizado por Glatz e Lucke (45, 56), com subsequente medida dos espectros ^{15}N -HSQC da proteína assim obtida. Na Figura 19, temos uma ampliação do espectro para a região do

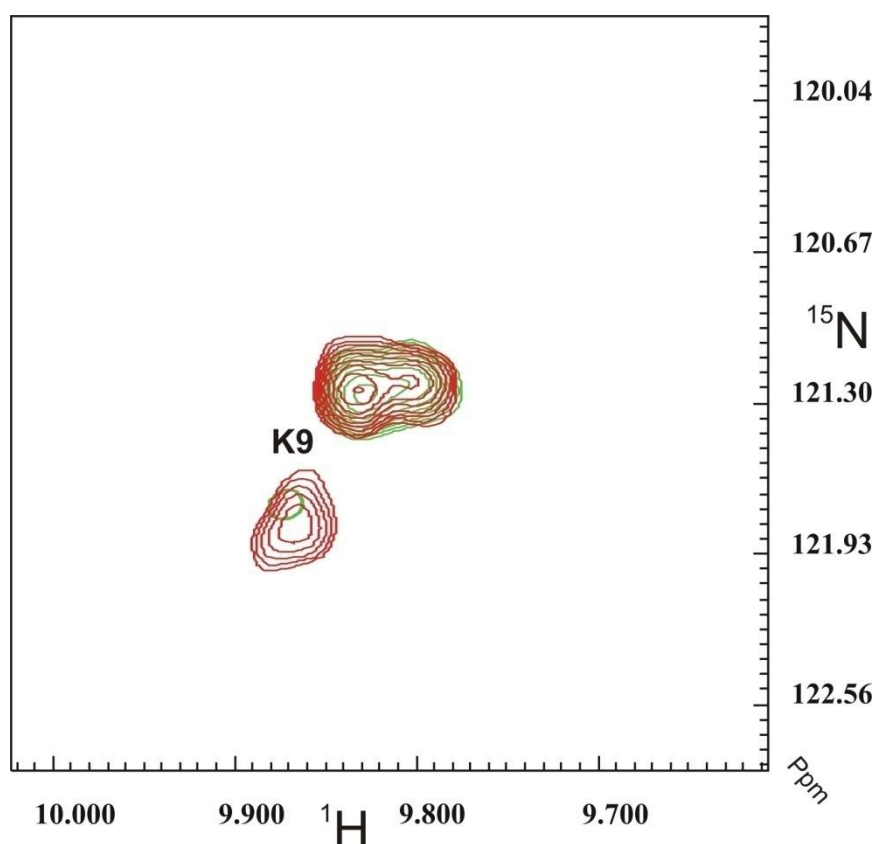


Figura 19 - Espectro ^{15}N -HSQC da B-FABP humana. Os picos em verde foram obtidos com a proteína após remoção do ácido graxo com o uso somente de lipidex, conforme descrito por (45-46). Em vermelho temos a aquisição do mesmo espectro utilizando o procedimento de remoção do ácido graxo descrito em materiais e métodos.

resíduo K9. Podemos observar que o processo de delipidação não foi tão eficiente como o realizado pelo presente trabalho. As mudanças observadas foram menos intensas, além de ocorrerem em um número menor de resíduos. O surgimento de um segundo pico de ressonância para o resíduo K9 foi mais intenso quando houve a incubação da FABP em vesículas, seguido por ultracentrifugação e incubação em lipidex do que quando se utilizou somente a lipidex como sugerido por Glatz e Lucke.

4.3 Interação com as sondas magnéticas 5-, 12-, 16-SASL e CAT-16

A família de proteínas ligante de ácido graxo está vinculada com o transporte e controle dos níveis de ácido graxo no organismo. Em face disto é fundamental obter-se informações a respeito do complexo proteína/ácido graxo e também acerca do processo de entrega e captura do ligante. A constante de ligação da proteína com o ácido graxo foi caracterizada com o uso de diversas técnicas, resultando em um valor em torno de 50 nM para o complexo proteína:ligante (57, 58). Em outro trabalho, usando dinâmica molecular, um modelo da interação da proteína com bicamada lipídica foi realizado na tentativa de melhor compreender a dinâmica da entrega do ácido graxo para a biomembrana (40, 59). Este trabalho somado àquele sobre determinação da estrutura da proteína com o ligante (53) ainda não são dados experimentais diretos do comportamento dinâmico do ácido graxo na proteína.

Com o intuito de aprofundarmos o entendimento do complexo FABP/ligante a partir da perspectiva do ácido graxo, utilizamos moléculas de ácidos graxos marcadas com uma sonda magnética constituída por um radical nitróxido, o que permite acompanhar alterações estruturais e dinâmicas em regiões específicas da cadeia acil do ácido graxo em seu estado ligado à proteína B-FABP com o uso da técnica de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE). Outro dado importante fornecido por esta técnica é o grau de polaridade do microambiente presenciado pelo marcador paramagnético e codificado no parâmetro hiperfino médio. No caso da FABP, é conhecido que ela possui uma rede de ligações de hidrogênio realizadas

por moléculas de água no interior do seu bolsão hidrofóbico (40, 60). Isto confere uma camada de hidratação a certas regiões no interior da proteína. Esta camada de água possui um papel fundamental na interação do ligante com a proteína, direcionando a internalização do ligante.

Os espectros de RPE do ácido graxo marcado nas posições 5, 12, 16 (5-, 12-, 16-SASL) e o da molécula de marcador CAT-16 (extremidade da cadeia) podem ser visualizados na Figura 20. Nestes espectros podem ser observadas duas componentes espectrais correspondentes a uma população de ácido graxo ligado à B-FABP e outra livre em solução. A população livre tem espectros caracterizados por linhas espectrais estreitas e intensas (linhas pontilhadas na Figura 20). A população de ácido esteárico ligada na proteína possui linhas de ressonância mais alargadas e de sinal menos intenso (setas na Figura 20). Ainda na Figura 20 pode ser vistos os espectros de marcadores de spin após tratamento da solução contendo B-FABP com 4 M de uréia (linhas pontilhadas). Estes espectros mostram que a componente com ressonância mais largas (linhas cheias) realmente corresponde a uma população de ácido graxo ligado a B-FABP que, quando desnaturada, acaba

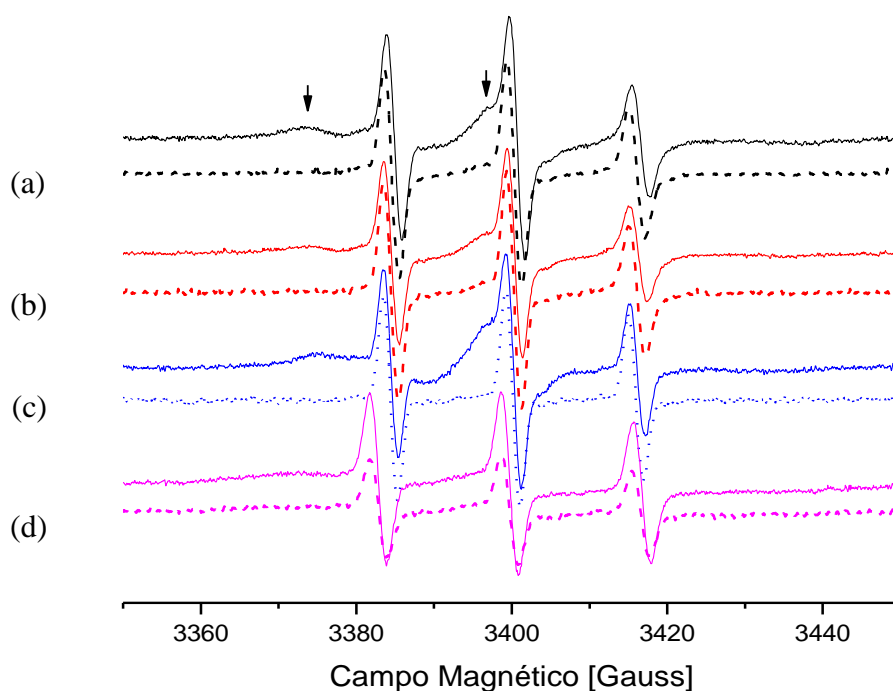


Figura 20 - Espectros de RPE dos marcadores: (a) 5-; (b) 12-; (c) 16-SASL e (d) CAT-16 incubados com B-FABP na razão P:SL = 4. Espectros de linha cheia foram realizados com 30 % sacarose. Em linha pontilhada, em 15% sacarose e 4 M de Uréia. Todas as medidas foram realizadas em tampão Tris-HCl pH 8,0.

liberando o ácido graxo na solução, assim originando os espectros com apenas uma componente.

Uma descrição mais detalhada do ambiente em torno dos marcadores de spin pode ser obtida através do uso de simulações espectrais baseadas no programa NLLS desenvolvido por Freed e colaboradores (61-63). Neste programa, a dinâmica experimentada pela sonda magnética é descrita em termos de um tensor de difusão rotacional \mathbf{R} . Além deste tensor, também são utilizados parâmetros que representam as interações magnéticas relevantes neste tipo de sistema: interação Zeeman, caracterizada pelo tensor giromagnético \mathbf{g} , e a interação hiperfina, caracterizada pelo tensor de acoplamento \mathbf{A} entre o momento magnético nuclear e eletrônico. Parâmetros extras para alargamentos de linha diversos também podem ser utilizados. No nosso caso, usamos o parâmetro Δ_G que é um alargamento de linha Gaussiano. O programa permite, ainda, ajuste de espectros com várias componentes e fornece, ao final, o percentual populacional de cada componente. Para isto partimos do espectro de marcador livre (uma componente). Em seguida, a segunda componente foi introduzida no programa para ajuste. De maneira a evitar mínimos locais durante o processo de minimização, os ajustes foram realizados com vários conjuntos de valores iniciais para a componente ligada.

Na Tabela 2, temos os melhores parâmetros obtidos pela simulação. Os parâmetros importantes fornecidos após a simulação são a taxa de difusão rotacional do ligante (R_{bar}), o parâmetro hiperfino médio a_0 , o percentual da popula-

Tabela 2 - Parâmetros obtidos da simulação dos espectros de RPE dos marcadores 5-, 12-, 16- SASL e CAT-16. Nas células correspondentes a cada marcador, temos os parâmetros referentes às componentes espectrais livre e ligada colocados na primeira e segunda linhas, respectivamente., respectivamente.

Label	Pop.	$R_{bar}(10^9 s^{-1})$	$\tau(ns)$	A_{xx}	A_{yy}	A_{zz}	a_0	%Site	Δ_G
CAT-16*	f	1,851	0,09	6,24	5,50	39,16	16,96	25,9	1,9
	b	0,056	2,96	5,57	6,04	38,16	16,59	74,1	4,7
5-SASL*	f	0,977	0,17	6,24	5,50	35,78	15,84	21,6	1,5
	b	0,029	5,71	5,57	6,04	35,15	15,59	78,4	4,4
12-SASL*	f	0,948	0,17	6,24	5,50	35,93	15,89	26,4	1,5
	b	0,042	3,93	5,57	6,04	35,81	15,81	73,6	4,7
16-SASL*	f	1,610	0,14	6,30	5,50	35,83	15,87	15,4	1,6
	b	0,049	3,87	6,25	5,5	34,42	15,39	84,6	3,4

*valores de g_{xx} , g_{yy} e g_{zz} adotados foram 2,0086; 2,0063; 2,0025 (65).

ção do ácido esteárico ligado e não ligado na proteína e a heterogeneidade magnética sentida pela sonda (Δ_G). O valor de R_{bar} nos fornece uma medida da dinâmica experimentada pela sonda. A partir dele pode ser calculado o tempo de correlação rotacional τ como: $\tau = \frac{1}{6R_{bar}}$ (62-64). Quanto maior o valor de τ , mais lento é o movimento do marcador. Já o valor da constante hiperfina média ($a_0 = \frac{1}{3}(A_{XX} + A_{YY} + A_{ZZ})$) pode ser usado como uma medida da polaridade nas vizinhança da sonda magnética. Quando maior o valor de a_0 , mais polar o ambiente em que se encontra o marcador (64).

Com exceção do CAT-16, todos os marcadores n-SASL não ligados na proteína tiveram os parâmetros espectrais semelhantes (1ª linha de cada célula da Tabela 2). Este resultado é esperado para o estado não ligado, pois os espectros do radical nitróxido nos carbonos 5, 12 ou 16 tornam-se indistintos devidos à promediação das interações magnéticas decorrente da alta mobilidade da molécula livre em solução. Contudo, no caso ligado, diferentes regiões do ácido esteárico sofrem diferentes influências da vizinhança. Nas seções subseqüentes, apresentamos separadamente os melhores ajustes obtidos pelo programa NLLS e discutimos as principais diferenças para cada situação.(6

4.3.1 CAT-16

Na Figura 21, podemos visualizar o espectro experimental e o simulado pelo programa NLLS para a sonda CAT-16 na presença de B-FABP. O tempo de correlação para esse marcador no estado ligado foi de 2,96 ns, o menos imobilizado dos quatro ligantes na proteína. O parâmetro hiperfino médio a_0 forneceu um valor de 16,96 G para a componente livre, compatível com o ambiente polar do solvente e semelhante a valores anteriormente observados para nitróxidos livre em solução, e 16,39 G para a componente mais imobilizada. Este valor mais reduzido para a componente imobilizada do parâmetro hiperfino médio é característico de um ambiente menos polar e/ou hidratado na vizinhança da sonda paramagnética para o

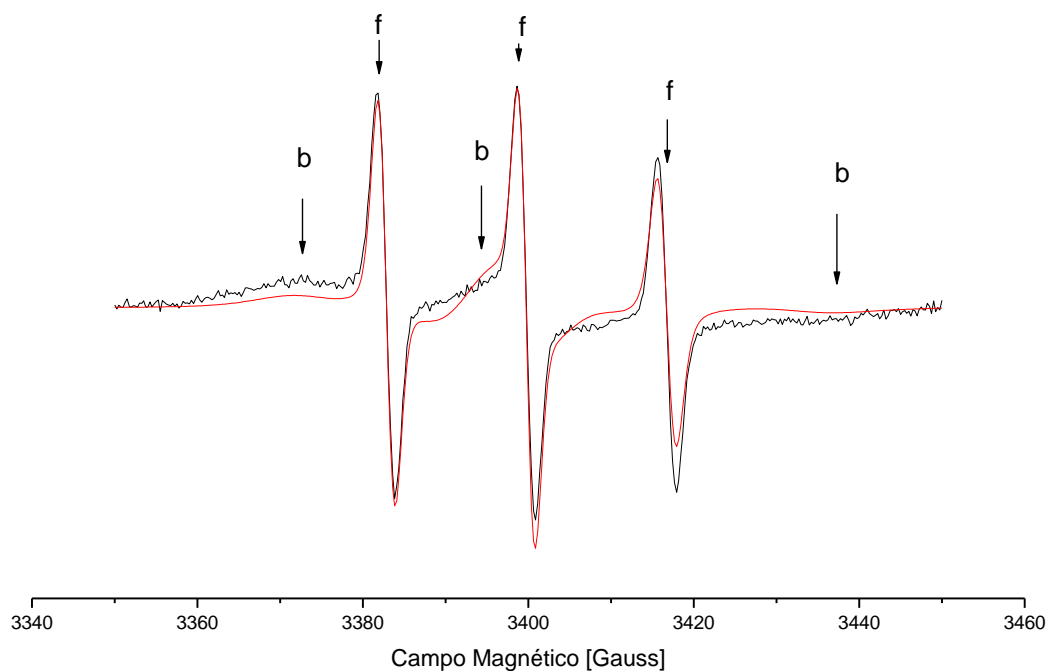


Figura 21 – Espectro de RPE do marcador CAT-16 na solução contendo a proteína B-FABP. Acima e em preto temos o espectro experimental da sonda magnética. Em vermelho, o ajuste do espectro experimental simulado com o programa NLLS. As setas indicam as componentes livre (f) e ligado (b) à proteína.

estado ligado. O mesmo tipo de comportamento foi obtido para os marcadores 5- e 16-SASL, onde a sonda no estado ligado na proteína é mais imóvel e menos hidratada do que no estado não ligado. Mas, diferentemente deles, o CAT-16 não possui uma cabeça polar, o que justifica uma componente menos travada no estado ligado na proteína do que nos outros três ligantes. Os trabalhos de cristalografia demonstraram que a cabeça polar do ácido graxo ligado na proteína faz ligações eletrostáticas com resíduos da região C-terminal dessa família de proteínas. Para a B-FABP, esses resíduos são a R126 e a Y128. A ausência da cabeça polar impede essa interação eletrostática, o que pode se refletir na mobilidade do marcador paramagnético CAT-16. Além disso, apesar do valor de a_0 para a componente ligada do marcador CAT-16 ser menor do que aquele obtido para a componente livre, ainda assim a_0 para o CAT-16 é maior do que os correspondentes valores obtidos para todos os outros marcadores, o que sugere que são os extremos da cadeia carbônica que aponta para o solvente. A população relativa para esse marcador no estado ligado foi de 74,1%, valor semelhante àquele obtido para os marcadores 5-, 12- e 16-SASL. Curiosamente, a ausência dessa interação eletrostática não impediu a

internalização do CAT-16. Isso é sustentado pela população relativa do estado ligado ser semelhante em todos os marcadores nas mesmas condições de medida. O valor do parâmetro Δ_G de 4,4 G para a componente ligada indica um forte alargamento das linhas de ressonância para esse estado.

4.3.2 Ácido esteárico 5-doxil (5-SASL)

O espectro do marcador 5-SASL na presença de B-FABP, bem como o melhor ajuste obtido a partir do programa NLLS podem ser visualizados na Figura 22. Como foi dito anteriormente, o espectro apresenta uma componente espectral associada a mobilidade de 5-SASL livres em solução (f) e ligado à B-FABP (b). Analisando apenas os parâmetros da componente ligada vemos que o tempo de correlação para esse marcador foi o mais lento dos quatro ligantes, com um valor de

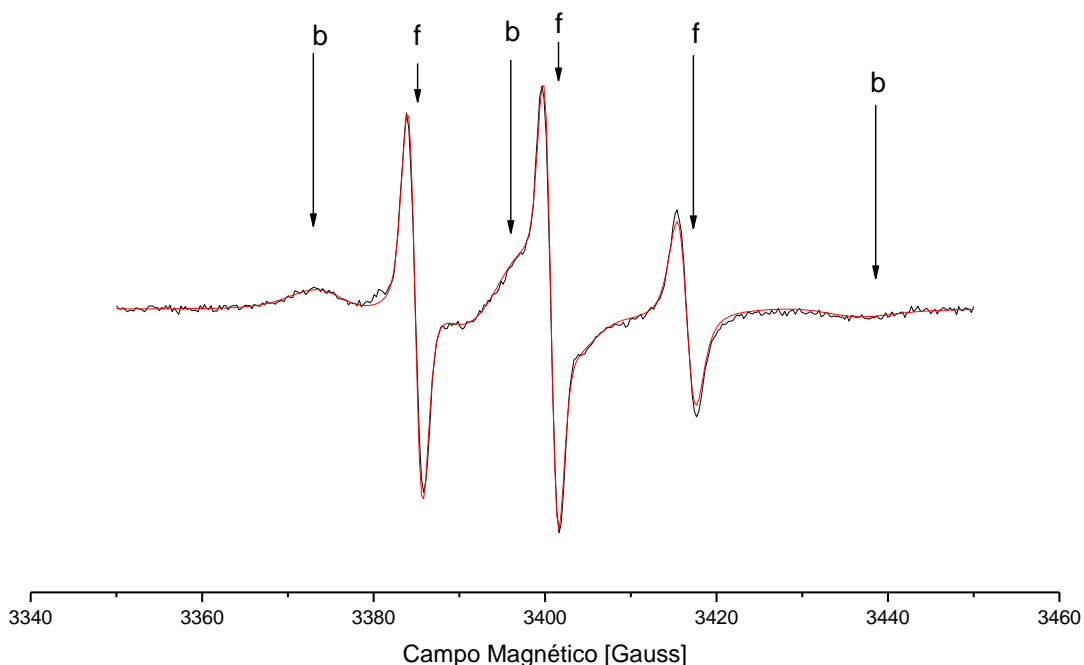


Figura 22 - Espectro de RPE do marcador 5-SASL na solução contendo a proteína B-FABP. Acima e em preto temos o espectro experimental da sonda magnética. Em vermelho, o ajuste do espectro experimental simulado com o programa NLLS. As setas indicam as componentes livre (f) e ligado (b) à proteína.

5,71 ns, o que representou a situação de maior restrição do movimento. O parâmetro hiperfino médio a_0 demonstrou que a sonda paramagnética está menos acessível ao solvente, com um valor de 15,59 G. A mesma sonda em ambiente aquoso, não ligado na proteína, possui um parâmetro hiperfino médio no valor de 15,84 G. A população relativa de marcador ligado foi de 78,4%, valor semelhante ao 12-SASL, 16-SASL e CAT-16. O valor do parâmetro Δ_G de 4,4 G para a componente ligada indica, mais uma vez, um forte alargamento das linhas de ressonância para esse estado.

4.3.3 Ácido esteárico 12-doxil (12-SASL)

Na Figura 23 podemos visualizar o espectro experimental e o simulado pelo programa NLLS para o marcador 12-SASL na solução contendo a proteína B-FABP. O tempo de correlação para esse marcador foi o segundo mais lento no grau de mobilidade dos quatro ligantes, com um valor de 3,93 ns. O parâmetro hiperfino médio a_0 demonstrou que a sonda paramagnética presencia um ambiente com polaridades semelhantes tanto no estado livre quanto em solução, com um valor de 15,89 G para o estado não ligado e um valor de 15,81 G para o estado ligado. A semelhança entre os valores de a_0 para o estado ligado e para o estado não ligado do ácido esteárico é um indício de um ambiente hidratado na vizinhança do carbono 12 do ácido esteárico, indicando a presença de moléculas de água próximas dessa região do ligante. Interessantemente, a presença dessas moléculas de água não influenciou a mobilidade do ligante para essa região, ainda sendo em torno de vinte vezes mais lento do que o estado não ligado obtido da componente livre em solução (3,93 ns comparado a 0,17 ns para o marcador livre). Este resultado indica que moléculas de água estão estruturadas em região próxima do marcador de spin, mostrando que as observações feitas a partir da estrutura cristalográfica (53) e de dados de dinâmica molecular (40, 60) também são válidos quando a proteína se encontra em um ambiente mais próximo do fisiológico. Nos referidos trabalhos, os autores comentam que uma camada de moléculas de água forma uma rede de força no interior da FABP. Essa rede de moléculas de água faz parte e compõe a estrutura

da proteína. Nossos dados indicam que as moléculas de água na região do C12 ficam estruturadas por tempo suficiente, na escala de tempo característica do experimento de RPE, para que possamos detectar o seu efeito no valor do parâmetro a_0 medido no espectro da componente (b) do marcador 12-SASL. Isto significa que a troca dessas moléculas de água do interior da proteína com as moléculas de água do solvente é muito mais lenta do que a troca das moléculas de água ligadas na superfície externa da proteína com as moléculas de água presentes no solvente. Estudos anteriores também relatam que essa característica deve estar associada com a estabilidade e com a função dessa família de proteínas, ou seja, a entrega e captura de ácidos graxos. Suspeita-se que essas moléculas de água estejam envolvidas no processo da internalização e externalização do ácido graxo.

Para a população relativa do marcador 12-SASL no estado ligado na proteína foi obtido um valor de 73,6%, próximo ao valor obtido para o marcador 5-SASL. O valor obtido de Δ_G para o estado ligado foi de 4,7 G, sendo o maior dos quatro ligantes. Da estrutura cristalográfica da proteína B-FABP ligada com DHA ou com ácido oléico (53), é possível observarmos que o resíduo F16 interage com o C12 da cadeia acil em ambos os ligantes. Apesar de ser um resíduo hidrofóbico, os nossos dados indicam que este resíduo F16 possui um ambiente polar na sua vizinhança. Parece que o ambiente proporcionado pela F16 possui um papel fundamental na estabilidade e função da B-FABP.

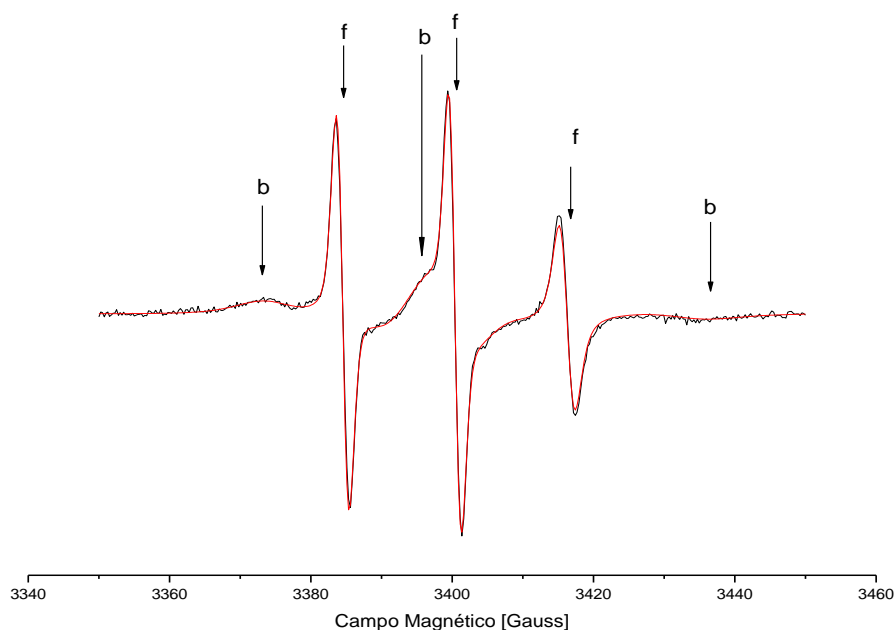


Figura 23 – Espectro e RPE do marcador 12-SASL na solução contendo a proteína B-FABP. Acima e em preto temos o espectro experimental da sonda magnética. Em vermelho, o ajuste do espectro experimental simulado com o programa NLLS. As setas indicam as componentes livre (f) e ligada (b) à proteína.

4.3.4 Ácido esteárico 16-doxil (16-SASL)

Na Figura 24 podemos visualizar o espectro experimental e o simulado pelo programa NLLS para a sonda 16-SASL na presença da proteína B-FABP. O tempo de correlação obtido para esse marcador foi de 3,87 ns, muito próximo ao valor encontrado para o marcador 12-SASL. O parâmetro hiperfino médio a_0 demonstrou que a sonda paramagnética está em um ambiente menos polar, provavelmente menos acessível às moléculas de água, com um valor de 15,39 G. A mesma sonda em ambiente aquoso, não ligado na proteína, possui um parâmetro hiperfino médio no valor de 15,84 G. Este resultado é semelhante ao do 5-SASL, indicando que tanto a região próxima da cabeça polar como a cauda desse ácido graxo estão bem mais imóveis e livres de moléculas de água. A população relativa do marcador ligado foi de 84,6%, valor já dito, semelhante ao 5-, 12- e CAT-16. O valor do Δ_G

para essa região do ácido esteárico ligado foi de 3,4 G, sendo o menor valor encontrado para a componente imobilizada dos quatro ligantes utilizados.

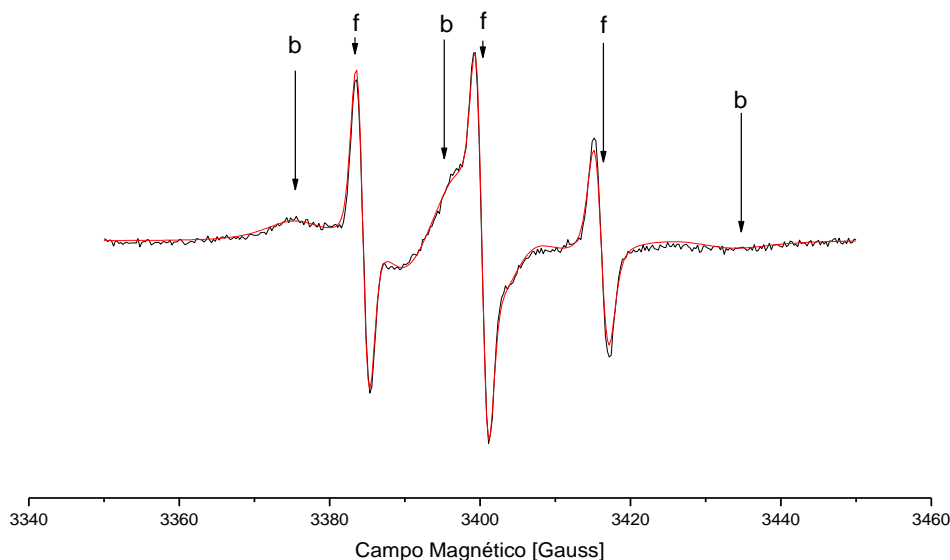


Figura 24 - Gráfico da simulação do 16-SASL na solução da proteína B-FABP. Acima e em preto temos o espectro experimental da sonda magnética. Em vermelho, o ajuste do espectro experimental simulado com o programa NLLS.

4.4 Titulação do SDS na B-FABP

O uso do SDS como ferramenta para o estudo da estrutura e função de proteínas globulares têm sido feito em diversos trabalhos nos últimos 40 anos. Muitos desses estudos foram realizados em sistemas como a proteína albumina do soro bovino (BSA) e humana (HSA) (67, 68). Estas duas proteínas, assim como as FABPs, estão associadas ao transporte de diversas substâncias como ácidos graxos, fármacos e outras pequenas moléculas. Uma das estratégias para explorar como essas proteínas desempenham sua função têm sido com o uso de sondas magnéticas e a titulação com surfactantes, permitindo caracterizar o sistema em estudo. Nesses estudos, observa-se o comportamento da proteína com o incremento do surfactante antes e após a concentração micelar crítica (CMC) do surfactante. Isto permite sondar dois efeitos diferentes dessa interação. Um deles

ocorre na concentração estequiométrica de surfactante monomérico e o outro acima da sua CMC. Na concentração estequiométrica, abaixo da CMC, o surfactante geralmente se liga eletrostática e hidrofobicamente em sítios específicos da proteína. Acima da CMC, a interação é não específica, ocorrendo a desnaturação da proteína com o incremento da concentração do surfactante.

Em nosso caso, tentamos buscar informações sobre a interação da B-FABP com o surfactante SDS através das técnicas de RPE, aliada ao uso da sonda magnética 5-SASL (v. seção anterior), e de RMN, mais especificamente ^{15}N -HSQC.

4.4.1 Medidas de RPE do ácido esteárico 5-doxil (5-SASL)

Semelhante aos trabalhos com a proteína BSA e HSA (69), também monitoramos a influência do surfactante SDS sobre a dinâmica e a estrutura do complexo B-FABP:ligante utilizando a sonda magnética 5-SASL como mimético da molécula de ácido graxo (ligante natural da FABP).

Na Figura 25, temos espectros de RPE do marcador contendo componentes espectrais associadas a um estado não ligado, caracterizado pelo movimento não restringido do radical nitróxido em água e representado por três linhas estreitas, e um modificado, com três linhas de ressonância alargadas, espectro oriundo da restrição do movimento induzida pela captura do ácido graxo pela proteína.

Interessantemente, ocorre uma mudança da mobilidade da componente associada ao marcador 5-SASL ligado à B-FABP com o incremento da concentração do SDS de 0 para 100 μM . Apesar de poder-se oferecer uma descrição quantitativa para os espectros em discussão, utilizaremos apenas o desdobramento hiperfino máximo ($2A_{\text{max}}$), que mede a separação entre as linhas de campo baixo e alto no espectro da sonda imobilizada (marcada com linhas pontilhadas na Figura 25, como indicação da microviscosidade do ambiente químico em torno do marcador. Como microviscosidade, entendemos as contribuições à restrição de movimento que alteram tanto a dinâmica quanto o ordenamento do marcador e que se manifestam no espectro de RPE como alterações nas larguras de linha, diferenças de

intensidade das ressonâncias observadas e/ou modificações na separação máxima dos picos.

Na ausência de surfactante (primeiro espectro no alto da Figura 25, o espectro de RPE evidencia que o derivado de ácido graxo se encontra em equilíbrio entre duas populações, uma delas ligada proteína (setas na Figura 25). Esta população ligada apresenta o maior valor de $2A_{\max}$ como pode ser observado a partir das linhas pontilhadas indicativas da posição dos picos mais externos desse espectro. A ligação com a proteína é, provavelmente, resultado de interações iônicas e efeito hidrofóbico já que a sonda é anfifílica.

À medida que adicionamos SDS à solução contendo B-FABP e 5-SASL, vemos que a componente imobilizada possui o seu sinal de ressonância suprimido até atingirmos 100 μM de SDS. Nesse intervalo entre 3 e 100 μM de SDS, a molécula de 5-SASL é deslocada do seu sítio de ligação na estrutura da B-FABP, muito provavelmente em face de mudanças conformacionais induzidas pelo SDS ou de uma competição pelo sítio de ligação na proteína.

A partir de 500 μM de SDS surge um novo sinal espectral, representado pela seta azul. Este novo estado imobilizado da sonda parece ser caracterizado novamente por um estado ligado na proteína, mas com uma mobilidade intermediária (valor reduzido de $2A_{\max}$), indicando que as moléculas de 5-SASL são novamente solubilizadas nesta condição. Esta nova linha de ressonância pode representar um estado conformacional intermediário na interação proteína-ligante, onde tanto a sonda como o surfactante estão ligados na proteína.

Com o incremento da concentração até 2 mM de SDS, valor esse próximo da CMC nas nossas condições, a população de marcador livre é gradualmente diminuída, com o correspondente aumento na quantidade de marcador imobilizado, desta feita, no agregado proteína/surfactante. Acima da CMC do SDS, as duas componentes do espectro, a imobilizada e a livre, começam a colapsar em uma única componente. Essa situação é caracterizada pelo surgimento de agregados semelhantes a micelas ao redor da proteína. Mesmo em 10 mM de SDS, o movimento da sonda é mais restrito na presença da B-FABP do que em micelas de SDS sem a proteína (70). Neste último caso, a proteína está desnaturada e o ácido esteárico 5-SASL possivelmente encontra-se em uma mistura de agregados micelares de SDS e proteína desnaturada.

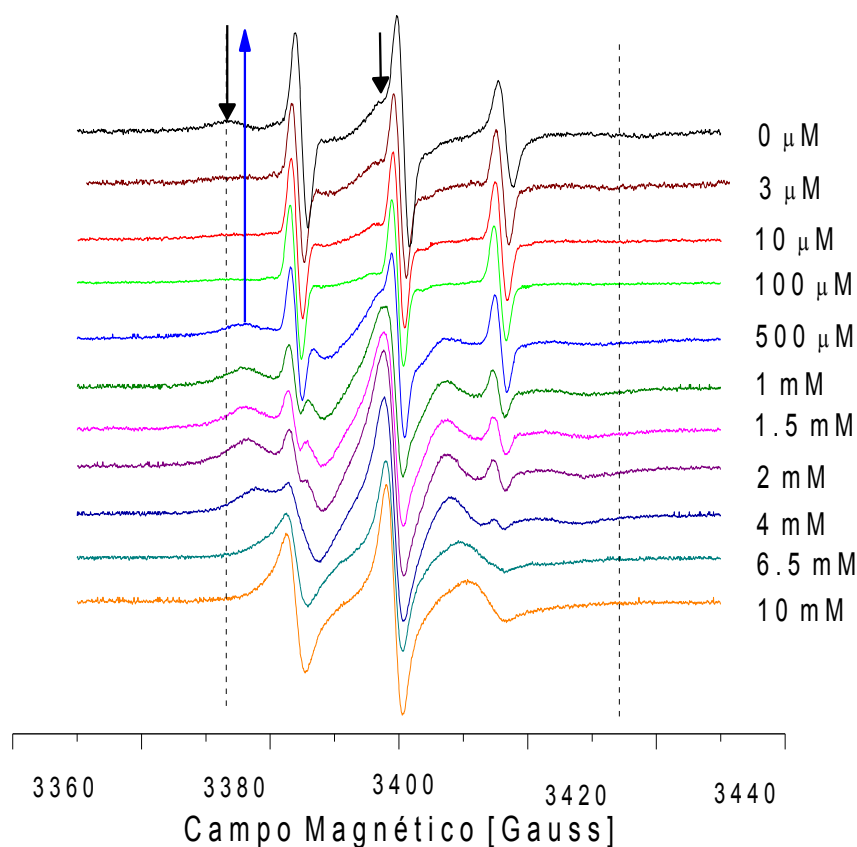


Figura 25 - Espectros de RPE do ácido esteárico 5-doxil incubado com a B-FABP na razão P:AS = 4:1. Na sequência dos espectros de cima para baixo temos uma titulação crescente de SDS: 0 μM , 3 μM , 10 μM , 100 μM , 500 μM , 1 mM, 1.5 mM, 2 mM, 4 mM, 6.5 mM e 10 mM. As setas em preto e em azul sinalizam uma mudança de mobilidade da componente mais imóvel na concentração de 500 μM de SDS. A concentração de proteína utilizada foi de 160 μM , em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8.0.

4.4.2 Medidas de RMN ^{15}N -HSQC da B-FABP titulada com SDS

Além de monitorar a influência do surfactante sobre a FABP a partir da perspectiva do ligante, também interessa seguir as mudanças conformacionais induzidas na proteína. Em trabalhos com BSA e HSA, medidas de fluorescência determinaram pequenas trocas locais na estrutura da proteína (68). No caso da B-FABP, no presente trabalho, foi usada a técnica de RMN 2-D para aprofundarmos o entendimento dos resíduos de ligação do ácido graxo, na tentativa de elucidar quais destes resíduos estão envolvidos em mudanças estruturais da B-FABP quando o SDS encontra-se presente na solução, fornecendo subsídios para compreendermos

a dinâmica do 5-SASL nessas condições. Para isso, um conjunto de espectros ^{15}N -HSQC (*heteronuclear single quantum coherence*) foi adquirido da B-FABP em condições de concentração de SDS semelhantes aos experimentos realizados com o marcador 5-SASL.

Para a realização desse experimento ^{15}N -HSQC, faz-se necessária a marcação isotópica da proteína com ^{15}N . Cada resíduo da proteína, excluindo-se a prolina, possui um grupo amida na ligação peptídica. É este grupo amida, composto de Nitrogênio e Hidrogênio, que receberá a sonda ^{15}N , assim como os grupos amina existentes nas cadeias laterais dos resíduos. A necessidade de realizar esta marcação se dá pelo baixo teor de ^{15}N encontrado em abundância natural. É este isótopo ^{15}N do nitrogênio (^{14}N tem maior abundância natural) que possui spin diferente de zero, sendo capaz de adquirir uma magnetização quando inserido em um campo magnético, sendo, portanto, necessária a marcação isotópica para este núcleo atômico. Tal magnetização pode ser manipulada com pulsos de rádio frequência de tal forma que a informação molecular do sistema em estudo é adquirida e decodificada a partir da evolução temporal da magnetização. A vizinhança local da sonda nuclear é, portanto, um fator influente nessa evolução temporal e representada no espectro HSQC pelo deslocamento químico (δ) dos grupos marcados isotopicamente. No caso do experimento heteronuclear, uma das características do espectro ^{15}N -HSQC é que cada enovelamento protéico possui um padrão espectral exclusivo, com picos de ressonância do ^{15}N e do ^1H dispersos e distinguíveis. Os sinais nucleares de ^{15}N e de ^1H ficam separados em eixos de ressonância distintos e medidos como desvios da ordem de partes por milhão em relação ao sinal de ressonância da referência, no caso, o DSS. Dessa forma, o espectro ^{15}N -HSQC de uma proteína com seus grupos amina ou amida marcados com ^{15}N é um conjunto de picos de ressonância formados pela intersecção das ressonâncias do ^{15}N com as do ^1H devido a uma correlação, ou seja, um vínculo proporcionado pela interação entre esses dois núcleos. Assim, cada um destes picos assinala um grupo amida da cadeia principal (ou lateral) de um resíduo da proteína. Para realizar esse assinalamento, identificando qual pico está associado a qual resíduo da proteína, são necessários o uso de outros experimentos de RMN. No caso da B-FABP, sua estrutura também foi resolvida por RMN, o que torna o assinalamento procurado já conhecido (Figura 26) (54).

O espectro ^{15}N -HSQC da estrutura da B-FABP determinada por RMN permitiu

o uso deste experimento para sondar os sítios de ligação da proteína com outros

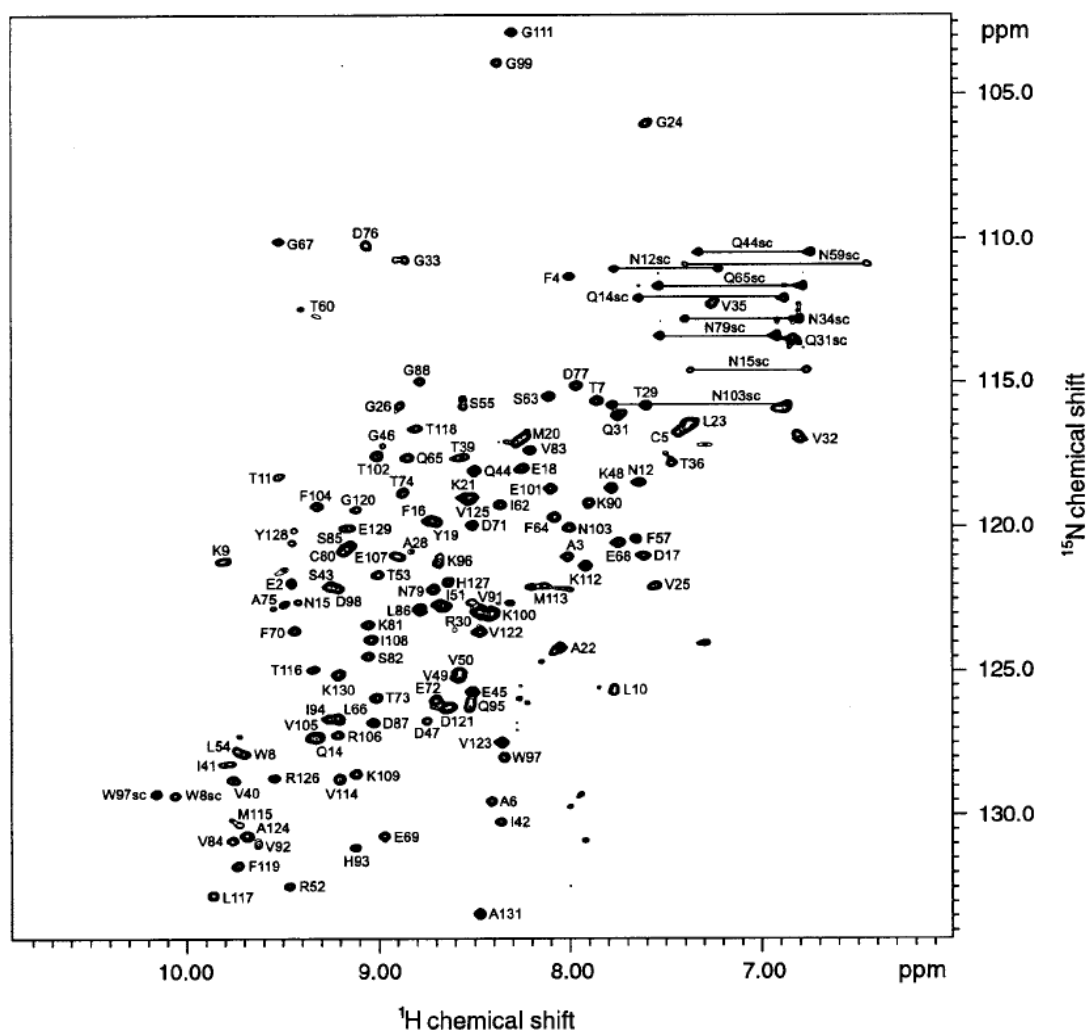


Figura 26: Espectro ^{15}N -HSQC da B-FABP humana (pdb 1JJX) em solução. As medidas foram feitas em tampão NaP 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7,0. No eixo horizontal temos os valores da ressonância do prótin em partes por milhão (ppm) referenciados ao DSS. No eixo vertical temos os valores da ressonância do ^{15}N em ppm referenciados ao ^1H . Figura extraída de (67)

ligantes semelhante ao ácido oléico, o DHA, o SDS e até mesmo modelos de membranas. Comparando o espectro da proteína no estado com o ligante com o espectro da proteína no estado sem o ligante é possível encontrar mudanças nos deslocamentos químicos, ou seja, dos picos de ressonância no espectro ^{15}N -HSQC. Estes resíduos que possuem alterados os picos de ressonância geralmente estão na interface da ligação. Para maior clareza no entendimento das regiões discutidas nas próximas secções e que estão envolvidas em mudanças conformacionais, apresentamos na Figura 27 a nomenclatura dos diversos motivos estruturais da B-FABP.

Nas Figura 28, Figura 29, Figura 30 e Figura 31 temos dois espectros de RMN ^{15}N -HSQC superpostos nas concentrações de 0 μM e 140 μM de SDS (abaixo da CMC do SDS) em 300 μM da B-FABP. Nesses espectros estão em destaque os resíduos que tiveram seus deslocamentos químicos alterados.

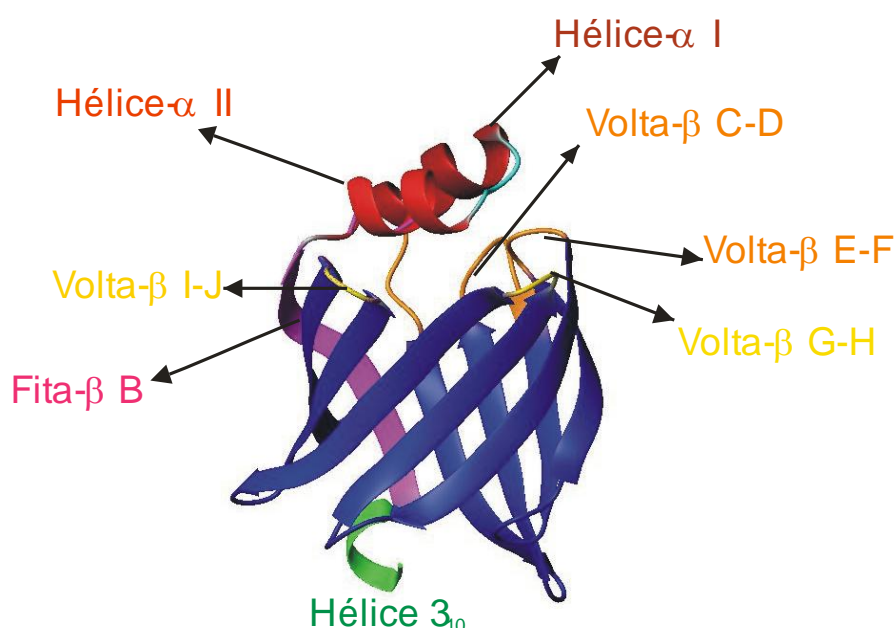


Figura 27 - Estrutura da B-FABP mostrando as regiões de interesse: Em vermelho temos as hélices- α I e II, em amarelo as voltas- β G-H e I-J; em laranja as voltas- β C-D e E-F; e em lilás a fita- β B e, em verde, a hélice 3_{10} .

Na Figura 28, temos o primeiro quadrante desse espectro nessas duas condições. Nele, há o surgimento de um novo pico de ressonância para o resíduo T36. No resíduo V32 ocorreu um alargamento na dimensão indireta, sugerindo uma perturbação na dinâmica desse resíduo promovida pela ligação do SDS na proteína. Ambos os resíduos pertencem à hélice- α II, estando conectados por uma ligação de hidrogênio entre o grupo amida da T36 para a carbonila da V32 da cadeia principal

desses resíduos, conforme determinado pelo programa MolMol^e, arquivo pdb 1JJX da B-FABP. A mudança conjunta desses picos de ressonância para esses dois resíduos da hélice- α II é compatível com uma mudança conformacional para essa região envolvendo uma perturbação na ligação de hidrogênio entre estes resíduos. Para confirmar isto, experimentos para determinar a taxa de troca dos prótons amida com o solvente deuterado (71), ou o experimento de RMN H(N)CO-TROSY para determinar o acoplamento escalar através da ligação de hidrogênio precisariam ser feitos (72). Estes resíduos também são próximos da volta- β C-D entre as fitas- β C e D e pertencem à região do portal da proteína.

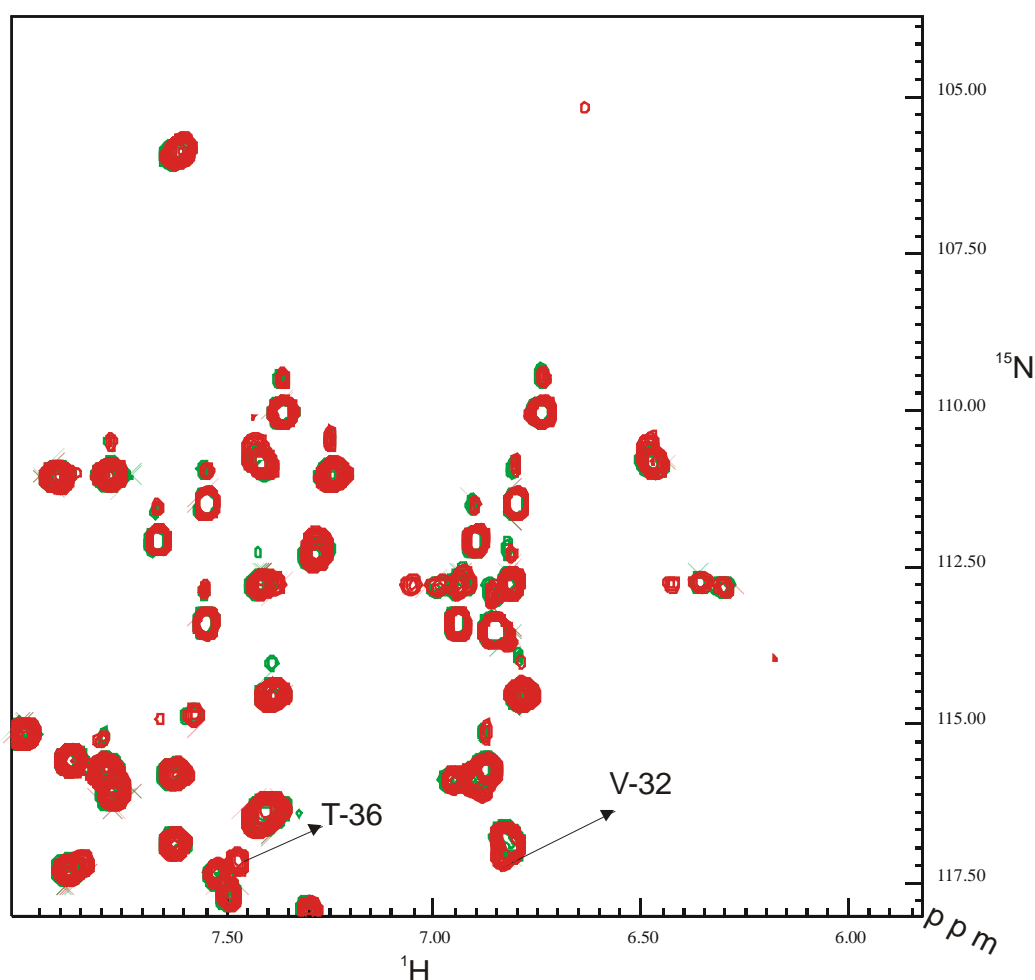


Figura 28 - Primeiro quadrante do espectro ^{15}N -HSQC da B-FABP (300 μM) sem SDS, em verde, e com SDS 140 μM , em vermelho. Em destaque, indicado por setas, os resíduos cujos deslocamentos químicos foram alterados pela presença do SDS

^e Programa para análise e visualização de moléculas. Disponível em <ftp://ftp.mol.biol.ethz.ch/software/MOLMOL/>

No segundo quadrante (Figura 29), podemos observar que os picos de ressonância do resíduo T60, próximo à volta- β formada pelas fitas- β C e D, do resíduo S55, pertencente a essa mesma volta- β C-D, e do resíduo T118, próximo da volta- β I-J, sofreram mudanças devido à presença de 140 μ M de SDS. Surgiram mais picos de ressonância no espectro 15 N-HSQC na presença do SDS. Esses picos podem ser associados à ressonância magnética de resíduos em uma nova família conformacional da proteína em solução. A resposta desses resíduos para uma razão estequiométrica proteína:surfactante de cerca 2:1 demonstra a alta sensibilidade que essa região da B-FABP possui ao ligante. Segundo Corsico (37, 73), a região da volta- β C-D contém resíduos envolvidos especificamente na interação com ligantes hidrofóbicos e modelos de membrana para essa classe de proteínas. Nossos resultados evidenciam e confirmam claramente tal suposição.

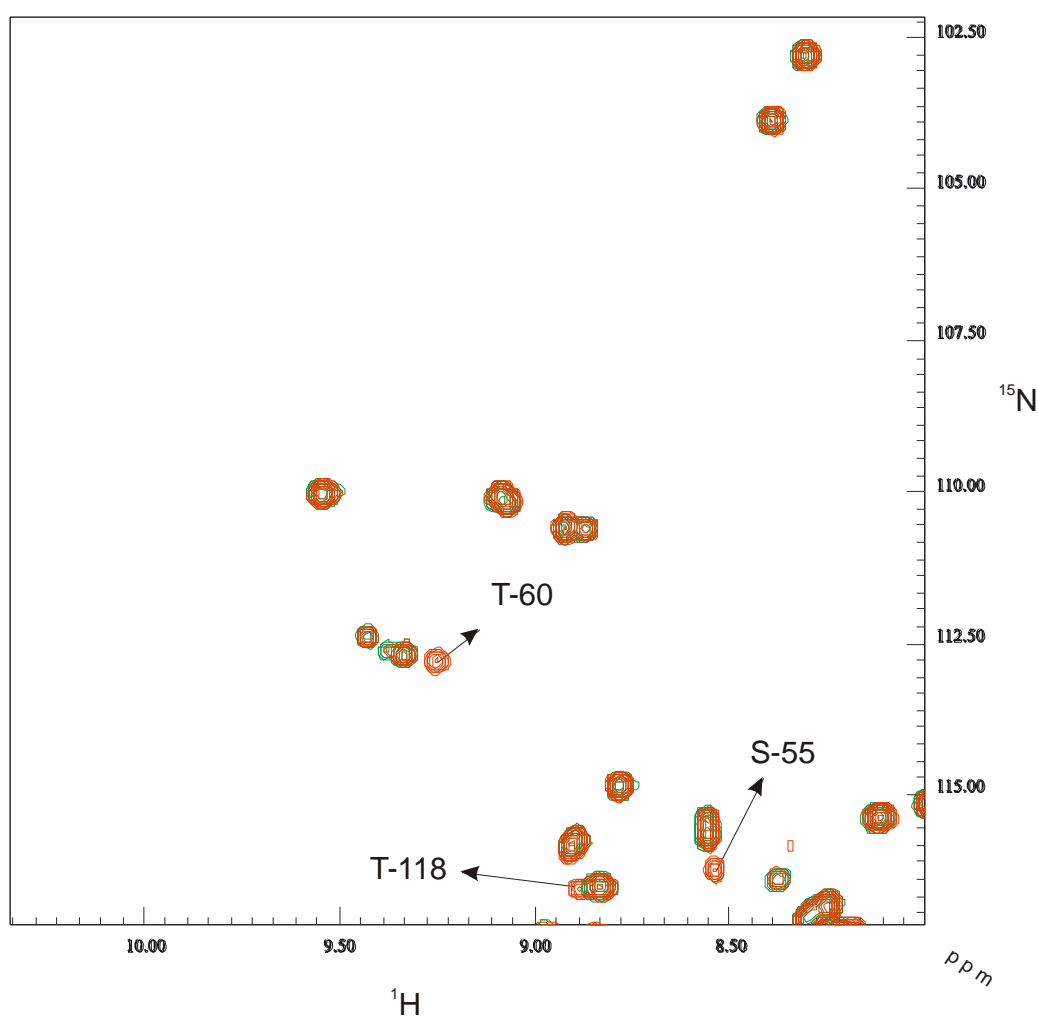


Figura 29 - Segundo quadrante do espectro 15 N-HSQC da B-FABP (300 μ M) sem SDS, em verde, e com SDS 140 μ M, em vermelho. Em destaque, indicado por setas, os resíduos cujos deslocamentos químicos foram alterados pela presença do SDS.

Para o terceiro quadrante, visualizado na Figura 30, temos em destaque o surgimento de uma nova família conformacional para os resíduos K9, T11, próximos à hélice- α I, e, portanto, da região do portal, assim como para os resíduos Q14 e F16 (ou D17), pertencentes à hélice- α I na região do portal. O F16 está diretamente associado a uma interação com o ácido graxo ligado à B-FABP (53). Interessantemente, os resíduos K9 e T11 dessa família de proteínas nunca haviam sido implicados em uma interação com ligantes ou membranas.

Outro resíduo próximo da região do portal é o T53. Este resíduo é vizinho da volta- β C-D e seu assinalamento no espectro ^{15}N -HSQC indica o surgimento de outra família conformacional devido à interação da proteína com o SDS (Figura 30). Em conjunto com os resíduos E72, T74, D76, R78, S82, H93, Q95 e R106, fazem uma ligação indireta com a cabeça polar do ácido graxo via ligação de hidrogênio com uma ou mais moléculas de água em uma rede de ligações de hidrogênio internalizada na cavidade da proteína, conforme a estrutura cristalográfica PDB 1HMS da M-FABP humana e 1FDQ da B-FABP (41, 53) e também de acordo com nossos dados de RPE para sondas inseridas em moléculas de ácido graxo. Outro resíduo para o qual surgiu uma nova família conformacional na presença do SDS foi o H93. Porém, este resíduo não está diretamente envolvido na ligação e acomodação do ácido graxo no interior da FABP por uma interação de contato direto da sua cadeia lateral com o ligante (60, 74). A interação é mediada por aquela rede de moléculas de água, que formam uma casca de hidratação rigidamente ligada nesses resíduos hidrofílicos, no interior da cavidade da FABP.

Os resíduos E72 e T73, que estão localizados próximos da volta- β E-F, também estão associados a mais de uma família conformacional na presença do SDS. Próximo ao resíduo E72 há uma molécula de água responsável pelo intercâmbio das moléculas de água do solvente com as moléculas de água da cavidade da FABP (60). Outros resíduos que podem supostamente estar envolvidos nessa interação são o N15, S43, D98, N59 e L91, que não puderam ser assinalados devido a ambigüidades no espectro ^{15}N -HSQC. Um resíduo associado a um novo pico de ressonância e marcado com '?' no espectro ^{15}N -HSQC, Figura 30, também não pode ser identificado.

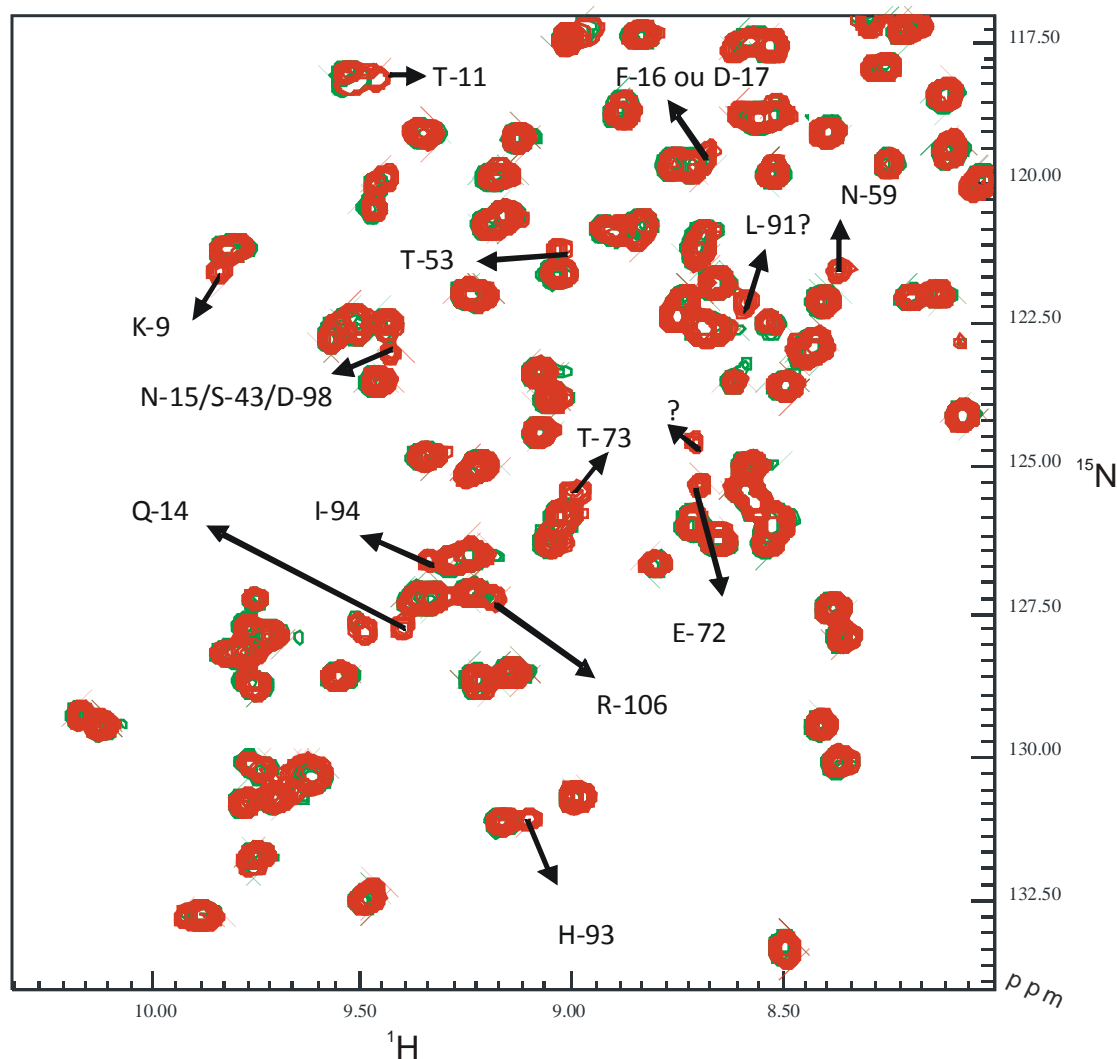


Figura 30 - Terceiro quadrante do espectro ^{15}N -HSQC da B-FABP sem SDS, em verde, e com SDS 140 μM , em vermelho. Em destaque, indicado por setas, os resíduos cujos deslocamentos químicos foram alterados pela presença do SDS.

Para o quarto quadrante (Figura 31), há curiosamente novos picos de ressonância associados aos resíduos E68 e L10, que não pertencem à região do portal. O resíduo E68 está localizado no extremo oposto à região do portal, próximo do resíduo Y128, com o qual a cabeça polar do ácido graxo faz ligação de hidrogênio através da hidroxila da sua cadeia lateral. Já a L10 é vizinha dos resíduos K9 e T11, formando uma protuberância “ β -bulge” imediatamente antes da hélice- α I. O surgimento de uma nova família conformacional para esses dois resíduos indica o seu envolvimento no mecanismo de entrega e captura de ácido graxo pela B-FABP. A existência desses novos picos sugere que mesmo resíduos diferentes da tradicional região do portal tenham papel importante no mecanismo de ligação e

entrega de ácidos graxos, o que mudaria o paradigma comumente aceito para esta família de proteínas. Mas especificamente, a região do resíduo E68 poderia formar um portal alternativo como sugerido por Friedmen e colaboradores (75)

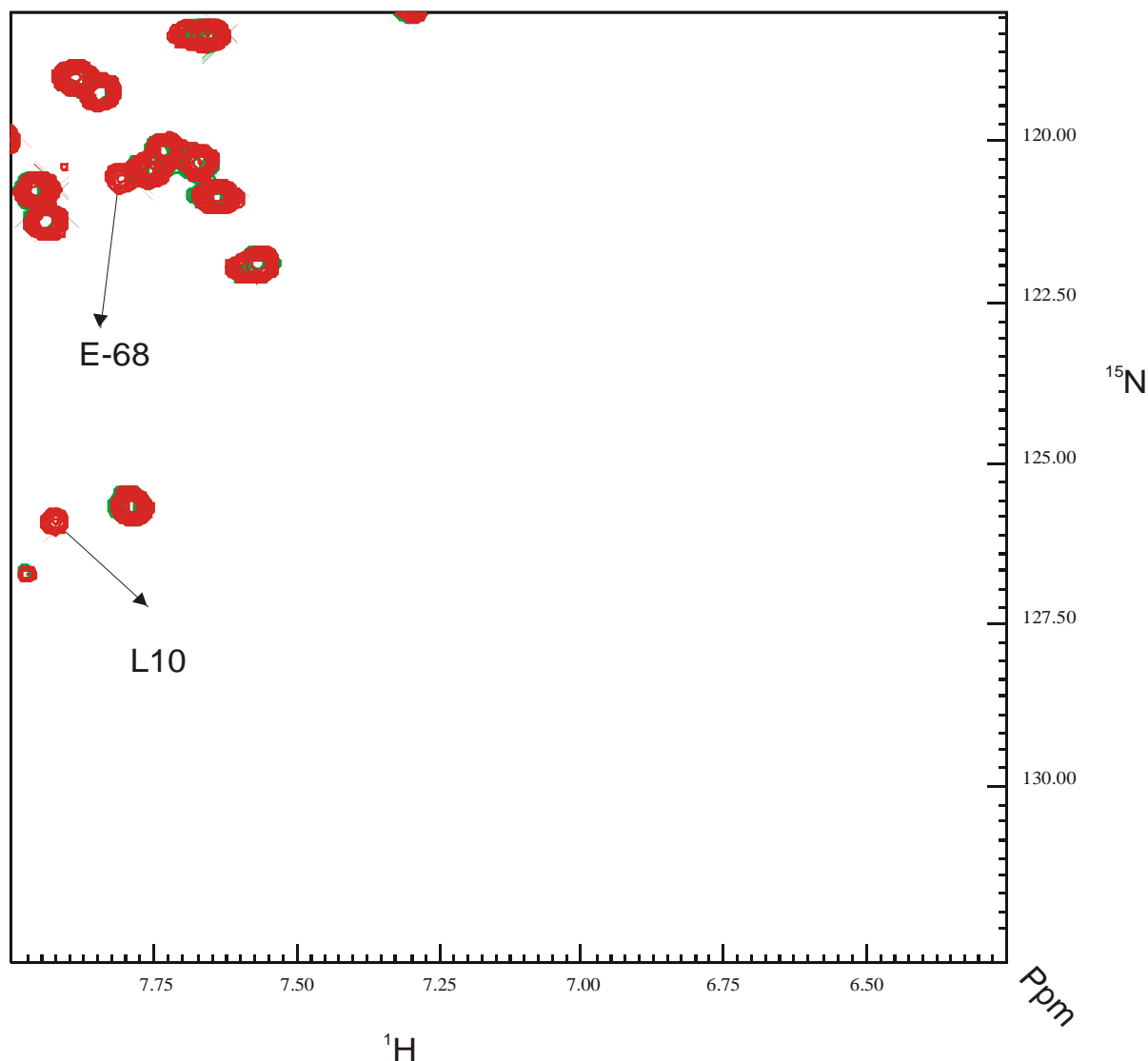


Figura 31 - Quarto quadrante do espectro ^{15}N -HSQC da B-FABP sem SDS, em verde, e com SDS 140 μM , em vermelho. Em destaque, indicado por setas, os resíduos cujos deslocamentos químicos foram alterados pela presença do SDS.

Dos dados de RPE e RMN, observamos que a sonda ácido esteárico 5-SASL teve a sua dinâmica alterada, como também picos de ressonância de certos resíduos da B-FABP, visualizados no espectro ^{15}N -HSQC também sofreram mudanças associada à presença do SDS. Contudo, a estrutura geral da proteína parece permanecer intacta nesta situação, conforme visualizado na manutenção do padrão espectral dos resíduos no espectro ^{15}N -HSQC da B-FABP. Essa mudança sutil no comportamento do sistema proteína-ligante fornece subsídios para supor

que nesta concentração de proteína:SDS o sistema encontra-se em um estado intermediário no processo de internalização e/ou entrega do ácido graxo pela B-FABP. Esta suposição está em acordo com trabalhos realizados que alegam a existência de um processo com pelo menos dois passos na entrega e/ou captura do ácido graxo para/da membrana pelas FABPs (76).

Na Figura 32 é possível visualizarmos o que acontece com os picos de ressonância dos grupos marcados isotopicamente da B-FABP quando aumentamos a concentração de SDS. Como os espectros ^{15}N -HSQC são apresentados na forma de gráficos de contorno, o surgimento de mais curvas de nível em um dado pico indica um aumento da sua intensidade. Os resíduos que passaram a popular esse novo estado conformacional, proporcionado pela presença do SDS, tiveram seus picos de ressonância mais intensos em 480 μM de SDS. Quando a concentração do SDS está próxima à CMC deste surfactante ($\sim 2,2$ mM em nosso caso), os picos de ressonância associados aos grupos amida da B-FAPB começam a desaparecer. Na CMC do SDS (Figura 32E), é visualizado com sinal mais intenso os picos dos grupos amido das cadeias laterais dos resíduos. Nesta situação, curiosamente a amostra apresentou sinal de agregação a olho nu para essa condição de medida. Os picos de ressonância dos grupos amida da cadeia principal ressurgem quando a concentração do SDS encontra-se em 8,7 mM, e o espectro é típico de uma proteína desnovelada, caracterizado por picos de ressonância não espaçados, sobrepostos e indistinguíveis (Figura 32F).

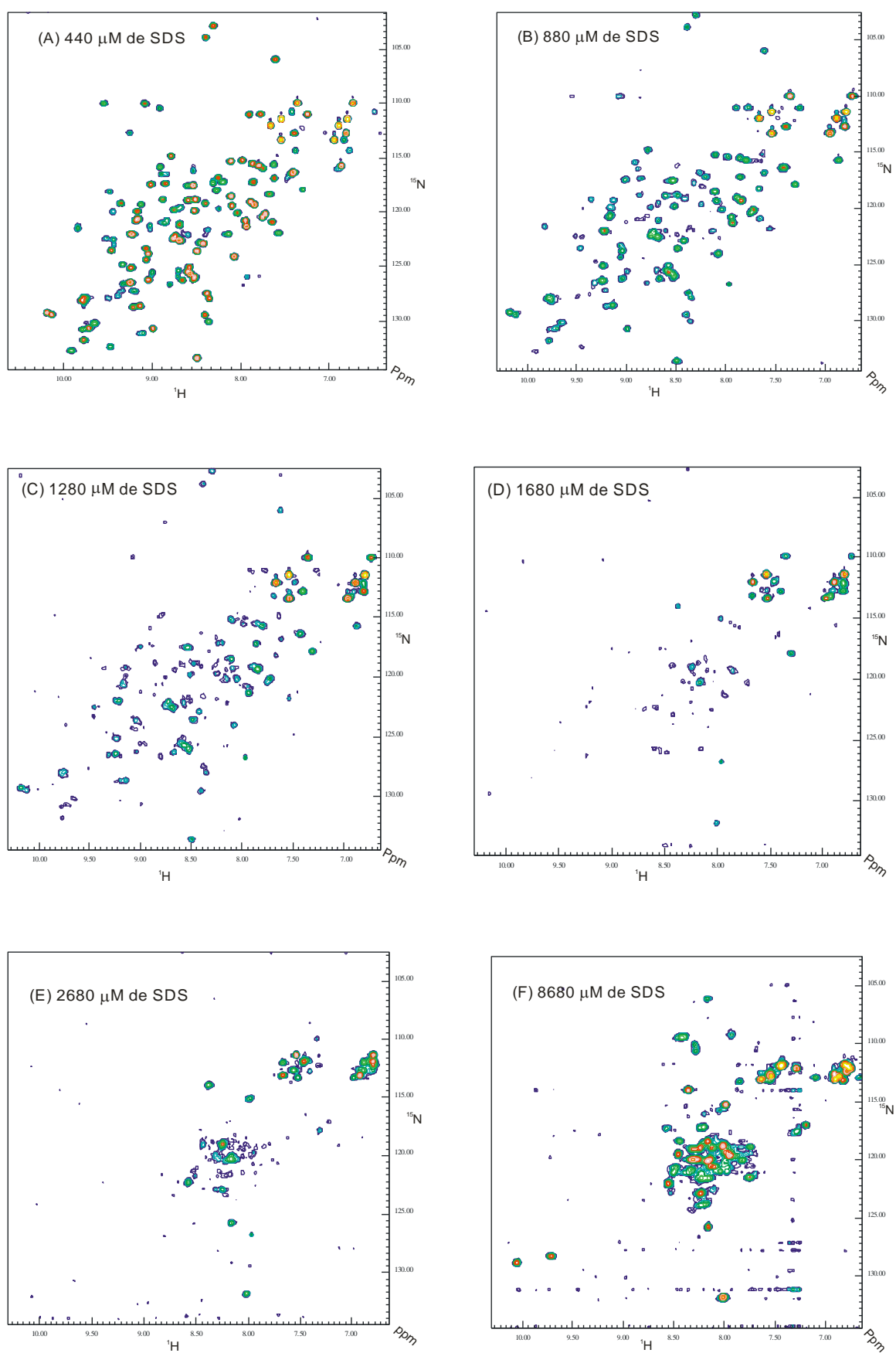


Figura 32 - Espectros ^{15}N -HSQC da B-FABP na concentração de 300 μM com: (A) 440 μM , (B) 880 μM , (C) 1280 μM , (D) 1680 μM , (E) 2680 μM e (F) 8680 μM de SDS.

4.5 Interação da B-FABP com modelos de membrana - RPE

Na tentativa de observar o comportamento da bicamada lipídica na presença de B-FABP, foram preparadas vesículas marcadas conforme descrito na seção 3.3 de materiais e métodos. Para sondar a ligação dessa família de proteínas e o comportamento da dinâmica e da estrutura da membrana, foram utilizados os marcadores DPPTC, 5-PC, 7-PC e 10-PC em vesículas neutras (PC), carregadas (PG), tanto em tampão de alta como de baixa força iônica (NaCl ou CaCl₂). Todas as medidas foram realizadas em pH 7,9-8,2.

Os espectros encontram-se no apêndice A desta tese. Podemos observar que não houve mudança significativa de nenhum marcador em nenhuma das composições das vesículas utilizadas, tanto na situação de alta como na de baixa força iônica. Parece que as condições em que a B-FABP liga com vesículas devem ser bem específicas. Mais experimentos são necessários para encontrar em que condição isto ocorre. Uma tentativa seria realizar estes mesmos experimentos em pH alcalino.

Na tentativa de observar a referida interação, em vez de sondarmos a membrana, experimentos foram realizados na proteína marcada na presença e na ausência de bicelas. Estes experimentos encontram-se na próxima seção (4.6).

4.6 Interação da B-FABP com modelos de membrana - RMN

Na tentativa de verificar quais resíduos sofrem alguma mudança devido à presença de modelos de membrana, experimentos ^{15}N -HSQC da B-FABP incubada com bicelas na razão DMPC/DHPC de 1:1 foram realizados na presença e ausência dos ligantes DHA ou ácido oléico^f. Dessa forma, foram utilizados um total de 6 amostras da B-FABP: proteína delipidada com e sem bicela, proteína em bicela com e sem DHA e proteína em bicela com e sem ácido oléico. As mudanças espectrais nessas condições foram verificadas nas temperaturas de 5° C até 55° C. Para todos os resíduos da proteína foram construídos gráficos da variação do deslocamento químico do ^1H e ^{15}N pela variação da temperatura.

Primeiramente, uma descrição do comportamento em função da temperatura do deslocamento químico dos resíduos que sofreram mudanças significativas pela presença do ligante será exposta, dando ênfase à região do portal e do sítio ativo da B-FABP. Em tal descrição, utilizaremos os picos dos espectros ^{15}N -HSQC e também as variações dos deslocamentos químicos ($\Delta\delta$) destes picos em função da temperatura, sendo estes últimos sempre apresentados na forma de gráficos de $\Delta\delta$ contra a temperatura para as diversas condições medidas. Gráficos dessas variações com e sem bicelas foram colocados lado a lado para comparação. Na sequência, uma análise da estrutura terciária será realizada com base na estrutura já conhecida da B-FABP e nos resultados obtidos por este trabalho.

Outra questão relevante está na função desempenhada pela B-FABP no mecanismo de entrega de ácido graxo para a biomembrana. As várias FABPs podem ser classificadas em dois tipos segundo o mecanismo de entrega e/ou captura: difusional ou colisional. Como já foi dito na introdução, somente FABPs que interagem por um mecanismo colisional é que devem interagir diretamente com a membrana lipídica.

^f Experimentos de RPE foram realizados utilizando como modelos de membrana vesículas de DMPC, DMPG, DOPC e DOPG marcadas com DPPTC, 5-PC e 7-PC. Os dados não demonstraram uma mudança na dinâmica do marcador de spin. Os espectros encontram-se no apêndice A.

4.6.1 Região N-terminal

Essa região compreende os cinco primeiros resíduos da B-FABP identificados por V1-EAF-C5, que adotam uma conformação de hélice 3_{10} . Observando o comportamento desses resíduos no espectro ^{15}N HSQC, foram construídos gráficos da variação do deslocamento químico ($\Delta\delta$) pela temperatura. No caso do resíduo E2 (Figura 33), na ausência da bicela e em temperatura acima de 35°C , este resíduo possui dois picos de ressonância, indicativo da flexibilidade conformacional para essa região.

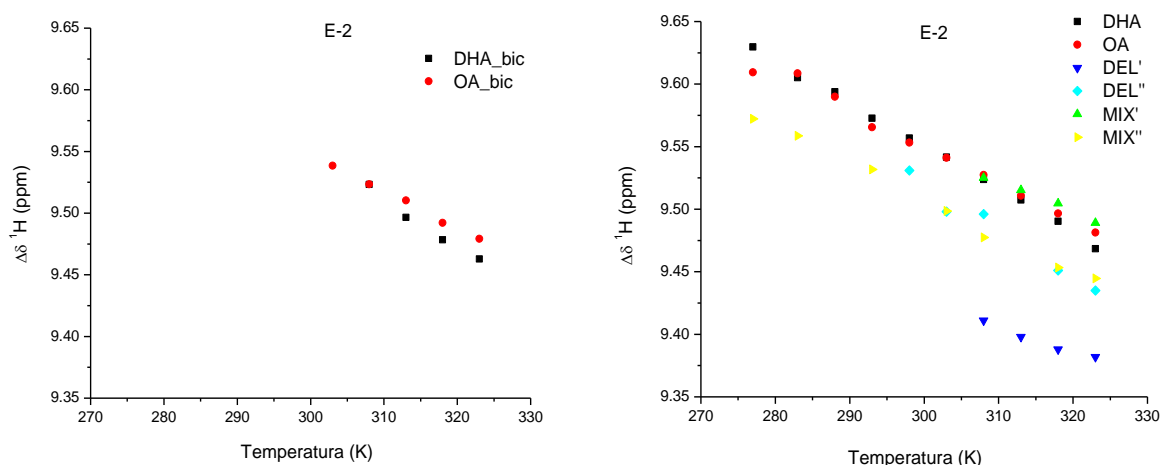


Figura 33 - Gráfico da variação do deslocamento químico ($\Delta\delta$) do ^1H pela temperatura para o resíduo E2 na presença (a esquerda) e na ausência (a direita) de bicelas. Em vermelho, temos os resultados para a proteína com ácido oléico, em verde e em amarelo para duas situações da proteína não delipidada, em azul claro e também em azul escuro para duas situações da proteína delipidada, e em preto para a proteína incubada com DHA.

Essa afirmação é reforçada pelo comportamento do resíduo A3, também visualizado na Figura 34, que possui uma inversão na taxa de variação do deslocamento químico de positivo para negativo em todas as condições observadas. Segundo Baxter (77, 78), uma dependência não-linear para o comportamento do deslocamento químico dos prótons amida pela temperatura pode ser usada para identificar resíduos em conformações alternativas de baixa energia dentro do *ensemble* conformacional do estado nativo da proteína envelhada. A não-linearidade

da $\Delta\delta$ pela temperatura surge devido ao acesso de uma conformação na qual o grupo amida não participa de uma ligação de hidrogênio intramolecular. Já na presença da bicela, a ressonância do resíduo E2 acaba por desaparecer do espectro. Somente acima da temperatura de 33° C e na presença do ligante ácido oléico e DHA é que ela reaparece.

Por fim, o resíduo F4 não sofreu mudanças significativas e o resíduo C5 da proteína ligado ao DHA teve o $\Delta\delta$ alterado em torno de +0,1 ppm para o ^1H na presença de bicelas (dados não apresentados).

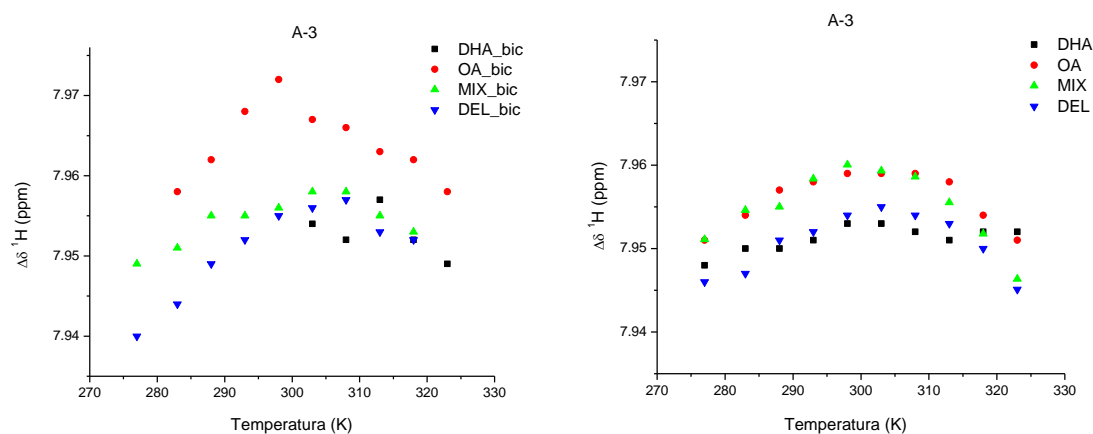


Figura 34 - Gráfico da variação do deslocamento químico ($\Delta\delta$) do ^1H pela temperatura para o resíduo A3 na presença (à esquerda) e na ausência (a direita) de bicelas. Em vermelho, temos o resultado para a proteína com ácido oléico, em verde, para a proteína não delipidada, em azul, a delipidada e, em preto a proteína incubada com DHA.

4.6.2 Região da Fita- β A

Esta região corresponde aos resíduos A6-TWKL TNS-Q14. Observando o espectro ^{15}N -HSQC para o resíduo W8, nota-se um desdobramento de um pico de ressonância em dois picos para os intervalos de temperatura abaixo de 30° C para o grupo amida da cadeia principal, na ausência de bicelas na solução. Interessantemente, o resíduo K9 possui picos de ressonância distintos para as seis condições da proteína, situação que se manteve no intervalo de temperatura medido. Contudo, o sinal deste resíduo some em temperaturas inferiores a 30° C

quando a proteína está incubada com DHA, e na presença de bicelas na solução (Figura 35). Outra característica desse resíduo está no fato de que, na ausência de bicela e com a proteína delipidada, há mais de um pico de ressonância, o que não ocorre quando a bicela está presente na solução. Tanto a característica de picos duplicados para o mesmo resíduo, como o aparecimento e desaparecimento de picos de ressonância de maneira dependente com a temperatura estão associados a mudanças na estrutura e dinâmica da proteína (79). Na estrutura da B-FABP obtida

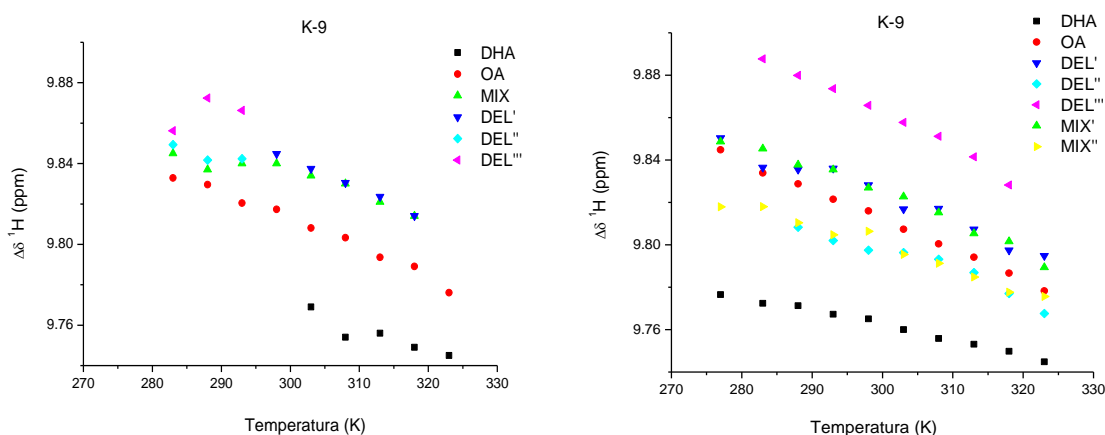


Figura 35 - Gráfico da variação do deslocamento químico ($\Delta\delta$) do ^1H pela temperatura para o resíduo K9 na presença (à esquerda) e na ausência (à direita) de bicelas.. Em vermelho temos a proteína com ácido oléico, em azul claro, azul escuro e lilas a proteína delipidada, em verde e em amarelo a não delipidada e em preto a proteína incubada com DHA.

por RMN, este resíduo K9 possui sua cadeia lateral apontando para o solvente, e possui uma ligação de hidrogênio envolvendo o grupo amida dele com a carbonila do resíduo E129 da cadeia principal da proteína, resíduo vizinho ao Y128, e pertencente ao sítio ativo da proteína. Este conjunto de interações existentes na estrutura da B-FABP parece sofrer uma mudança conformacional proporcionada pela variação da temperatura, com reflexo no comportamento dos picos de ressonância do espectro ^{15}N -HSQC.

Os picos de ressonância associado ao resíduo L10 desapareceram do espectro nas condições em que a proteína estava delipidada na solução com bicelas para todos os intervalos de temperatura medidos⁹. E, para temperaturas abaixo de 30° C e na condição em que a proteína estava incubada com DHA, os picos de ressonância associados a este resíduo desapareceram também.

⁹ Dados não mostrados

O resíduo N12^h apresentou picos de ressonância bem resolvidos, permitindo a identificação do ligante associado à proteína. Esse comportamento aumentou mais para o intervalo de temperatura mais baixo, sendo mais evidente na ressonância do ¹⁵N.

Para o resíduo S13ⁱ, no intervalo de temperatura medido acima de 33° C, todos os picos sumiram tanto para a amostra sem bicela, como também para a amostra com bicela presente na solução. E, abaixo desta temperatura e com bicela na solução, a proteína com DHA também não apresentou no espectro o pico de ressonância associado ao resíduo S13.

O pico associado ao resíduo Q14 (Figura 36) tem um comportamento semelhante ao do resíduo A3 (Figura 34), apresentando uma mudança na taxa de variação do deslocamento químico do ¹H de positivo para negativo com o incremento da temperatura. Este comportamento é compatível com uma mudança conformacional para essa região da proteína. Como a transição ocorreu em um valor de temperatura semelhante para ambos os resíduos, isso é um indicativo de que diferentes regiões da proteína estão populando um novo estado conformacional, energeticamente semelhante, com o acesso sendo proporcionado pela mudança da temperatura.

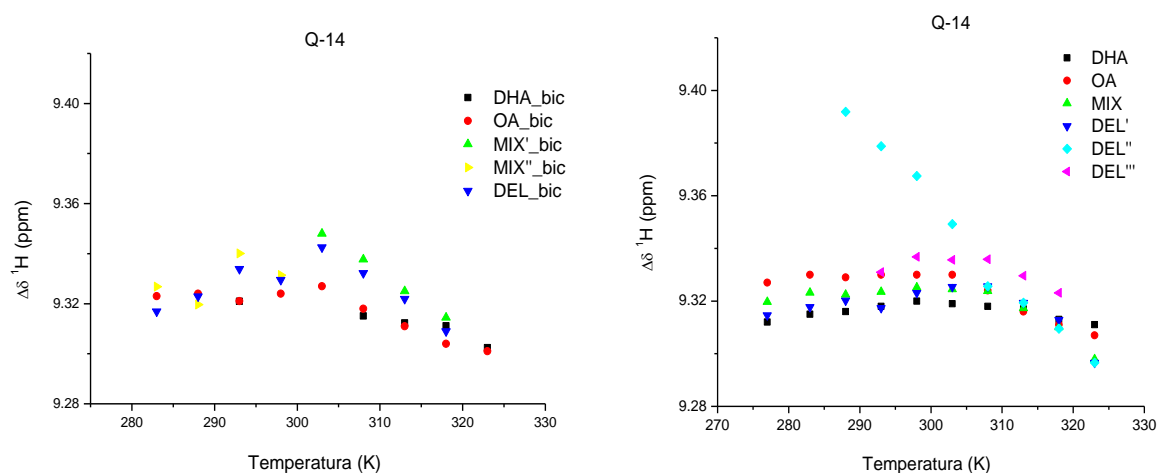


Figura 36 - Gráfico da variação do deslocamento químico ($\Delta\delta$) do ¹H pela temperatura para o resíduo Q14 na presença (à esquerda) e na ausência (à direita) de bicelas. Em vermelho, temos os resultados para a proteína com ácido oléico, em azul claro, azul escuro e lilas para a proteína delipidada, em verde para a não delipidada e em preto a proteína incubada com DHA.

^h Dados não mostrados

ⁱ Dados não mostrados

Esta sequência dos resíduos L10-Q14 pertencentes ao final da fita- β A e fazem interações terciárias com a última fita- β N-terminal, que possui o resíduo Y128 que se liga à cabeça polar do ácido graxo. Da mesma forma que o ligante altera essa região, o empacotamento ou conformação adotado por esses resíduos nestas posições também podem influenciar a conformação da fita- β N-terminal da proteína e a ligação com o ligante. Contudo, não existem relatos experimentais de uma construção da FABP mutante para essa região da proteína e seus possíveis efeitos na interação com ligantes ou modelos de membrana.

O resíduo N15 encontra-se entre a fita- β A e a hélice- α I, conectando esses elementos de estrutura secundária. O pico de ressonância associado a esse resíduo sumiu em temperaturas acima de 30 $^{\circ}$ C na presença de bicela com DHA. Olhando a estrutura da B-FABP, verificou-se que a cadeia lateral deste resíduo possui uma ligação de hidrogênio com a cadeia lateral do resíduo E18, localizado no centro da hélice- α I. Ambas as cadeias são carregadas e apontam para o solvente. O comportamento dos prótons amida pela temperatura pode ser visualizado no termograma da Figura 37 a seguir. Variando a temperatura sem a bicela ocorre uma variação linear até a temperatura de 40 $^{\circ}$ C. Após esse valor, o pico de ressonância deste resíduo some do espectro. Quando a bicela está presente, esse sumiço ocorre numa temperatura 10 $^{\circ}$ C menor. Na presença do DHA, não foi possível visualizar o pico de ressonância para esse resíduo.

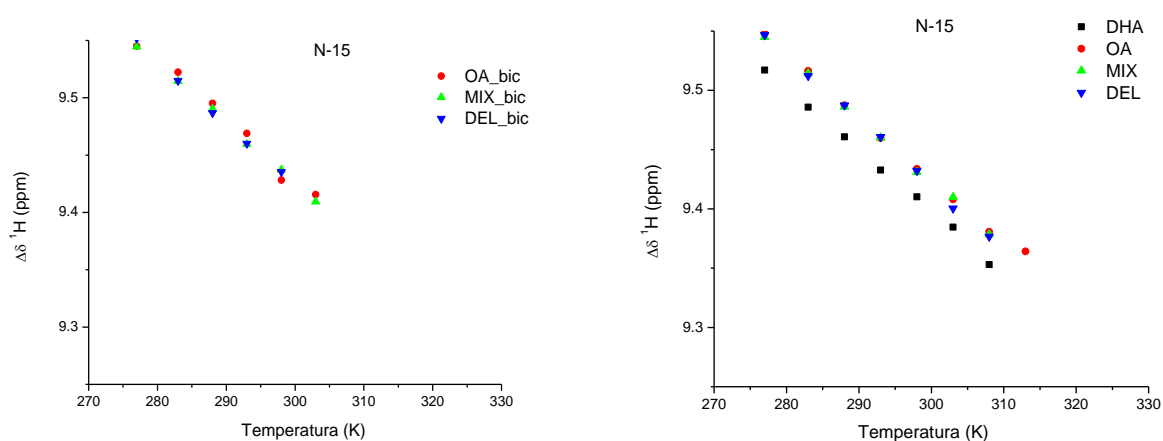


Figura 37 - Gráfico da variação do deslocamento químico ($\Delta\delta$) do ^1H pela temperatura para o resíduo N15 na presença (à esquerda) e na ausência (à direita) de bicelas. Em vermelho, temos os resultados para a proteína com ácido oléico, em azul escuro para a proteína delipidada, em verde para a não delipidada e em preto para a proteína incubada com DHA.

4.6.3 Região da Hélice- α I

Esta hélice é composta pelos resíduos F16-DEYMKA-L23, sendo pertencente à região do portal. Desses resíduos, o F16, Y19, M20 e L23 fazem contatos de van der Waals com o ligante ácido oléico e DHA, conforme a estrutura cristalográfica resolvida dessa proteína com esses ligantes (53). No espectro ^{15}N -HSQC para essa região, o pico de ressonância do resíduo F16 mostrou uma proximidade com o pico de ressonância do resíduo D17. Na condição em que a proteína encontra-se delipidada e na solução com bicelas, foram observadas heterogeneidades no espectro ^{15}N -HSQC envolvendo os picos de ressonância associados ao grupo amida de tais resíduos (

Figura 38), impedindo o seu assinalamento. Apesar disto, os picos de

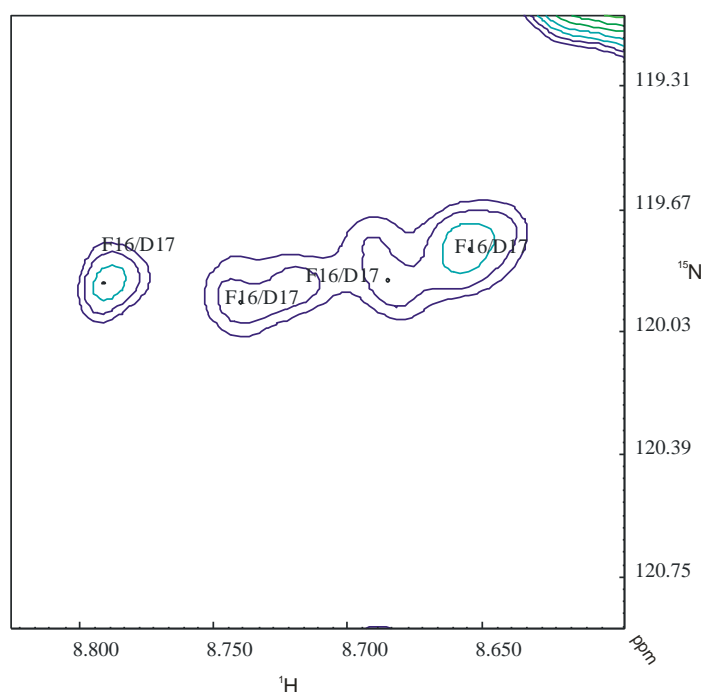


Figura 38 - Espectro ^{15}N -HSQC da B-FABP delipidada em solução com bicela. Em destaque, uma ampliação da região dos picos de ressonância do resíduo F16 e D17.

ressonância envolvendo os resíduos F16 e D17 servem como indicativos da presença de outras famílias conformacionais para essa região da B-FABP.

Para o resíduo E18 foi observado um comportamento monotônico para a variação do δ do próton com a temperatura para todas as condições de medida da solução, Figura 39. Contudo, em temperaturas acima de 33° C, surge mais um pico de ressonância para este resíduo na condição em que a proteína está delipidada e sem bicelas na solução, mostrando novamente, uma heterogeneidade no sistema de spin para esta região da proteína. Quando a bicela encontra-se presente, essa heterogeneidade desaparece somente em temperaturas abaixo de 15° C e acima de 30° C, visualizada como um único pico de ressonância para este resíduo. Nesta situação, a proteína possui um sinal de ressonância semelhante às outras condições da solução com DHA. A presença da bicela também favoreceu a separação do estado ligado (DHA ou ácido oléico) do estado delipidado e não delipidado na ressonância do ^{15}N , para temperaturas maiores que 25° C, conforme o gráfico na Figura 39.

Para o resíduo Y19 (Figura 41), não houve uma diferenciação dos picos de ressonância na presença do ligante (DHA ou ácido oléico) nas diferentes soluções sem bicelas. Na presença de bicela, a solução protéica com DHA fez com que o pico desse resíduo sumisse em temperaturas menores que 30° C, além de tornar indistinguível o estado ligado com ácido oléico do estado não delipidado (legenda vermelha de e verde respectivamente). Curiosamente, há presente dois sinais de

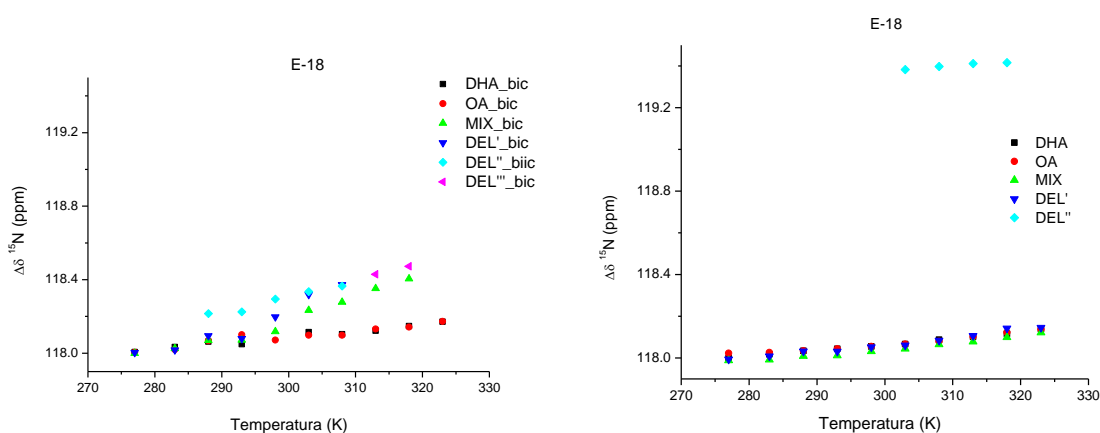


Figura 39 - Gráfico da variação do deslocamento químico ($\Delta\delta$) do ^{15}N pela temperatura para o resíduo E18 na presença (à esquerda) e na ausência (à direita) de bicelas. Em vermelho, temos os resultados para a proteína com ácido oléico, em azul escuro, azul claro e lilás para a proteína delipidada, em verde a não delipidada, e em preto a proteína incubada com DHA.

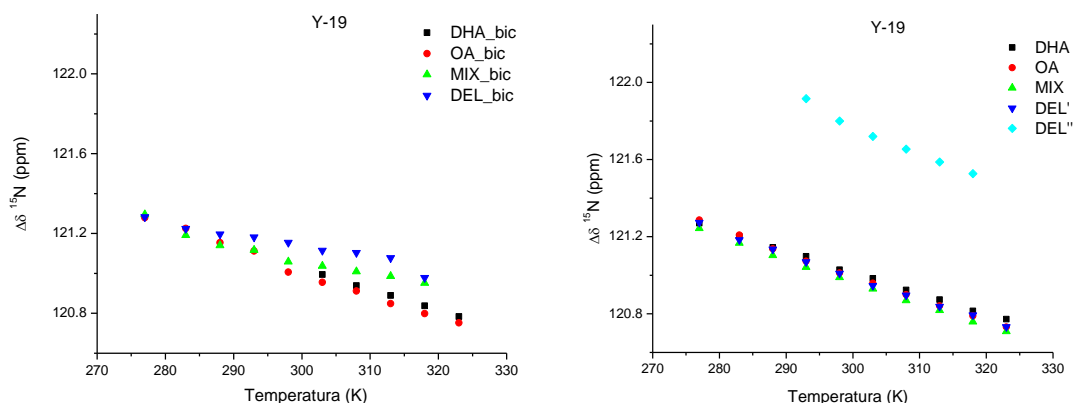


Figura 41 - Gráfico da variação do deslocamento químico ($\Delta\delta$) do ^{15}N pela temperatura para o resíduo Y19 na presença (à esquerda) e na ausência (à direita) de bicelas. Em vermelho, temos os resultados para a proteína com ácido oléico, em azul escuro, azul claro e lilás para a proteína delipidada, em verde para a não delipidada, e em preto para a proteína incubada com DHA.

ressonância associados ao estado delipidado na ausência de bicelas para o intervalo de temperatura entre 20° C e 45° C. Já na presença de bicelas (Figura 41 à esquerda), isso não ocorre para o grupo amida deste resíduo. No resíduo M20, conforme melhor visualizado na ressonância do ^{15}N na Figura 40, o pico de ressonância da B-FABP ligada com DHA some para temperaturas menores que 30° C, na situação em que bicelas encontram-se na solução. E, abaixo de 10° C, quando o ácido oléico está na solução de bicelas, o pico de ressonância desse resíduo desaparece. Nesta situação, em que bicelas estão presentes na solução, surgem

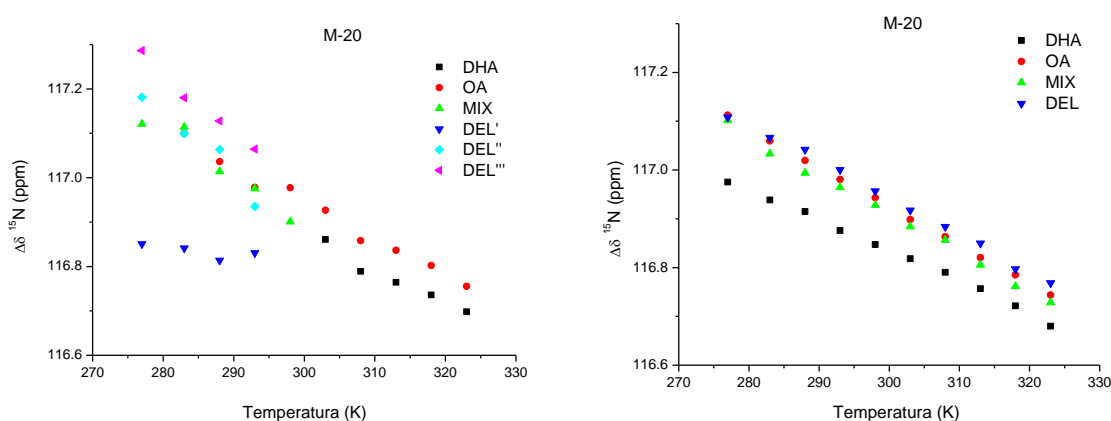


Figura 40 - Gráfico da variação do deslocamento químico ($\Delta\delta$) do ^{15}N pela temperatura para o resíduo M20 na presença (à esquerda) e na ausência (à direita) de bicelas.. Em vermelho, temos os resultados para a proteína com ácido oléico, em azul escuro, azul claro e lilás para a proteína delipidada, em verde para a não delipidada e em preto para a proteína incubada com DHA.

também três famílias conformacionais associadas a três picos de ressonância para o estado delipidado nas temperaturas abaixo de 20° C. Acima desta temperatura, esses três picos de ressonância associados à proteína delipitada somem do espectro ^{15}N -HSQC. Na condição em que as bicelas não se encontram presentes na solução e o DHA está ligado na proteína, temos um único pico de ressonância em todo o intervalo de temperatura medido, conforme visualizado na Figura 40 à direita. Este resíduo, com a proteína no estado delipidado, comportou-se de forma distinta na solução com e sem bicelas.

Para a K21 o comportamento do hidrogênio amida foi semelhante em todas as condições em que a temperatura foi variada, sem distinção na taxa de variação e nos valores assumidos pelo deslocamento químico para o ^1H . Exceção foi o estado delipidado, que teve um comportamento na solução sem bicela distinto da solução com bicela. Contudo, isso não ocorre para o ^{15}N . A variação térmica do $\Delta\delta$ do ^{15}N deste resíduo pode ser visto na Figura 42. Este resíduo localiza-se no meio da hélice- α II, com a sua cadeia lateral apontando para o solvente, estando envolvido na interação com modelos de membrana (49). O resíduo A22, Figura 43, também não possui mudanças significativas com o tipo de ligante e/ou bicela presente na solução. A única característica deste resíduo, é que o estado delipidado e sem bicela possui dois picos de ressonância em todo o intervalo de temperatura medido. Isto demonstra pelo menos duas populações conformacionais do resíduo. Já na presença da bicela, o espectro não possui esta heterogeneidade, havendo somente um pico de ressonância.

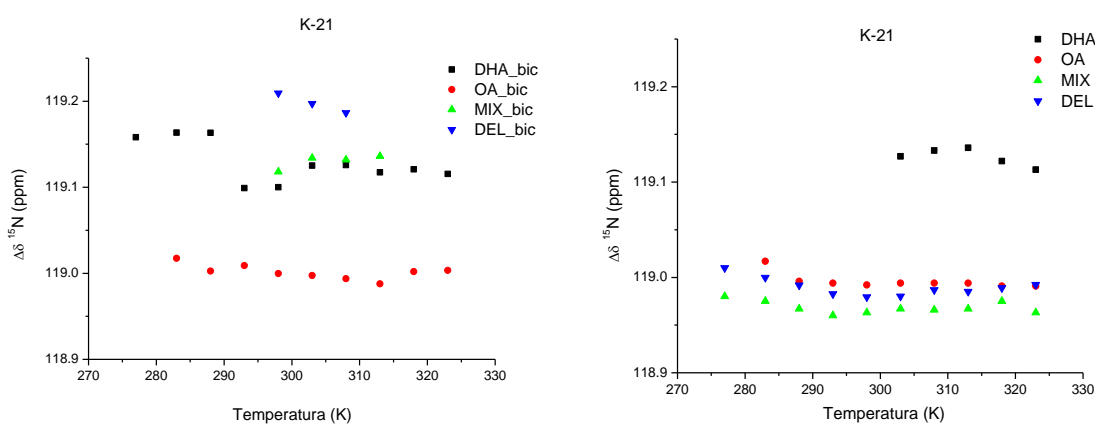


Figura 42 - Gráfico da variação do deslocamento químico ($\Delta\delta$) do ^{15}N pela temperatura para o resíduo K21 na presença (a esquerda) e na ausência (a direita) de bicelas. Em vermelho, temos os resultados para a proteína com ácido oléico, em verde para a proteína não delipitada, em azul para a delipitada e em preto para a proteína incubada com DHA.

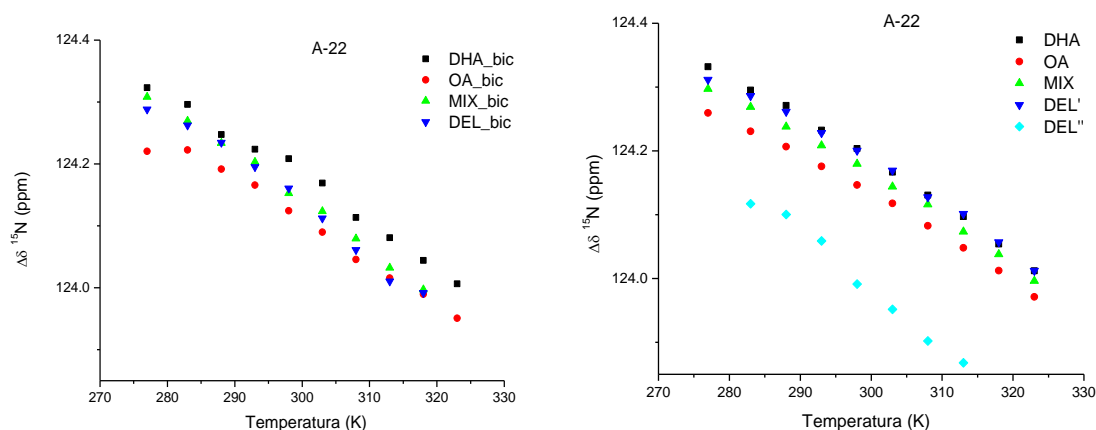


Figura 43 - Gráfico da variação do deslocamento químico ($\Delta\delta$) do ^{15}N pela temperatura para o resíduo A22 na presença (à esquerda) e na ausência (à direita) de bicelas. Em vermelho, temos os resultados para a proteína com ácido oléico, em azul escuro, azul claro para a proteína delipidada, em verde para a não delipidada, e em preto para a proteína incubada com DHA.

O resíduo L23, C-terminal da hélice- α I, teve um comportamento não-linear para a variação do δ pela temperatura para o estado delipidado tanto na presença como na ausência de bicela (Figura 44). Na presença do DHA e das bicelas também ocorre uma mudança nesta taxa de variação entre 20 $^{\circ}$ C e 25 $^{\circ}$ C para os prótons amida deste resíduo. Esse comportamento não linear para a variação do δ com a temperatura, o desaparecimento de picos de ressonância e o surgimento de heterogeneidades é estendido para resíduos pertencentes tanto à mesma estrutura local (resíduo V25, Figura 45), como também para resíduos pertencentes a

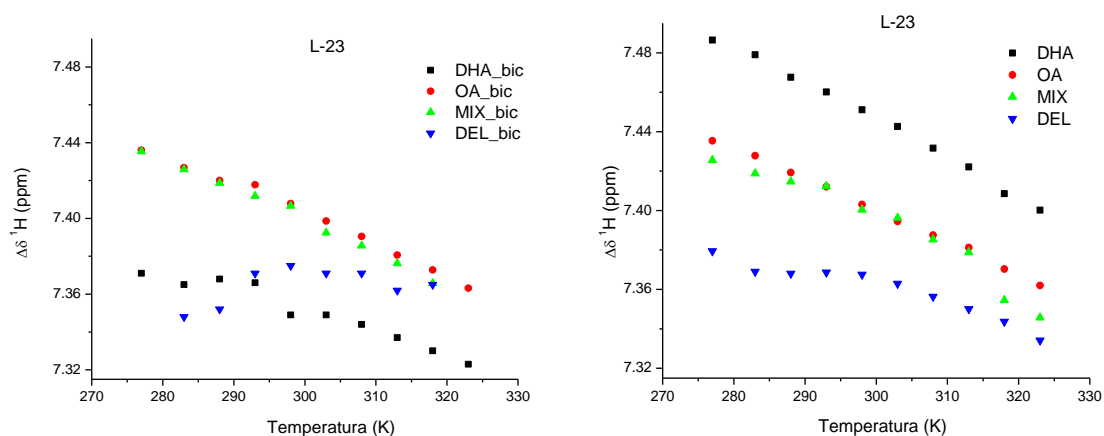


Figura 44 - Gráfico da variação do deslocamento químico ($\Delta\delta$) do ^1H pela temperatura para o resíduo L23 na presença (à esquerda) e na ausência (à direita) de bicelas. Em vermelho, temos os resultados para a proteína com ácido oléico, em azul escuro para a proteína delipidada, em verde para a não delipidada e em preto para a proteína incubada com DHA.

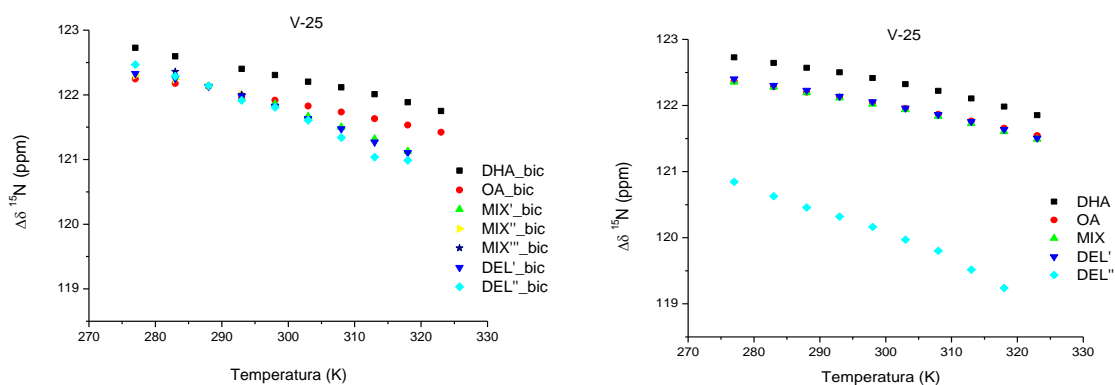


Figura 45 - Gráfico da variação do deslocamento químico ($\Delta\delta$) do ^1H pela temperatura para o resíduo V25 na presença (à esquerda) e na ausência (à direita) de bicelas. Em vermelho, temos os resultados para a proteína com ácido oléico, em azul claro e azul escuro para a proteína delipidada, em verde, em amarelo e em estrela para a não delipidada, e em preto para a proteína incubada com DHA.

estruturas vizinhas (resíduos E72 e D76, Figura 46, todos eles pertencentes à região do portal). Isto é mais um indício de que outra conformação é acessível para esta proteína na região do portal.

Na Figura 45, temos o termograma do deslocamento químico do resíduo V25 pela temperatura obtida através do experimento ^{15}N -HSQC. Nele podem ser visualizadas heterogeneidades que foram encontradas no espectro ^{15}N -HSQC da B-FABP humana na condição em que a proteína encontra-se no estado delipidado na solução sem bicela.

Na Figura 46, temos tanto heterogeneidades (resíduo E72) como também taxas não-lineares para a variação do δ pela temperatura (resíduo D76). A presença da bicela removeu a heterogeneidade do resíduo E72 encontrada no estado delipidado da proteína. Já o resíduo D76 teve os picos de ressonância suprimidos no intervalo de temperatura medido, tanto para a proteína no estado *apo* como para a proteína não delipidada. A bicela promoveu variações não-lineares no deslocamento químico do resíduo D76 quando o ligante ácido oléico encontrava-se ligado a proteína. Com o DHA presente, os picos de ressonância deste resíduo foram suprimidos no intervalo de temperatura abaixo de 30 °C.

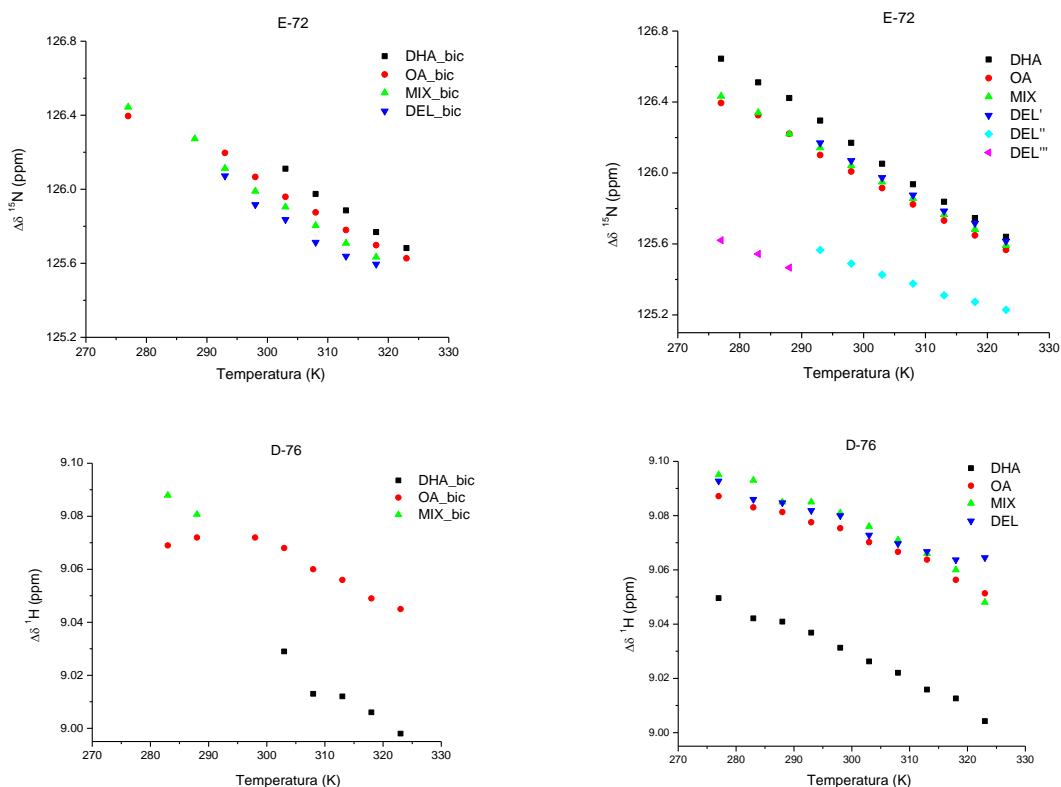


Figura 46 - Gráfico da variação do deslocamento químico ($\Delta\delta$) do ^{15}N (E-72) e do ^1H (D-76) pela temperatura na presença (à esquerda) e na ausência (à direita) de bicelas. Em vermelho, temos os resultados para a proteína com ácido oléico, em azul claro, azul escuro e lilás para a proteína delipidada, em verde, para a não delipidada, e em preto para a proteína incubada com DHA.

Observando a estrutura da B-FABP para a região portal, percebemos que a cadeia lateral do resíduo L23, as cadeias dos resíduos hidrofóbicos G24 e V25 que conectam a hélice- α I com a hélice- α II, o resíduo W97 pertencente à volta- β que conecta as fitas- β G com a fita- β H, e a F119 pertencente à volta- β que conecta as fitas- β I e J, apontam todos para a mesma região da B-FABP, no caso, o seu bolsão hidrofóbico. Já os resíduos com cadeia lateral carregada D76, R78 e K100, sendo o D76 e R78 pertencentes à volta- β que conecta as fitas- β E e F, e o resíduo K100 pertencente à volta- β que conecta as fitas- β G e H, são vizinhos da cadeia lateral do resíduo L23, adicionando carga elétrica a essa mesma região. Esse conjunto de conexões terciárias une essas quatro regiões da B-FABP: as voltas- β entre as hélices- α I e II e as voltas- β que unem as fitas- β E/F, G/H e I/J. Esse arranjo pode ser visualizado na Figura 47. Já os resíduos polares D77, D98 e D121 pertencentes

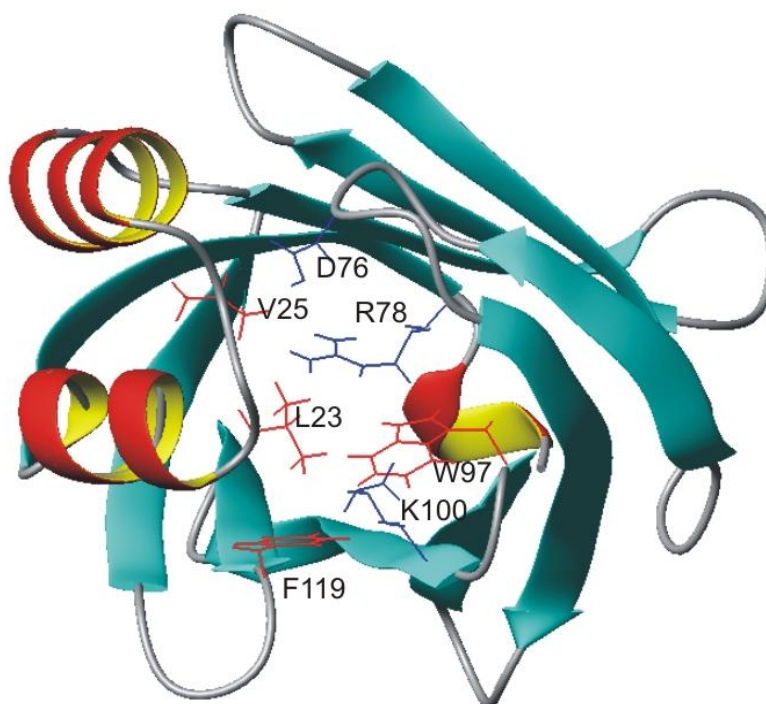


Figura 47 - Estrutura da B-FABP mostrando as cadeias laterais dos resíduos da região do portal. Em vermelho, temos as cadeias laterais dos resíduos hidrofóbicos L23, V25, W97 e F119. Em azul, as cadeias laterais dos resíduos D76, R78 e K100, portadores de carga elétrica. Os resíduos da volta- β C-D não foi incluído. Todas as cadeias laterais apontam para dentro do bolsão da proteína (figura baseada no pdb 1JJX construída com o programa MolMol).

a estas voltas- β ajudam também na sua estabilidade, com suas cadeias laterais apontando para o solvente.

A região do portal, compreendendo a hélice- α I da B-fABP, possui heterogeneidade no espectro ^{15}N -HSQC associada aos resíduos F16, Y19, M20 e L23. Como todos esses resíduos fazem contatos com o ligante, participando do seu aprisionamento no interior da B-FABP, parece haver para cada ligante uma família conformacional associada no estado delipidado. Se essa taxa de troca conformacional for lenta o suficiente, elas apresentarão picos distintos no espectro de RMN. Esta situação parece acontecer no estado delipidado, no qual as heterogeneidades mencionadas estão associadas a uma multiplicidade conformacional dessa região da proteína. Este processo de seleção conformacional na proteína pelo ligante é conhecido como ajuste seletivo (do inglês *selected fitting*). Além desses, os resíduos E72, T74, D76 e R78 interagem indiretamente com a cabeça polar do ácido graxo via ligação de hidrogênio mediado por moléculas de água. Curiosamente, eles também apresentam mudanças significativas no espectro

^{15}N -HSQC quando bicela foi adicionada à solução, com o resíduo D76 sofrendo as mudanças mais significativas. A taxa de variação do δ pela temperatura para a proteína ligada ao ácido oléico (Figura 46) apresentou um comportamento não-linear. O pico de ressonância sumiu para valores abaixo de 20° C quando o DHA estava presente na solução com bicela, assim como sumiu o do resíduo T74. As heterogeneidades do espectro do estado delipidado também sumiram para esses dois resíduos. E, para o resíduo D76 na proteína delipitada, o sinal só aparece abaixo da temperatura de 15° C na solução com bicela. As características encontradas para esses resíduos são também compatíveis com uma população da proteína acessando um estado conformacional alternativo, induzido pela temperatura. Uma população da proteína (com o ligante ácido oléico) possui o resíduo D76 fazendo ligação de hidrogênio com o solvente (intermolecular), e a outra população alternativa possui este resíduo realizando uma ligação de hidrogênio intramolecular. Nas vinte estruturas de menor energia obtidas das restrições por RMN (pdb 1JJX), seis delas possuem uma ligação de hidrogênio envolvendo o grupo HN do resíduo D76 e o grupo CO da G24 da cadeia principal, e 13 estruturas envolvendo ligações de hidrogênio da cadeia lateral do D76 com o grupo HN da G26.

4.6.4 Região da Hélice- α II

A hélice- α II é a segunda hélice alfa da família de proteínas FABP, sendo composta pelos resíduos F27-ATRQVGN-V35. O primeiro resíduo dessa hélice, o F27, teve o pico de ressonância associado desaparecendo acima da temperatura de 20° C tanto na presença quanto na ausência de bicela. Já para a faixa de temperatura abaixo de 20° C, o pico de ressonância deste resíduo encontra-se presente no espectro, podendo-se observar que a proteína com DHA possui um sinal de ressonância distinto (0,15 ppm de diferença) da condição em que o ácido oléico está na solução ou a proteína está delipitada.

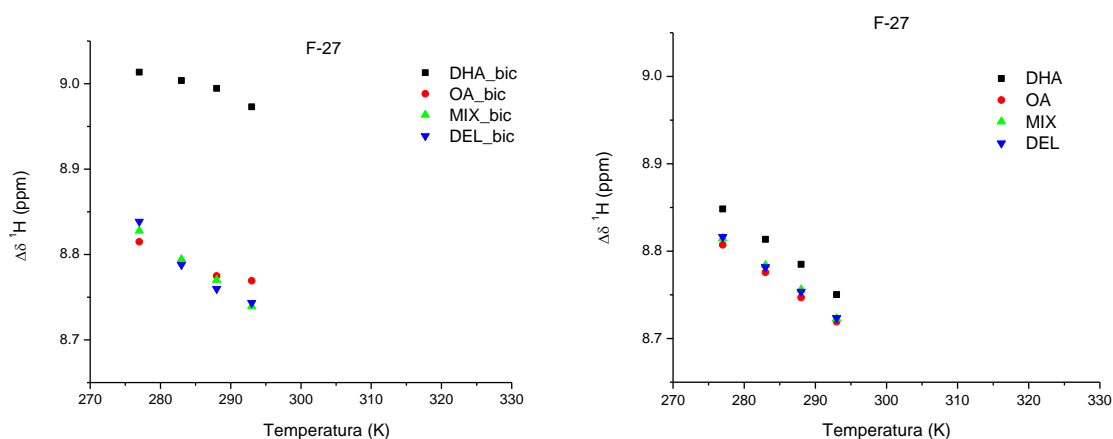


Figura 48 - Gráfico da variação do deslocamento químico ($\Delta\delta$) do ^1H pela temperatura para o resíduo F27 na presença (à esquerda) e na ausência (à direita) de bicelas. Em vermelho, temos os resultados para a proteína com ácido oléico, em azul para a proteína delipidada, em verde para a não delipidada, e em preto para a proteína incubada com DHA.

O pico de ressonância associado ao resíduo A28 não aparece em nenhuma temperatura medida quando há bicelas na solução. Por outro lado, apresenta picos duplos na situação em que a proteína estava delipidada na solução sem bicela. O resíduo T29 possui a sua cadeia lateral apontando para o interior do bolsão da B-FABP, estando envolvido na interação com o ligante por contatos de van der Waals com a cadeia acíclica do ácido oléico. A cadeia lateral do resíduo T29 possui uma distância aproximada de 4 Å entre o seu CG2 e o C10 do ligante (53). Na Figura 49 temos o gráfico da variação do δ de dois picos de ressonância associados a heterogeneidades do ^1H para a condição em que a proteína está delipidada e em solução com bicela. Isto ocorre somente na faixa de temperatura medida abaixo de 35° C. Curiosamente, quando incubada com DHA, este mesmo resíduo T29 possui seu pico de ressonância ausente nesse mesmo intervalo de temperatura. Além disto, esse resíduo teve não-linearidade na variação do deslocamento químico ($\Delta\delta$) com a temperatura para o estado delipidado em bicelas na mesma temperatura em que o pico da proteína com DHA sumiu, indicativo de um comportamento diferenciado para nesta condição. Das vinte estruturas obtidas por RMN da B-FABP (pdb 1JJX), verifica-se uma ligação de hidrogênio entre o HG1 do resíduo T29 com o oxigênio da carbonila do resíduo A75 em onze delas. Outras duas ligações de hidrogênio

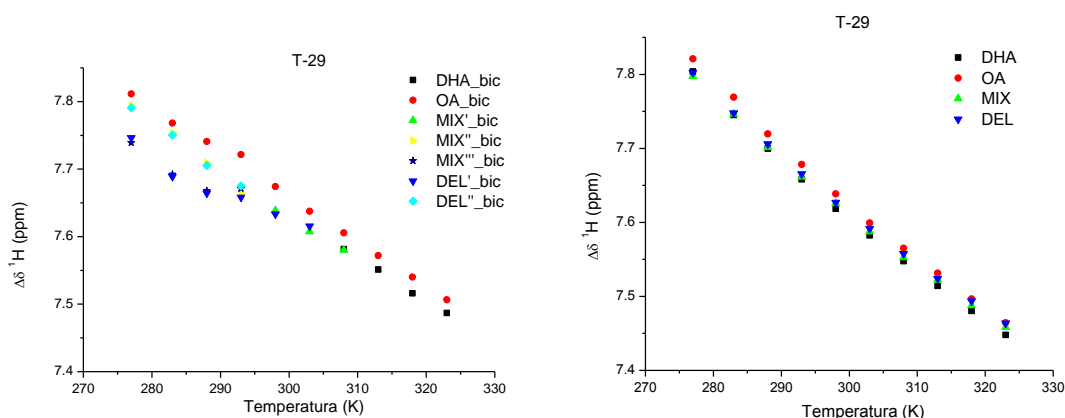


Figura 49 - Gráfico da variação do deslocamento químico ($\Delta\delta$) do ^{15}N pela temperatura para o resíduo T29 na presença (à esquerda) e na ausência (à direita) de bicelas.. Em vermelho, temos os resultados para a proteína com ácido oléico, em azul escuro, azul claro para a proteína delipidada, em verde, em amarelo e em estrela para a não delipidada, e em preto para a proteína incubada com DHA.

envolvem a cadeia lateral do resíduo D76. Este resíduo parece ter uma fração populacional envolvida em ligação de hidrogênio e outra não. Quando na solução com bicela, o resíduo A75 teve seus picos de ressonância também ausentes do espectro de RMN no estado delipidado da proteína. Abaixo da temperatura de 30°C , esse sumiço permanece também na presença de ácido oléico e DHA.

No caso do resíduo R30, a sua cadeia lateral aponta para a hélice- α I, fazendo ligações de hidrogênio com o *OD1* do resíduo D17. Como característica do espectro de RMN, o resíduo R30 (Figura 50) na condição em que havia bicela na solução teve suprimido os picos de ressonância do estado delipidado e não

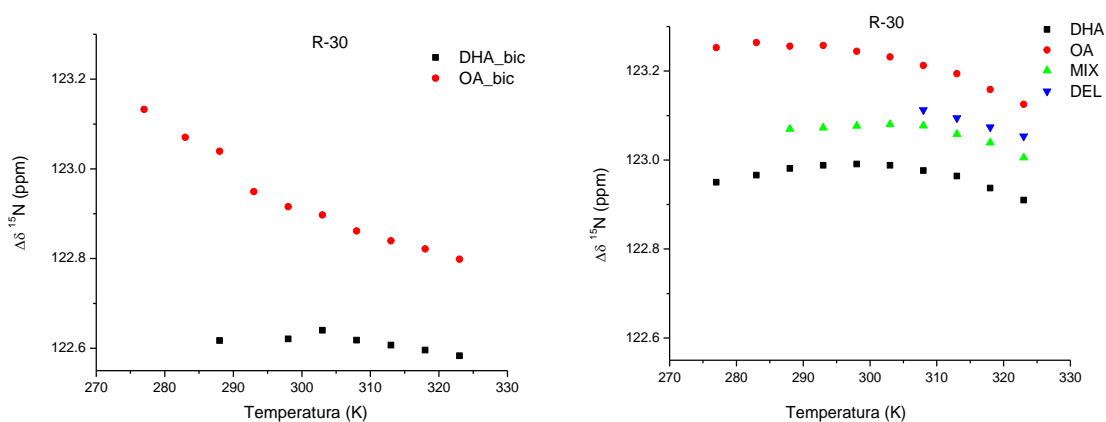


Figura 50 - Gráfico da variação do deslocamento químico ($\Delta\delta$) do ^{15}N pela temperatura para o resíduo R30 na presença (à esquerda) e na ausência (à direita) de bicelas. Em vermelho, temos os resultados para a proteína com ácido oléico, em azul escuro, azul claro para a proteína delipidada, em verde para a não delipidada, e em preto para a proteína incubada com DHA.

delipidado. Na ausência de bicela, esses picos somente desaparecem abaixo da temperatura de 35° C para a proteína delipidada, e 15° C para a não delipidada. O resíduo Q31 possui sua cadeia lateral apontando para o solvente de uma maneira similar àquela descrita para o resíduo F27, estando ambos do mesmo lado da hélice- α II. O comportamento da ressonância do ^{15}N pode ser visualizado na Figura 51. Este resíduo apresentou um comportamento não-linear da $\Delta\delta$ pela temperatura também para o próton na condição em que a proteína não estava delipidada, sendo mais acentuado na presença de bicelas na solução. Este comportamento é compatível com mudanças na estrutura e/ou dinâmica da B-FABP para este resíduo. Na estrutura resolvida por RMN, ele só realiza ligações de hidrogênio com os resíduos da hélice- α II, sem contatos terciários. Parece que há uma população da proteína acessando um estado em que a ligação de hidrogênio é feita com o solvente, enfraquecendo a estrutura da hélice- α II.

O resíduo V32 possui contatos de van der Waals do *CG1* da sua cadeia lateral com o *C14* da cadeia acil do DHA. A cadeia lateral deste resíduo aponta para a volta- β entre as fitas- β C e D, contribuindo para um maior empacotamento dessa região. Para este resíduo foi possível distinguir o estado ligado ao DHA e ao ácido oléico, tanto na solução com bicela como na sem bicela (Figura 52). A condição não delipidada e delipidada tiveram um comportamento semelhante em relação ao deslocamento químico da ressonância do ^{15}N na variação da temperatura. Porém, para a ressonância do próton, este resíduo teve um comportamento semelhante

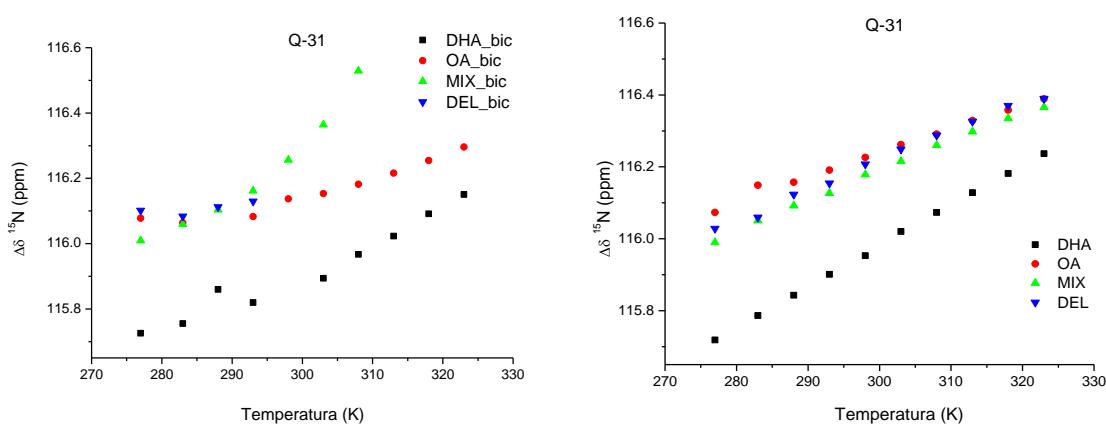


Figura 51 - Gráfico do $\Delta\delta$ do ^{15}N para o resíduo Q31 na presença (à esquerda) e na ausência (à direita) de bicelas. Em vermelho temos a proteína com ácido oléico, em azul a proteína delipidada, em verde a não delipidada, e em preto a proteína incubada com DHA.

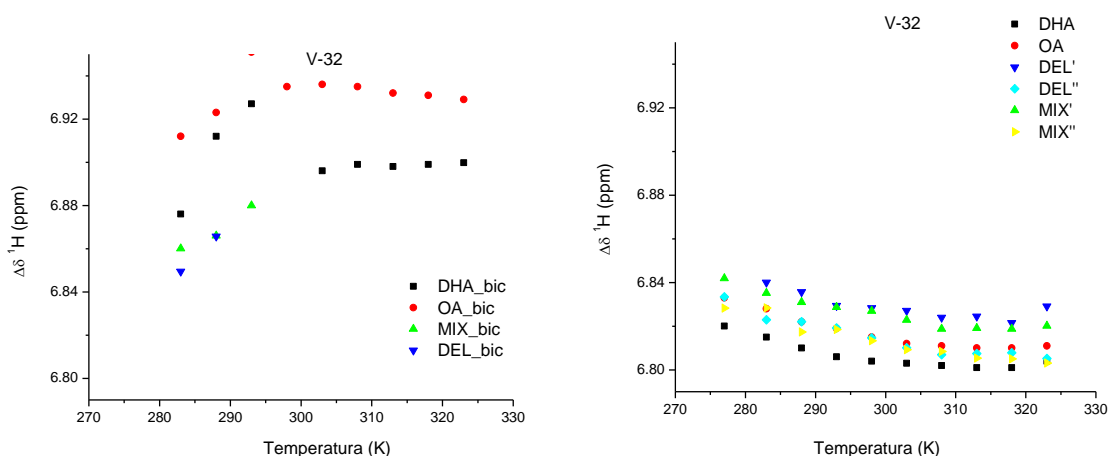


Figura 52 - Gráfico da variação do deslocamento químico ($\Delta\delta$) do ^1H pela temperatura para o resíduo V32 na presença (à esquerda) e na ausência (à direita) de bicelas. Em vermelho, temos os resultados para a proteína com ácido oléico, em azul claro e azul escuro para a proteína delipidada, em verde e em amarelo para a não delipidada, e em preto para a proteína incubada com DHA.

àquele observado para os resíduos A3 e Q14, com característica peculiar na temperatura de 20° C. Nesta temperatura ocorre uma inversão do sinal da taxa de variação térmica do $\Delta\delta$ de positivo para negativo no caso do ácido oléico, e variação próxima de zero no caso do DHA. Na condição em que não há bicela, o resíduo V32 comporta-se de forma inversa, com uma mudança da taxa de variação do $\Delta\delta$ pela temperatura de negativa para positiva em torno da temperatura de 45° C. No resíduo A3, isso ocorre tanto na solução com bicela como também na solução sem bicela a 25° C. Este resíduo também possui características que acessam conformações em que uma população possui ligação de hidrogênio e a outra não possui esta ligação. Na estrutura resolvida por RMN, estas ligações de hidrogênio são para resíduos vizinhos pertencentes à hélice- α II, sem ligação terciária para resíduos distantes na estrutura da proteína. Somente em uma estrutura de vinte, existe uma ligação de hidrogênio com o resíduo F57.

O resíduo G33 também participa da acomodação do ácido graxo no interior da B-FABP, tanto para o DHA como para o ácido oléico, interagindo com o C12 e C13 da cadeia acil do DHA, e com o C11, C12, C13 do ácido oléico (53). Contudo, esse resíduo mostrou um comportamento distinto para a variação do δ na solução sem bicela somente quando o DHA estava presente (Figura 53). Na condição em que há bicelas na solução, e acima de 30° C, temos situações de δ distintas para o ácido oléico e para o DHA (cerca de 0,25 ppm). Abaixo de 30° C, os picos de

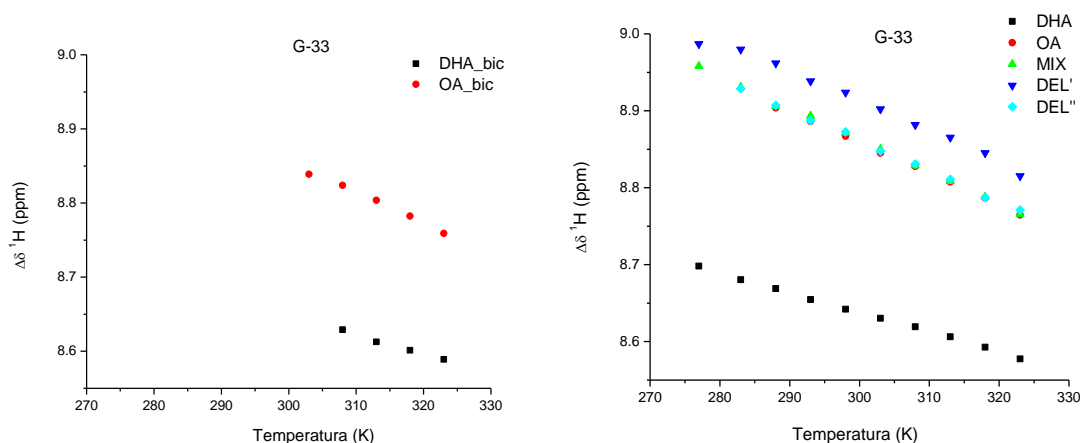


Figura 53 - Gráfico da variação do deslocamento químico ($\Delta\delta$) do ^1H pela temperatura para o resíduo G33 na presença (à esquerda) e na ausência (à direita) de bicelas. Em vermelho, temos os resultados para a proteína com ácido oléico, em azul claro e azul escuro para a proteína delipidada, em verde para a não delipidada, e em preto para a proteína incubada com DHA.

ressonância do resíduo G33 desaparecem em todas as condições na presença de bicelas. (Figura 53 à esquerda).

O resíduo N34, quando em bicela, sofre uma mudança na variação do δ com a temperatura em 10°C para o DHA, e 20°C para o ácido oléico. Para a proteína delipidada, esse resíduo não teve um pico de ressonância visível no espectro ^{15}N -HSQC. E, para o estado não delipidado, a ressonância desse resíduo sumiu acima de 20°C . Na condição em que não há bicelas e no intervalo de temperatura inferior a 20°C , o pico de ressonância da componente delipidada some, sendo possível

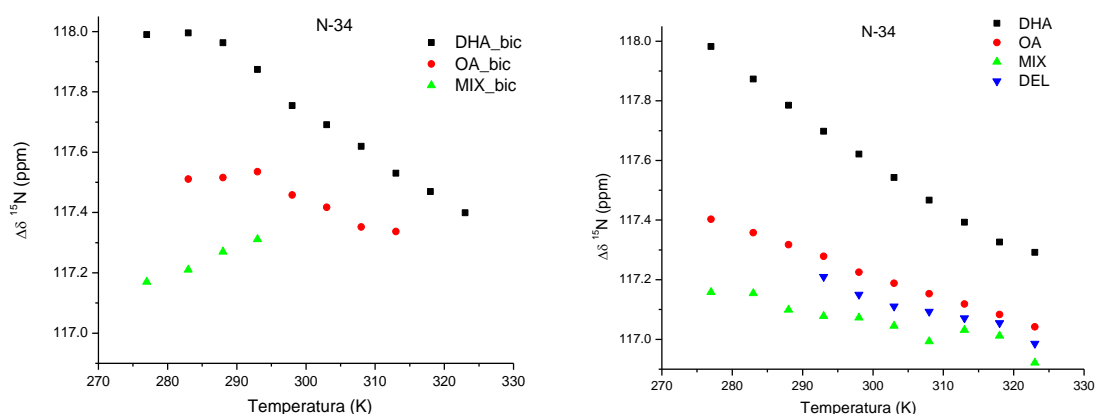


Figura 54 - Gráfico da variação do deslocamento químico ($\Delta\delta$) do ^{15}N pela temperatura para o resíduo N34 na presença (à esquerda) e na ausência (à direita) de bicelas. Em vermelho, temos os resultados para a proteína com ácido oléico, em azul para a proteína delipidada, em verde para a não delipidada, e em preto para a proteína incubada com DHA.

distinguir também, no gráfico da variação térmica do δ , o estado não delipidado (em verde) do estado com o ligante (em preto e vermelho) (Figura 54). Observando a estrutura resolvida por RMN, a cadeia lateral deste resíduo realiza ligações de hidrogênio com o D17 da hélice- α I, conectando essas duas estruturas. O resíduo D17 infelizmente não pode ser analisado com os dados de RMN devido a ambiguidades com a F16. Na ressonância do próton não há um comportamento não-linear para a $\Delta\delta$ pela temperatura. Das vinte estruturas de menor energia, dezesseis fazem ligação de hidrogênio do grupo amida do N34 para a carbonila da R30, indicando maior estruturação desse resíduo da hélice.

O resíduo V35 também sofre uma transição de $\Delta\delta$ na solução com bicelas na temperatura de 15° C e 20° C para o DHA e ácido oléico, respectivamente (Figura 55). Acima de 20° C, o pico de ressonância associado a esse resíduo para a condição delipitada também desaparece. Os picos na solução com bicela foram todos distinguíveis. Este resíduo também apresentou não-linearidade na variação do δ pela temperatura, mas somente quando a proteína estava na solução de bicela. Já na solução sem bicelas, só é observado pico de ressonância para o estado delipidado e não delipidado a partir de 20° C. Novamente, essas não linearidades para o grupo amida do resíduo V35 indicam que uma fração populacional da proteína têm uma ligação de hidrogenio neste grupo amida e uma outra fração não possui tal ligação.

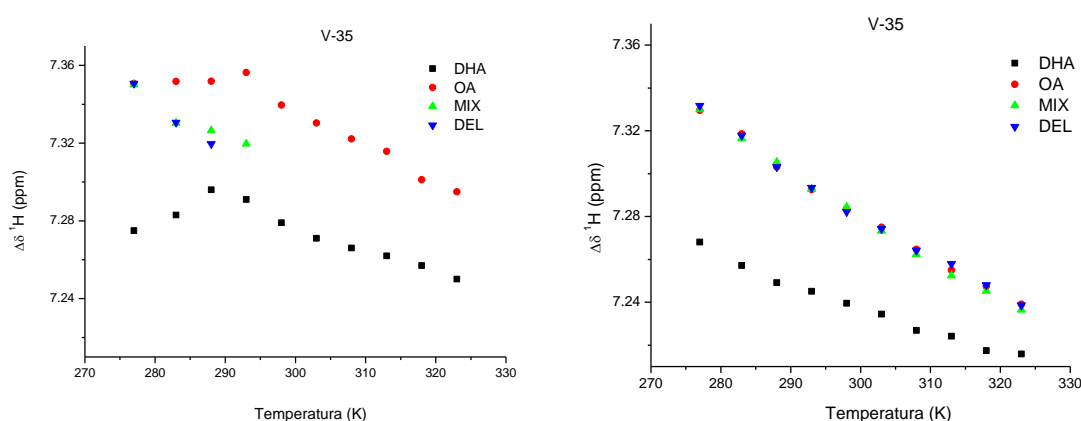


Figura 55 - Gráfico da variação do deslocamento químico ($\Delta\delta$) do ^1H pela temperatura para o resíduo V35 na presença (à esquerda) e na ausência (à direita) de bicelas. Em vermelho, temos os resultados para a proteína com ácido oléico, em azul para a proteína delipitada, em verde para a não delipitada, e em preto para a proteína incubada com DHA.

Nos dados da variação térmica do δ , há notadamente um comportamento diferenciado dos picos de ressonância para todos os resíduos da hélice- α II quando se comparam as medidas da solução protéica com e sem bicelas. A presença da bicela interferiu na estrutura e dinâmica desses resíduos, sendo o efeito disso um alargamento e até mesmo a supressão dos picos de ressonância dos resíduos. Além disso, também foi observado um comportamento não-linear da variação do δ pela temperatura. Vale ressaltar que essas variações do δ não foram extensas o suficiente para caracterizar um reenovelamento dos elementos da estrutura secundária, como por exemplo, a transformação de hélices- α ou fitas- β em loops. Parece que esse rearranjo conformacional, induzido pela temperatura ou pelo ligante, preserva alguns dos elementos da estrutura secundária da B-FABP.

Outro mecanismo que pode influenciar o espectro de RMN ^{15}N -HSQC é a taxa de troca dos prótons amida (a sonda magnética) com as moléculas da água no solvente. Variações nessa taxa, induzidas por um maior ou menor empacotamento e/ou flexibilidade da proteína, podem resultar na supressão de picos de ressonância. Contudo, tanto neste caso como no outro, as mudanças são favorecidas pelo estado da proteína (ligado ou não ligado), o tipo de ligante e a presença ou ausência de bicelas. Em todas estas situações, a formação de ligações de hidrogênio intermoleculares ou intramoleculares (solvente), tanto nas cadeias laterais como na cadeia principal dos resíduos devido à presença do tipo de ligante e/ou bicelas, pode induzir torções ou mudanças na dinâmica dessas regiões, como também mudanças na taxa de troca da sonda utilizada (prótons amida) com o solvente. Uma maneira para alterar a dinâmica do sistema, na tentativa de verificar a origem da supressão dos picos de ressonância, seria alterar a viscosidade do meio usando uma solução aquosa com glicerol ou glicose. Outra possibilidade compatível com esta supressão de picos seria a B-FABP estar ligada transientemente na bicela através da hélice- α II.

4.6.5 Volta- β entre a hélice- α II e fita- β B

Podemos verificar no espectro ^{15}N -HSQC que o resíduo T36 (Figura 56) tem seu pico de ressonância suprimido na condição em que a proteína está delipidada, na temperatura acima de 20° na solução com bicelas. Já na solução sem bicelas, as ressonâncias do ^{15}N no estado delipidado e não delipidado da proteína coincidem com o estado em que o ácido oléico está ligado na B-FABP na faixa de temperatura medida. O resíduo K37 desapareceu em todos os experimentos.

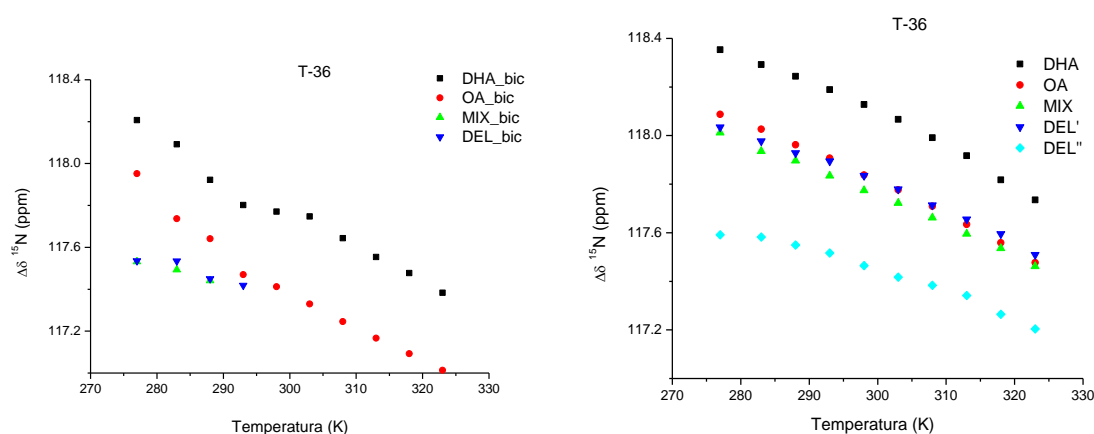


Figura 56 - Gráfico da variação do deslocamento químico ($\Delta\delta$) do ^{15}N pela temperatura para o resíduo T36 na presença (à esquerda) e na ausência (à direita) de bicelas. Em vermelho, temos os resultados para a proteína com ácido oléico, em azul escuro e azul claro para a proteína delipidada, em verde para a não delipidada, e em preto para a proteína incubada com DHA.

4.6.6 Volta- β entre as fita- β C e D

O resíduo S55 teve a supressão do pico de ressonância do seu grupo amida na temperatura abaixo de 30° C na solução com bicelas (Figura 57). Nesta mesma solução, a proteína delipidada não forneceu nenhum pico de ressonância para esse resíduo em nenhuma temperatura medida. Na solução sem bicelas (Figura 57) à direita), este resíduo demonstrou picos de ressonância distintos para o ^{15}N na

condição com ligante (em verde, vermelho e preto) e delipidada (em azul claro e azul

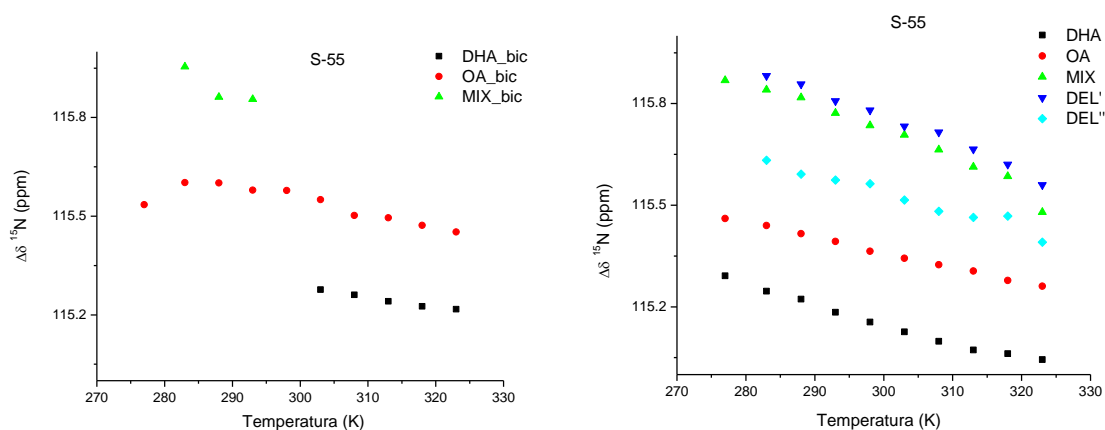


Figura 57 - Gráfico da variação do deslocamento químico ($\Delta\delta$) do ^{15}N pela temperatura para o resíduo S55 na presença (à esquerda) e na ausência (à direita) de bicelas. Em vermelho, temos os resultados para a proteína com ácido oléico, em azul escuro e azul claro para a proteína delipidada, em verde para a não delipidada, e em preto para a proteína incubada com DHA.

escuro), sendo que na condição delipidada houve dois picos de ressonância para todo o intervalo de temperatura. Um destes picos foi coincidente com o estado da proteína não delipidada para o intervalo de temperatura medido. O resíduo T56 teve seus picos de ressonância do grupo amida ausentes dos espectros de todas as soluções acima da temperatura de 15° C. Já o resíduo F57 teve um comportamento distinto de todos os outros (Figura 58). A ressonância para o ^{15}N se deslocou de -2 ppm quando bicelas foram adicionadas ao meio, tanto na solução com DHA como também na solução com ácido oléico. Além disso, os picos de ressonância do estado delipidado sumiram para todo o intervalo medido. Abaixo de 25° C, na solução com bicelas e DHA, os picos de ressonância também sumiram nesta condição. Já os picos de ressonância da proteína não delipidada só aparecem em 5° C e 10° C. Curiosamente, este resíduo sofre esta variação acentuada no δ do seu grupo amida isoladamente, sem mudanças semelhantes nos grupos amida dos resíduos vizinhos. Assim como em outras proteínas desta família (80), este comportamento diferenciado para o resíduo F57 na B-FABP pode estar associado com a relevância deste resíduo na entrega e captura do ácido graxo da membrana pela B-FABP.

A região dessa volta- β das FABPs também compõe a região do portal, sendo identificada como fundamental para o controle de entrega e captura do ácido graxo em modelos de membrana. Observando a estrutura da B-FABP, nota-se na cadeia

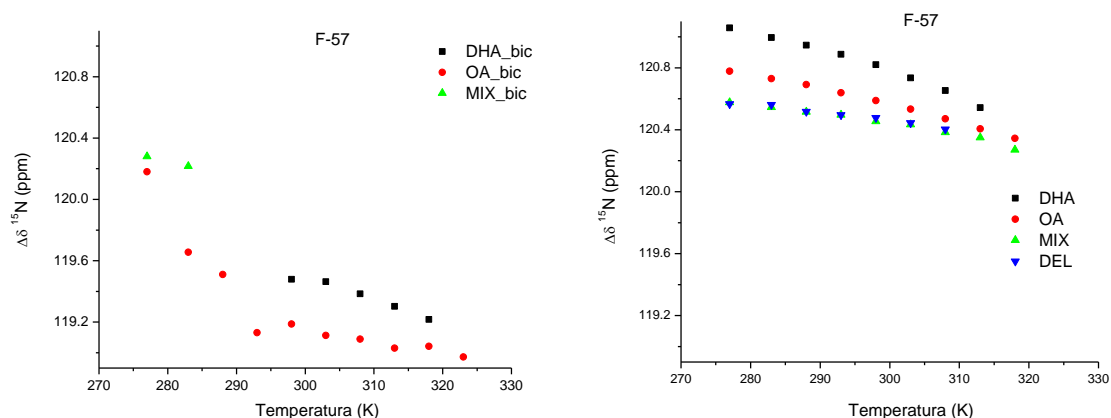


Figura 58 - Gráfico da variação do deslocamento químico ($\Delta\delta$) do ^{15}N pela temperatura para o resíduo F57 na presença (à esquerda) e na ausência (à direita) de bicelas. Em vermelho, temos os resultados para a proteína com ácido oléico, em azul para a proteína delipidada, em verde para a não delipidada, e em preto para a proteína incubada com DHA.

lateral do resíduo polar T36, o *HG1* ligado no OG, fazendo ligação de hidrogênio tanto com a cadeia principal como a cadeia lateral dos resíduos, também polares, S55 e T56, pertencentes à volta- β C-D. Já a V35 da hélice- α II cria um microambiente hidrofóbico junto com a cadeia lateral do resíduo F57 da volta- β C-D, conforme a Figura 59.

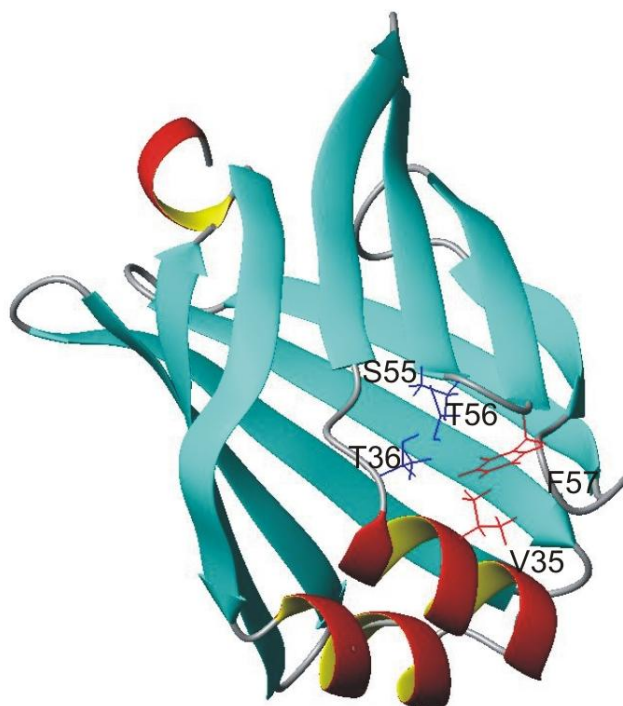


Figura 59 - Gráfico da estrutura da B-FABP mostrando as cadeias laterais dos resíduos da região do portal vistas por cima. Em vermelho, temos as cadeias laterais dos resíduos hidrofóbicos V35 e F57. Em azul, as cadeias laterais dos resíduos polares T36, S55 e T56. Todas as cadeias laterais apontam para dentro do bolsão da proteína (figura baseado no pdb 1JJX usando o programa

Os resíduos S55 e F57 também fazem contatos de vdw com o ácido oléico. Já os resíduos T36 e S55 fazem interação de vdw com o ligante DHA. Interessantemente, na situação em que a proteína está delipidada e na solução com bicelas, os picos de ressonância dos resíduos S55-T60, parte deles pertencentes à volta- β que conecta as fitas- β C e D, sumiram em todo o intervalo de temperatura medido. Na ausência de bicelas na solução protéica, essa região da proteína possui picos distintos para cada condição de ligante, ou seja, para quando a proteína está delipidada, ou com DHA ou com ácido oléico. Cada um desses picos representa uma família conformacional específica adotada por essa região da proteína.

4.7 Outros resíduos participantes do sitio de ligação do ligante

Somados aos resíduos já analisados E72, T74, D76 e R78, os seguintes resíduos T53, S82, H93, E95, R106 também se ligam com a cabeça polar do ácido graxo de forma indireta, através de ligações de hidrogênio mediadas por moléculas de água no interior da cavidade da B-FABP. Já os resíduos R126 e Y128 se conectam com o ligante de forma direta sem necessidade de moléculas de água na estrutura da B-FABP (53).

O espectro ^{15}N -HSQC para o resíduo T53 demonstrou uma variação do seu deslocamento químico em função da temperatura para a frequência do ^{15}N de forma

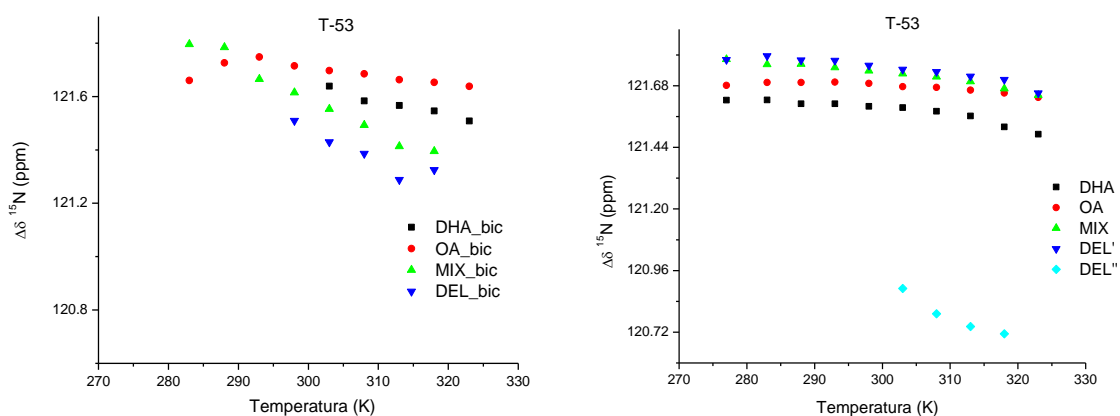


Figura 60 - Gráfico da variação do deslocamento químico ($\Delta\delta$) do ^{15}N pela temperatura para o resíduo T53 na presença (à esquerda) e na ausência (à direita) de bicelas. Em vermelho, temos os resultados para a proteína com ácido oléico, em azul claro e azul escuro para a proteína delipidada, em verde para a não delipidada, e em preto para a proteína incubada com DHA.

diferenciada quando comparamos a solução sem bicelas com a solução com bicelas (Figura 60). Na situação sem bicelas, há dois picos de ressonância para o estado delipidado acima da temperatura de 30 °C. Nesta solução, a $\Delta\delta$ pela temperatura é semelhante para todas as condições da proteína. Já na solução com bicelas, a taxa de $\Delta\delta$ pela temperatura muda com o tipo de ligante (ou a sua ausência). Para o intervalo de temperatura abaixo de 30 °C, o pico de ressonância deste resíduo para o estado da proteína com DHA foi suprimido, assim como o do estado delipidado.

O resíduo S82 possui um comportamento diferenciado dos outros. Neste resíduo, apesar da sua interação com a cabeça polar do ácido graxo, via molécula de água, ter sido observada na estrutura cristalográfica, não foram verificadas alterações significativas no deslocamento químico no seu espectro ^{15}N -HSQC e nem na $\Delta\delta$ pela temperatura (Figura 61). Apenas em 4° C, temos que o único pico presente é o da condição em que a proteína não sofreu delipidação nem incubação com ligante após a expressão. No outro extremo, em 50° C, somente com a presença dos ligantes é que há sinal do pico de ressonância. Para este resíduo, a mudança de sua dinâmica por RMN só pode ser detectada para esses valores extremos de temperatura. Este resultado está em acordo com o esperado, pois este resíduo apesar de fazer parte do sítio ativo da H-FABP, não faz parte do sítio ativo da B-FABP, tendo um espectro menos sensível a mudanças com a temperatura e com o ligante.

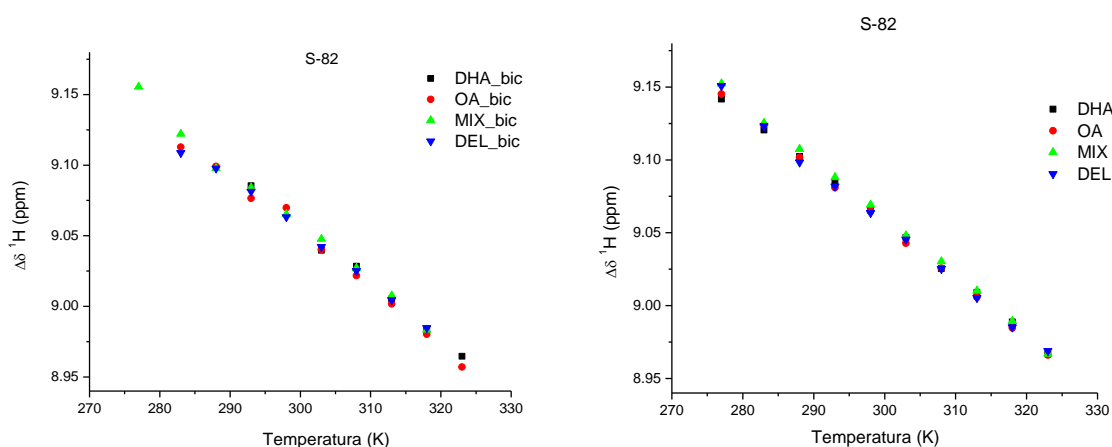


Figura 61 - Gráfico da variação do deslocamento químico ($\Delta\delta$) do ^1H pela temperatura para o resíduo S82 na presença (à esquerda) e na ausência (à direita) de bicelas. Em vermelho, temos os resultados para a proteína com ácido oléico, em azul para a proteína delipitada, em verde para a não delipitada, e em preto para a proteína incubada com DHA.

O resíduo H93 (Figura 62) não é considerado parte da região do portal da B-FABP (53). Apesar disso, há um comportamento distinto para as condições em que a proteína foi medida. Abaixo de 15 °C não há picos de ressonância no espectro para as condições preparadas na solução com bicelaS. Acima de 15° C, o sinal do grupo amida deste resíduo surge quando a proteína está com ácido oléico. Com o DHA, isso só ocorre acima de 25° C. Para a situação em que não há bicelas na solução, temos o complexo proteína:DHA diferenciado dos outros. Também surge mais um pico de ressonância para este resíduo quando a proteína está na forma *apo*. Todas essas características são encontradas nos resíduos que participam no sítio ativo da proteína B-FABP.

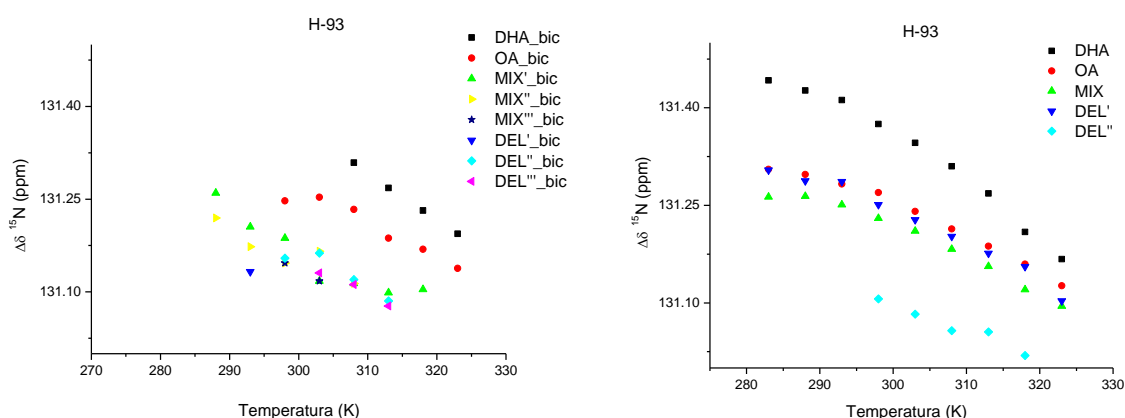


Figura 62 - Gráfico da variação do deslocamento químico ($\Delta\delta$) do ^{15}N pela temperatura para o resíduo H93 na presença (à esquerda) e na ausência (à direita) de bicelas. Em vermelho, temos os resultados para a proteína com ácido oléico, em azul escuro, azul claro e lilás para a proteína delipidada, em verde, em amarelo e em estrela para a não delipidada, e em preto para a proteína incubada com DHA.

O resíduo Q95 possui um comportamento bem distinto da situação com e sem bicelas (Figura 64). Sem as bicelas, temos para este resíduo dois picos de ressonância para o estado *apo* no intervalo de temperatura acima de 40 °C. Abaixo desse valor, o pico de ressonância com a proteína ligada tanto ao ácido oléico como ao DHA inverte a variação do deslocamento químico ($\Delta\delta$) pela temperatura. Na situação em que a bicela encontra-se na solução ocorreu a supressão do pico de ressonância para este resíduo para a proteína tanto no estado *apo* quanto *holo*. A cadeia lateral deste resíduo aponta para dentro do bolsão da proteína e coordena o ligante via molécula de água. A presença da bicela sugere, então, uma interferência

na sua dinâmica, suprimindo o pico de ressonância para este resíduo conforme descrito.

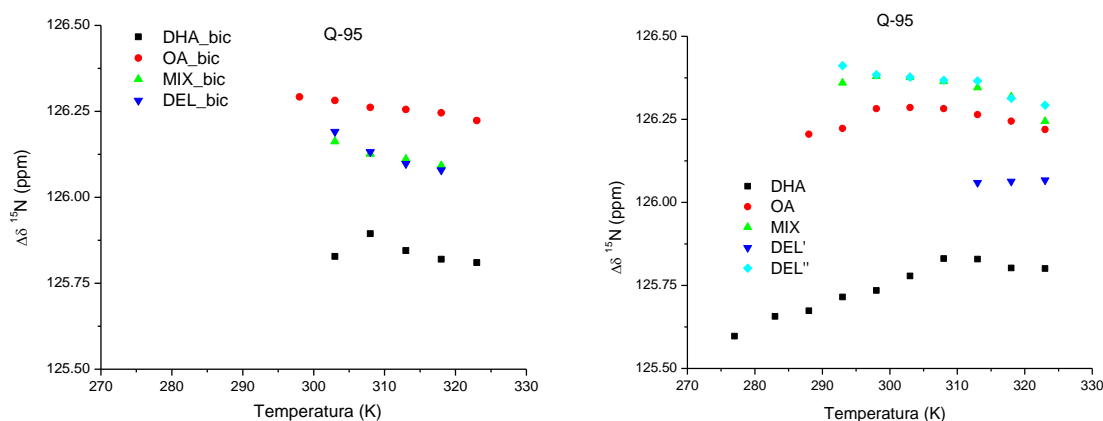


Figura 64 - Gráfico da variação do deslocamento químico ($\Delta\delta$) do ^{15}N pela temperatura para o resíduo Q95 na presença (à esquerda) e na ausência (à direita) de bicelas. Em vermelho, temos os resultados para a proteína com ácido oléico, em azul escuro e azul claro para a proteína delipidada, em verde para a não delipidada, e em preto para a proteína incubada com DHA.

Para o resíduo R106 temos como mudanças ocorridas o surgimento de mais um pico de ressonância para o estado *apo* sem bicelas na solução. Na presença de bicelas, este pico extra de ressonância desaparece. A presença da bicela restringiu o acesso a esta outra família conformacional pela B-FABP. A bicela também alterou a dinâmica da proteína com DHA de tal maneira que o pico nesta condição foi suprimido para temperaturas inferiores a 35 °C. Já a condição com o ligante ácido oléico favoreceu uma separação de $\Delta\delta$ entre o estado *apo* e o estado com a proteína não delipidada na condição em que bicelas encontram-se presentes na solução.

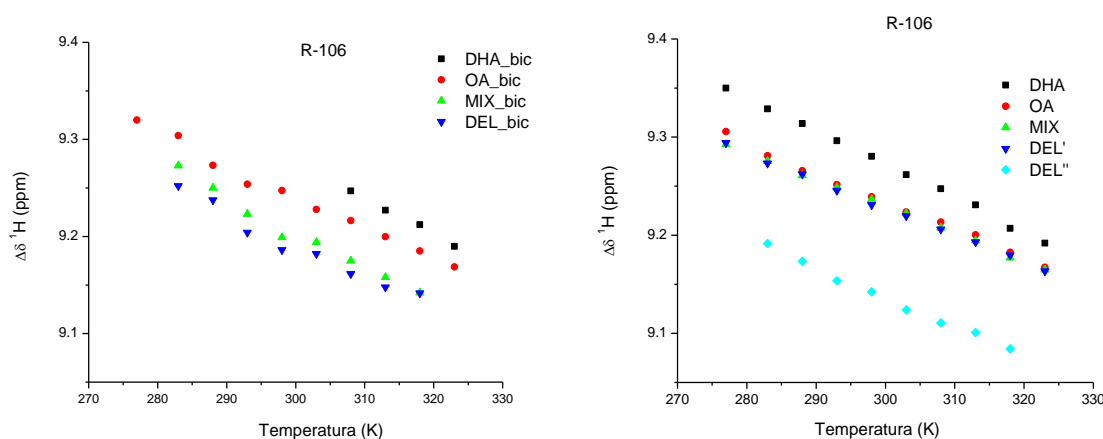


Figura 63 - Gráfico da variação do deslocamento químico ($\Delta\delta$) do ^1H pela temperatura para o resíduo R106 na presença (à esquerda) e na ausência (à direita) de bicelas. Em vermelho, temos os resultados para a proteína com ácido oléico, em azul escuro e azul claro para a proteína delipidada, em verde para a não delipidada, e em preto para a proteína incubada com DHA.

Os resíduos R126 e Y128 estão associados à interação com a cabeça polar do ácido graxo. Esta interação se dá por ligação de hidrogênio da carboxila do ácido graxo com a amina da cadeia lateral da R126, e com o oxigênio também da cadeia lateral do resíduo Y128. Para o resíduo R126, na solução de proteína sem bicelas, o comportamento do pico de ressonância, na dimensão do ^1H , pode ser acompanhado pelo termograma da Figura 65 para todo o intervalo medido. A variação do seu deslocamento químico foi linear com a temperatura. Contudo, em temperaturas maiores que $25\text{ }^\circ\text{C}$ surgiu um pequeno desdobramento das linhas de ressonância deste resíduo para a proteína no estado *apo*. Com exceção da B-FABP com o ligante DHA, todos os outros estados com ligante tiveram seus deslocamentos químicos sobrepostos. Já na presença de bicelas, temos uma supressão dos picos abaixo da temperatura de $30\text{ }^\circ\text{C}$ para a proteína no estado *holo*. Curiosamente, na temperatura de $15\text{ }^\circ\text{C}$ ressurgiu o pico de ressonância para a proteína no estado não delipidado.

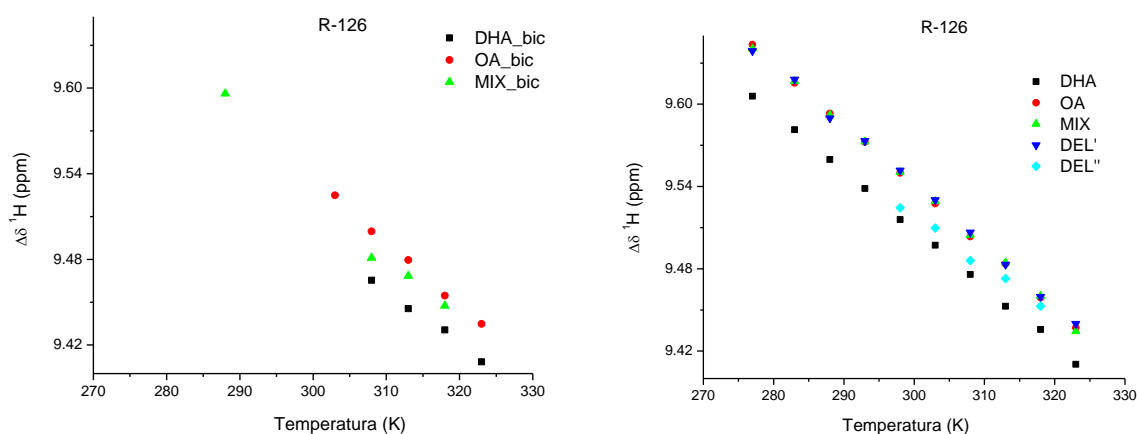


Figura 65 - Gráfico da variação do deslocamento químico ($\Delta\delta$) do ^1H pela temperatura para o resíduo R126 na presença (à esquerda) e na ausência (à direita) de bicelas. Em vermelho, temos os resultados para a proteína com ácido oléico, em azul escuro e azul claro para a proteína delipidada, em verde para a não delipidada, e em preto para a proteína incubada com DHA.

Na Figura 66 pode ser acompanhada a variação do deslocamento químico com a temperatura para o resíduo Y128 na solução de proteínas sem bicelas. Nela podemos observar a existência de heterogeneidades para o próton do grupo da

cadeia principal para este resíduo na condição em que a proteína está tanto delipidada como não delipidada. A presença do ligante pouco alterou o deslocamento químico deste ^1H , não sendo também observada não-linearidade na taxa de variação do deslocamento químico pela temperatura. Já para o estado em que a proteína está na solução de bicelas, não-linearidades ocorrem abaixo da temperatura de 30 °C na condição em que o DHA está presente. Uma supressão na condição em que os ligantes ácido oléico e DHA estavam presentes começa a ocorrer abaixo desta temperatura também. Abaixo de 15 °C, nenhum dos picos de ressonância podem mais ser visualizados no espectro ^{15}N -HSQC.

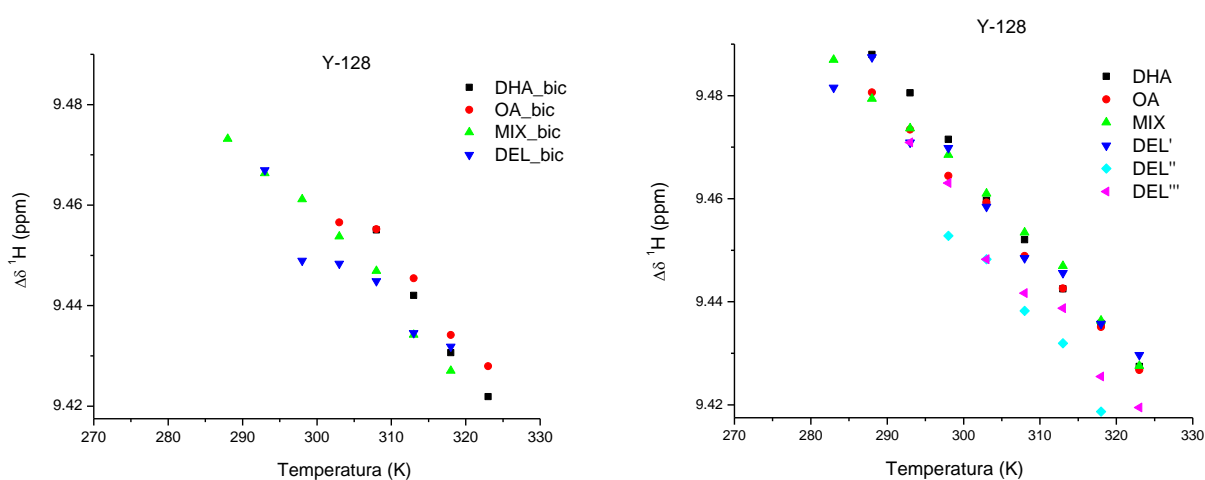


Figura 66 - Gráfico da variação do deslocamento químico ($\Delta\delta$) do ^1H pela temperatura para o resíduo Y128 na presença (à esquerda) e na ausência (à direita) de bicelas. Em vermelho, temos os resultados para a proteína com ácido oléico, em azul escuro, azul claro e lilás para a proteína delipidada, em verde e em amarelo para a não delipidada, e em preto para a proteína incubada com DHA.

4.8 Mecanismo de ligação da B-FABP com membranas

4.8.1 **Apo: bicelas versus sem bicelas**

Todos os resíduos analisados até agora foram os que mostraram mudanças mais acentuadas no espectro ^{15}N -HSQC quando o tipo de ligante, delipidação ou a temperatura foi variada. Contudo, observando as mudanças ocorridas nos espectros de RMN e sua variação com a temperatura para a amostra de proteína delipidada na situação em que bicelas foram adicionadas à solução de proteína na forma apo, todos os grupos amida dos resíduos M20, K21, L23, G26, A28, T29, R30, Q31, V32, G33, N34, V35, T36, T39, V40, G46, I51, L54, S55, T56, F57, K58, N59, T60, E61, I62, E68, E72, T73, A75, D76, R78, V83, L91, V92, H93, I94, Q95, 96, 97, V105, R106, E107, M113, M115, R126, 127, Y128, além dos grupos amina das cadeias laterais dos resíduos N15, Q31 e N59 sofrem mudanças no comportamento do deslocamento químico (δ) induzidas pelas bicelas. Tais mudanças envolvem ou a supressão do pico de ressonância favorecido por algum mecanismo de troca química, ou a alteração no valor do deslocamento químico e/ou a não-linearidade da sua taxa de variação pela temperatura.

Observando esses resíduos que sentem alguma variação, percebemos que eles incluem a região do portal (as hélices e voltas- β), de um portal alternativo (o espaçamento entre as fitas- β βD e βE) e outros resíduos que não pertencem a essas regiões, mas sofrem mudanças associadas à presença da bicela de algum modo. Dentre esses resíduos que não se relacionam diretamente com o portal ou o sítio ativo da proteína temos a G46, I51, E61, I62, E68, V83, L91, V92, I94, Q95, V105, E107. O curioso é que mesmo na proteína sem ligante, esses resíduos não pertencentes à região do portal respondem à presença da membrana com um comportamento diferenciado, conforme visualizado pelos experimentos ^{15}N -HSQC. Estes experimentos com bicelas indicam que o número de resíduos pertencentes à interface de ligação da proteína com a bicamada lipídica é muito maior do que o considerado pela literatura atual, estendendo assim a região do portal. Outra possibilidade é a presença de efeitos alostéricos na proteína. Infelizmente estes efeitos não podem ser diferenciados no espectro ^{15}N -HSQC do efeito de contato.

4.8.2 Holo (DHA): bicelas versus sem bicelas

De maneira geral, as diferenças dos picos de ressonância na situação em que a bicela encontra-se presente da situação em que ela está ausente têm como característica a supressão dos picos de ressonância dos resíduos M20, G33, T53, S55, F57, Q72, D76, H93, Q95, R106, R126, Y128 para o intervalo com os valores mais baixos para a temperatura medida. Para valores de temperatura mais altos em que estas ressonâncias aparecem, o deslocamento químico na solução sem bicelas não sofre mudanças significativas em relação à solução com bicelas como pode ser visualizado no termograma de deslocamento químico pela temperatura destes resíduos. Contudo, os resíduos R30, V32, N34-T36 (região da hélice- α II), S55 e F57 (região da volta- β β C- β D) sofrem um comportamento diferenciado para o seu deslocamento químico. Além da não-linearidade encontrada para a variação do deslocamento químico na temperatura próxima a 20 °C, há também uma diferença no seu valor de 0,3 ppm para a ressonância do ^{15}N da R30, 0,1 ppm na ressonância do ^1H para a V32 e 0,2 ppm na ressonância do ^{15}N da T36 quando comparadas as amostras com e sem bicelas. Curiosamente, a ressonância do resíduo K21 aparece no intervalo de temperatura mais baixas (abaixo de 20 °C) na presença de bicelas, na ausência destas bicelas a ressonância deste pico some. Isto é um indicativo de uma dinâmica diferenciada envolvendo este resíduo.

4.8.3 Holo (Ácido oléico): bicelas versus sem bicelas

Na situação em que a proteína B-FABP na forma *holo* (com ácido oléico) e na ausência de bicelas foi comparada com a solução em que as bicelas encontram-se presentes, foi também obtido um padrão distinto para os δ dos picos de ressonância. Interessantemente, os picos de ressonância associados aos resíduos da hélice- α I não apresentou mudanças significativas entre estas duas condições. Contudo, os

resíduos E2, G33, H93, Q95, R126 e Y128 tiveram seus picos de ressonância suprimidos abaixo da temperatura em torno de 25 °C. Os resíduos A3, D76, R30, V32, N34 e V35 tiveram uma mudança em suas taxas de variação do deslocamento químico pela temperatura próxima da temperatura de 20 °C. Os resíduos N15 e F27 apresentaram supressão de suas ressonâncias apenas acima de 25 °C. O resíduo T36 e F57 tiveram uma $\Delta\delta$ de pelo menos 0,6 ppm na ressonância do ^{15}N , e a V32 de 0,1 ppm na sua ressonância do ^1H quando comparamos a situação com bicelas e a situação sem bicelas.

Conclusão

5 Conclusão

A investigação, em nível molecular, dos mecanismos de ação da proteína ligante de ácidos graxos de cérebro humano (B-FABP) constituiu o tema central do presente trabalho. Para o cumprimento dos objetivos inicialmente propostos, escolhemos uma abordagem conjunta envolvendo métodos de ressonância magnética tanto nuclear (RMN) quanto eletrônica (RPE). Este, talvez, seja um traço diferenciado de nosso projeto, já que a referida abordagem conjunta não é rotineiramente utilizada em outros estudos de biomoléculas, o que, em nossa opinião, limita, de certa forma, o nível de detalhamento que se pode alcançar haja vista a alta complementaridade das duas técnicas.

A combinação RMN-RPE nos permitiu obter informações sobre os processos envolvidos na ligação de ligantes, como derivados de ácidos graxos, à B-FABP, bem como desta com modelos de membrana, através de perspectivas diferentes e complementares, quais sejam a partir da estrutura do ligante e também da proteína. Não fomos levados a usar tais metodologias de forma inteiramente programada, mas sim por necessidades investigativas, já que, em determinado momento, não conseguíamos obter os resultados acerca da interação FABP-modelos de membrana através simplesmente da técnica de RPE (v. espectros no Apêndice). Ainda assim, por RPE, fomos capazes de mapear o sítio de ligação de ácidos graxos contendo sondas magnéticas e os efeitos e/ou competição deste sítio por outras moléculas com características anfipáticas, como o surfactante SDS.

Por outro lado, utilizando de técnicas espectroscópicas de RMN identificamos os resíduos envolvidos na interação da B-FABP humana com modelos de microdomínios lipídicos, as bicelas de DMPC/DHPC. As medidas espectroscópicas obtidas por RPE não puderam determinar, com sucesso, uma interação da B-FABP humana com vesículas lipídicas. Vale ressaltar que este é o primeiro trabalho mostrando uma interação desta família de proteínas com bicelas, sendo a primeira vez que temos um “mapa de contato” da superfície desta proteína com uma estrutura lipídica. Tais bicelas são estruturas muito menores que as vesículas, com características distintas, podendo refletir na interação da proteína com estas estruturas. A interação da B-FABP com microdomínios lipídicos, demonstrados por esta tese, revelou um conjunto maior de resíduos envolvidos nesta interação do que

o reportado até agora. Isto se deve a duas coisas: primeiro, a metodologia utilizada (RMN) neste trabalho para o estudo da ligação de proteínas com microdomínios lipídicos é recente; segundo, a abordagem utilizada até o momento, com o uso de mutações sítio específica e uso de medidas da taxa de transferência do ligante para vesículas, não foi realizada com resíduos de toda a proteína, carecendo, assim, de mais experimentos. A técnica de HSQC se apresenta, desta forma, como uma excelente alternativa a essa metodologia de mutações pontuais, já que oferece dados sobre o conjunto de todos os resíduos da estrutura protéica simultaneamente. Obviamente, há de se considerar as limitações intrínsecas da própria RMN, por exemplo, em relação à massa molecular da proteína em estudo, o que a inviabiliza como método universal, até o momento, ou que possa substituir completamente outros métodos.

Como é usual em trabalhos de tese que geram grandes quantidades de dados, podemos elencar número considerável de etapas a se cumprir no futuro, dentre elas:

- 1) Explorar, com o uso de mutações sítio-específicas, o novo conjunto de resíduos, manipulando a taxa de entrega e as características da ligação da proteína com ligantes e/ou modelos de membrana.
- 2) Uso da técnica de marcação de spin sítio-dirigida, atualmente em implementação em nosso grupo, para investigar regiões específicas da proteína levantadas a partir dos dados de ^{15}N -HSQC.
- 3) Quanto à limitação da técnica utilizada (desaparecimento de picos), isto impede a obtenção da estrutura da proteína na presença dos microdomínios lipídicos, as bicelas. Uma maneira de resolver este problema seria realizar medidas em um campo magnético de intensidade diferente, ou alterando a viscosidade do meio.
- 4) Procurar otimizar as condições que permitam perceber alterações em outros modelos de membrana, como vesículas lipídicas, e monitorá-las através do uso de sondas de RPE inseridas no sistema modelo.
- 5) Estender o uso da metodologia conjunta RPE-RMN para estudos de outros membros da família das FABP, incluindo alguns que sabidamente tem seu mecanismo de entrega classificado como difusional e não

colisional. Isto permitirá identificar resíduos que são específicos para o desempenho de cada tipo de mecanismo.

- 6) Possível uso da FABP como sensor de ácidos graxos para aplicações biotecnológicas.

Referências

REFERÊNCIAS

- 1 LIPEROTI, R. et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and depression: a review of the evidence. *Current Pharmaceutical Design*, v.15, n.36, p. 4165-417, 2009.
- 2 ROUSER, G. Membrane composition, structure, and function. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, p. 26-26, 1974.
- 3 DAWIDOWICZ, E. Dynamics of membrane lipid-metabolism and turnover. *Annual Review of Biochemistry*, n.56, p. 43-61, 1987.
- 4 GLATZ, J.; VANDERVUSSE, G. Cellular fatty acid-binding proteins: their function and physiological significance. *Progress in Lipid Research*, v. 35, n. 3, p. 243-282, 1996.
- 5 STORCH, J. et al. The role of intracellular fatty acid-binding proteins in cellular transport of fatty acids. *Frontiers in Bioactive Lipids*, v. 115, n. 3, p. 53-59, 1996.
- 6 BERNLOHR, D. et al. Regulation of gene expression in adipose cells by polyunsaturated fatty acids. *Dietary Fat and Cancer*, v. 422, n. 1, p. 145-156, 1997.
- 7 ABUMRAD, N.; COBURN, C.; IBRAHIMI, A. Membrane proteins implicated in long-chain fatty acid uptake by mammalian cells: CD36, FATP and FABPm. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids*, v. 1441, n. 1, p. 4-13, 1999.
- 8 KURIAN, E.; KIRK, W.; PRENDERGAST, F. Affinity of fatty acid for rRat intestinal fatty acid binding protein: further examination. *Biochemistry*, v. 37, n. 18, p. 3865-3874, 1996.
- 9 GUNSTONE, F.D.; HARWOOD, J. L.; DIJKSTRA, A. J. *The lipid handbook*. 3rd. ed. London: CRC Press, 2007.
- 10 GENNIS, R. Biomembranes: molecular structure and function. In: CANTOR, C.R. (Ed.) *Advanced texts in chemistry*. New York: Springer-Verlag, 1989.
- 11 ALMEN, M. et al. Mapping the human membrane proteome: a majority of the human membrane proteins can be classified according to function and evolutionary origin. *BMC Biology*, v. 7, n. 1, p. 50, 2009.

-
- 12 SINGER, S.; NICOLSON, G. Fluid mosaic model of structure of cell-membranes. *Science*, v. 175, n. 4023, p. 720, 1972.
- 13 EHEHALT, R. et al. Translocation of long chain fatty acids across the plasma membrane - lipid rafts and fatty acid transport proteins. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 284, n. 1-2, p. 135-140, 2006.
- 14 PHILLIPS, R. et al. Emerging roles for lipids in shaping membrane-protein function. *Nature*, v. 459, n. 1, p. 379-385, 2009.
- 15 PASCHER, I.; SUNDELL, S.; HAUSER, H. Glycerol conformation and molecular packing of membrane-lipids-the crystal structure of 2,3-dilauroyl-D-glycerol. *Journal of Molecular Biology*, v. 153, n. 3, p. 791-806, 1981.
- 16 PEARSON, R.; PASCHER, I. Molecular-structure of lecithin dihydrate. *Nature*, v. 281, n. 1, p. 499-501, 1979.
- 17 SHINKAI, M. et al. Intracellular hyperthermia for cancer using magnetite cationic liposomes. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v. 87, n. 11, p. 176-184, 1999.
- 18 HENRIKSEN, J. et al. Understanding detergent effects on lipid membranes: a model study of lysolipids. *Biophysical Journal*, v.98, n. 10, p. 2199-220, 2010.
- 19 GLOVER, K. et al. Structural evaluation of phospholipid bicelles for solution-state studies of membrane-associated biomolecules. *Biophysical Journal*, v. 81, n. 4, p. 2163-2171, 2001.
- 20 KATSARAS, J. et al. "Bicellar" lipid mixtures as used in biochemical and biophysical studies. *Naturwissenschaften*, v.82, n. 8, p. 355-366, 2005.
- 21 POGET, S.; CAHILL, S.; GIRVIN, M. Isotropic bicelles stabilize the functional form of a small multidrug-resistance pump for NMR structural studies. *Journal of the American Chemical Society*, v. 129, n. 9, p. 2432, 2007.
- 22 VOLD, R.; PROSSER, R.; DEESE, A. Isotropic solutions of phospholipid bicelles: a new membrane mimetic for high-resolution NMR studies of polypeptides. *Journal of Biomolecular NMR*, v. 9, n. 3, p. 329-335, 1997.
- 23 COX, N. *LEHNINGER: princípios de bioquímica*. 4nd ed. New York: W. H. Freeman, 2004.

24 CULLIS, P. et al. Structural-properties of phospholipids in the rat-liver inner mitochondrial-membrane - A P-31-NMR study. *Biochemica et Biophysica Acta*, v. 600, n. 3, p. 625-635, 1980.

25 STERNIN, E.; NIZZA, D.; GAWRISCH, K. Temperature dependence of DMPC/DHPC mixing in a bicellar solution and its structural implications. *Langmuir*, v.17, n.9, p. 2610-2616, 2001.

26 ROWE, B. ; NEAL, S., Fluorescence probe study of bicelle structure as a function of temperature: Developing it practical bicelle structure model. *Langmuir*, v. 19 , n. 6 , p. 2039-2048, 2003.

27 OTTIGER, M.; BAX, A.Characterization of magnetically oriented phospholipid micelles for measurement of dipolar couplings in macromolecules. *Journal of Biomolecular Nmr*, v. 12 , n. 3, p. 361-372, 1998.

28 SPENCER, A. et al. The membrane binding domains of prostaglandin endoperoxide H synthases 1 and 2 - Peptide mapping and mutational analysis. *Journal of Biological Chemistry*, v. 274, n. 46, p. 32936-32942, 1999.

29 CAFISO, D. Structure and interactions of C2 domains at membrane surfaces. In: TAMM, L. K.(Ed.) *Protein-lipid interactions: from membrane domains to cellular networks*. Chichester: John Wiley & Sons, 2005.

30 BURN, P. Talking point - amphitropics proteins - a new class of membrane-proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 13, n. 3, p. 79-83, 1988.

31 JOHNSON, J.; CORNELL, R. Amphitropic proteins: regulation by reversible membrane interactions (review). *Molecular Membrane Biology*, v. 16, n. 3, p. 217-235, 1999.

32 FLOWER, D.; NORTH, A.; SANSOM, C. The lipocalin protein family: structural and sequence overview. *Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology*, v. 1482, n. 1-2, p. 9-24, 2000.

33 HERTZEL, A. ; BERNLOHR, D. The mammalian fatty acid-binding protein multigene family: molecular and genetic insights into function. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, v. 11, n. 5, p. 175-180, 2000.

- 34 HSU, K. ; STORCH, J. Fatty acid transfer from liver and intestinal fatty acid-binding proteins to membranes occurs by different mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*, v. 271, n. 1, p. 13317-13323, 1996.
- 35 STORCH, J.; THUMSER, A. The fatty acid transport function of fatty acid-binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids*, v. 1486, n. 1, p. 28-44, 2000.
- 36 THUMSER, A.; STORCH, J. Liver and intestinal fatty acid-binding proteins obtain fatty acids from phospholipid membranes by different mechanisms. *Journal of Lipid Research*, v. 41, n. 1, p. 647-656, 2000.
- 37 CORSICO, B. et al. The helical domain of intestinal fatty acid binding protein is critical for collisional transfer of fatty acids to phospholipid membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 95, n.21, p. 12174-12178,1998.
- 38 FRANCHINI, G.; STORCH, J.; CORSICO, B. The integrity of the alpha-helical domain of intestinal fatty acid binding protein is essential for the collision-mediated transfer of fatty acids to phospholipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids*, v. 1781, n. 4, p. 192-199, 2008.
- 39 THUMSER, A.; STORCH, J. Transfer of fatty acids (FA) from phospholipid vesicles to liver or intestinal fatty acid-binding proteins (L-FABP and I-FABP) occurs by different mechanisms. *Faseb Journal*, v.13, n. 1, p. A541-A541, 1999.
- 40 BAKOWIES, D.; VAN GUNSTEREN, W. Simulations of apo and holo-fatty acid binding protein: structure and dynamics of protein, ligand and internal water. *Journal of Molecular Biology*, v. 315, n. 4, p. 713-736, 2002.
- 41 YOUNG, A. et al. Structural studies on human muscle fatty -acid-binding protein at 1.4-angstrom resolution - binding interactions with 3 C18 fatty-acids . *Structure*, v. 2, n. 6, p. 523-534, 1994.
- 42 MODIG, K. et al. Water dynamics in the large cavity of three lipid-binding proteins monitored by O-17 magnetic relaxation dispersion. *Journal of Molecular Biology*, v. 332, n. 4, p. 965-977, 2003.
- 43 WEIKL, T.; VON DEUSTER, C. Selected-fit versus induced-fit protein binding: kinetic differences and mutational analysis. *Proteins-Strucutre Function and Bioinformatics*, v. 75, n. 1, p. 104-110, 2009.

44 CONSTANTINE, K. et al. Backbone and side chain dynamics of uncomplexed human adipocyte and muscle fatty acid-binding proteins. *Biochemistry*, v. 37, n. 22, p. 7965-7980, 1998.

45 LUCHE, C. et al. Spin-system heterogeneities indicate a selected-fit mechanism in fatty acid binding to heart-type fatty acid-binding protein (H-FABP). *Biochemical Journal*, v. 354, n. 1, p. 259-266, 2001.

46 HODSDON, M. ; CISTOLA, D. Ligand binding alters the backbone mobility of intestinal fatty acid-binding protein as monitored by N-15 NMR relaxation and H-1 exchange. *Biochemistry*, v. 36, n. 1, p. 2278-2290, 1997.

47 WOOLF, T.; GROSSFIELD, A.; TYCHKO, M. Differences between apo and three holo forms of the intestinal fatty acid binding protein seen by molecular dynamics computer calculations. *Biophysical Journal*, v. 78, n. 2, p. 608-625, 2000.

48 WU, F. et al. Deletion of the helical motif in the intestinal fatty acid-binding protein reduces its interactions with membrane monolayers: brewster angle microscopy, IR reflection-absorption spectroscopy, and surface pressure studies. *Biochemistry*, v. 40, n. 7, p. 1976-198, 2001.

49 HERR, F.; ARONSON, J.; STORCH, J. Role of portal region lysine residues in electrostatic interactions between heart fatty acid binding protein and phospholipid membranes. *Biochemistry*, v. 35, n. 4, p. 1296-1303, 1996.

50 BOURRE, J. et al. The effects of dietary alpha-linolenic acid on the composition of nerve membranes, enzymatic-activity, amplitude of electrophysiological parameters, resistance to poisons and performance of learning-task in rats. *Journal of Nutrition*, v. 119, n. 12, p. 1880-1892, 1989.

51 HOHOFF, C.; SPENER, F. Fatty acid binding proteins and mammary-derived growth inhibitor. *Fett-lipid*, v. 100, n. 6, p. 252-263, 1998.

52 OWADA, Y. et al. Altered emotional behavioral responses in mice lacking brain-type fatty acid-binding protein gene. *European Journal of Neuroscience*, v. 24, n. 1, p. 175-187, 2006.

53 BALENDIRAN, G. et al. Crystal structure and thermodynamic analysis of human brain fatty acid-binding protein. *Journal of Biological Chemistry*, v. 275, n. 35, p. 27045-27054, 2000.

- 54 RADEMACHER, M. et al., Solution structure of fatty acid-binding protein from human brain. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v.1 , n. 239 , p. 61-68. 2002.
- 55 MARLEY, J.; LU, M.; BRACKEN, C. , A method for efficient isotopic labeling of recombinant proteins. *Journal of Biomolecular Nmr*, v. 20, n. 1, p. 71-75. 2001
- 56 GLATZ, J.; VEERKAMP, J. Removal of fatty-acids from serum-albumin by lipidex-1000 chromatography. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v. 8, n. 1, p. 57-61, 1983.
- 57 RICHIERI, G.; OGATA, R.; KLEINFELD, A. Equilibrium -constants for the binding of fatty-acids with fatty-acids-binding-proteins from adipocyte, intestine, heart, and liver measured with the fluorescent-probe ADIFAB. *Journal of Biological Chemistry*, v. 269, n. 1 ,p. 23918-23930, 1994.
- 58 ZIMMERMAN, A.; VAN MOERKERK, H.; VEERKAMP, J. Ligand specificity and conformational stability of human fatty acid-binding proteins. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 33, n. 9, p. 865-876, 2001.
- 59 MIHAJLOVIC, M.; LAZARIDIS, T. Modeling fatty acid delivery from intestinal fatty acid binding protein to a membrane. *Protein Science*, v. 16, n. 9, p. 2042-2055, 2007.
- 60 LUCKE, C. et al. New insights into intracellular lipid binding proteins: the role of buried water. *Protein Science*, v. 11, n. 10, p. 2382-2392, 2002.
- 61 MEIROVITCH, E. et al. Structural dynamics of bio-macromolecules by NMR: the slowly relaxing local structure approach. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, v. 56. n. 4, p. 360-405, 2010.
- 62 SCHNEIDER, D.J.; FREED, J. H. Calculating slow motional magnetic resonance spectra: a user's guide. In: BERLINER, J.; REUBEN, J. (Ed.). *Biological magnetic resonance*. Local: New York, Plenum Publishing, 1989. v.8.
- 63 BUDIL, D. et al. Nonlinear-least-squares analysis of slow-motion EPR spectra in one and two dimensions using a modified Levenberg-Marquardt algorithm. *Journal of Magnetic Resonance Series A*, v. 120, n. 2. p. 155-189, 1996.
- 64 CITADINI, A.; PINTO, A.; ARAÚJO, A.; NASCIMENTO, O.; COSTA-FILHO, A., EPR studies of chlorocatechol 1,2-dioxygenase: evidences of iron reduction during catalysis and of the binding of amphipatic molecules. *Biophysical Journal*, v. 88, n. 5, p. 3502-3508, 2005.

- 65 JONES, M. Surfactants interactions with biomembranes and proteins. *Chemical Society Reviews*, v. 21, n. 1 ,p. 127-136, 1992.
- 66 PETERS, T. *All about albumin biochemistry, genetics, and medical applications*. Local: San Diego, USA, Academic Press, 1995.
- 67 GELAMO, E.; TABAK, M. Spectroscopic studies on the interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants. *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 56A, n. 11, p. 2255-2271, 2000.
- 68 TABAK, M.; SOUSA NETO, D.; SALMON, C. On the interaction of bovine serum albumin (BSA) with cethyltrimethyl ammonium chloride surfactant: electron paramagnetic resonance (EPR) study. *Brazilian Journal of Physics*, v. 36, n. 1A, p. 83-89, 2006.
- 69 TURRO, N. et al. Spectroscopic probe analysis of protein-surfactant interactions-the BSA/SDS system. *Langmuir*, v. 11, n. 7, p. 2525-2533, 1995.
- 70 WALES, T. ; ENGEN, J. Hydrogen exchange mass spectrometry for the analysis of protein dynamics. *Mass Spectrometry Reviews*, v. 25 , n. 1 , p. 158-170. 2006.
- 71 CORDIER, F. et al. Direct detection of N-H center dot center dot center dot O=C hydrogen bonds in biomolecules by NMR spectroscopy. *Nature Protocols*, v. 1, n. 3, p. 235-241, 2008.
- 72 CORSICO, B. et al. Fatty acid transfer from intestinal fatty acid binding protein to membranes: electrostatic and hydrophobic interactions. *Journal of Lipids Research*, v. 46, n. 1 , p. 1765-1772, 2005.
- 73 AYERS, S. et al. Continuous nucleocytoplasmic shuttling underlies transcriptional activation of PPAR gamma by FABP4. *Biochemistry*, v. 46, n. 23, p. 6744-6752, 2007.
- 74 FRIEDMAN, R.; NACHLIEL, E.; GUTMAN, M. Fatty acid binding proteins: same structure but different binding mechanisms? molecular dynamics simulations of intestinal fatty acid binding protein. *Biophysical Journal*, v. 90, n. 5, p. 1535-1545, 2006.
- 75 FALOMIR-LOCKHART, L. et al. Protein-membrane interaction and fatty acid transfer from intestinal fatty acid-binding protein to membranes - support for a multistep process. *Journal of Biological Chemistry*, v. 281, n. 1 ,p. 13979-13989, 2006

76 BAXTER, N. et al. Characterisation of low free-energy excited states of folded proteins. *Journal of Biomolecular Biology*, v. 284, n. 5, p. 1625-1639, 1998.

77 BAXTER, N.; WILLIAMSON, M. Temperature dependence of H-1 chemical shifts in proteins. *Journal of Biomolecular NMR*, v. 9, n. 4, p. 359-369, 1997.

78 ROY, M. et al. The native energy landscape for interleukin-1 beta. modulation of the population ensemble through native-state topology. *Journal of Molecular Biology*, v. 348, n. 2, p. 335-347, 2005.

79 SIMPSON, M.; BERNLOHR, D., Analysis of a series of phenylalanine 57 mutants of the adipocyte lipid-binding protein. *Biochemistry*, v. 37, n. 31, p. 10980-10986, 1998.

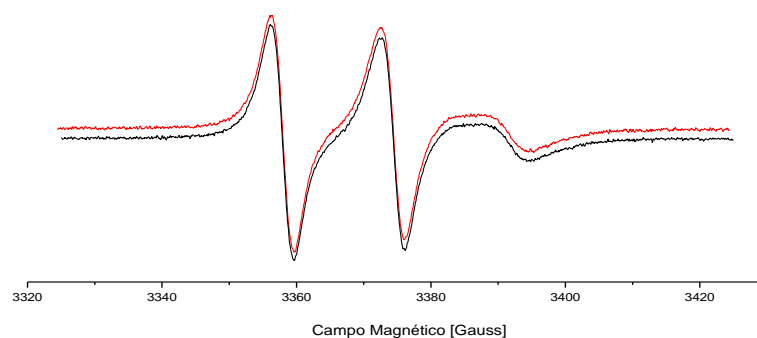


Figura 67 - Espectros de RPE da B-FABP em tampão Tris-HCl 40 mM, pH 7,95, NaCl 100 mM. Em preto temos vesículas de DOPC 6 mM com 0,5% DPPTC para o experimento controle. Em vermelho temos o mesmo experimento com a presença de 120 μ M B-FABP com uma relação proteína-lipídio cerca de 1:50.

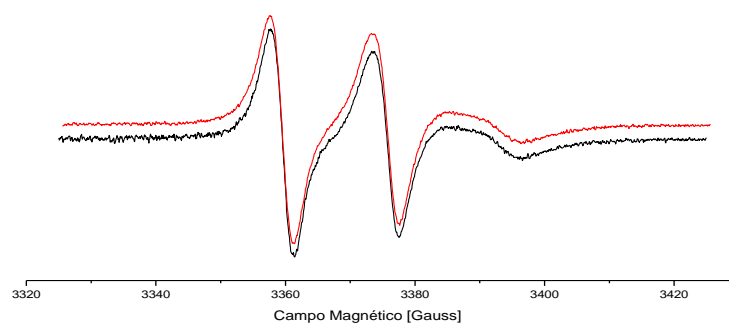


Figura 68 - Espectros de RPE da B-FABP em tampão Tris-HCl 40 mM, pH 7,95, NaCl 500 mM. Em preto temos vesículas de DOPG 6 mM com 0,5% DPPTC para o experimento controle. Em vermelho temos o mesmo experimento com a presença de 120 μ M B-FABP com uma relação proteína-lipídio cerca de 1:50

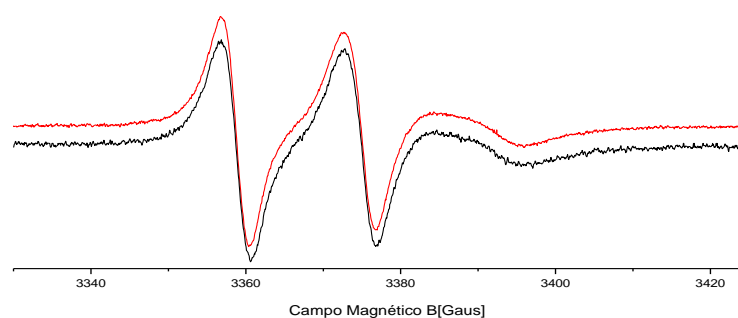


Figura 69 - Espectros de RPE da B-FABP em tampão Tris-HCl 40 mM, pH 7,95. Em preto temos vesículas de DOPG 1.8 mM com 0,8% DPPTC para o experimento controle. Em vermelho temos o mesmo experimento com a presença de 70 μ M B-FABP com uma relação proteína-lipídio cerca de 1:25.

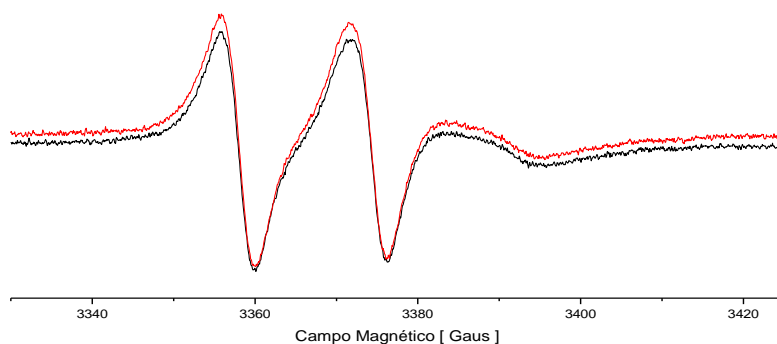


Figura 70 - Espectros de RPE da B-FABP em tampão Tris-HCl 40 mM, pH 7,95. Em preto temos vesículas de POPG 1.8 mM com 0,8% DPPTC para o experimento controle. Em vermelho temos o mesmo experimento com a presença de 250 μM B-FABP com uma relação proteína-lipídio cerca de 1:7.

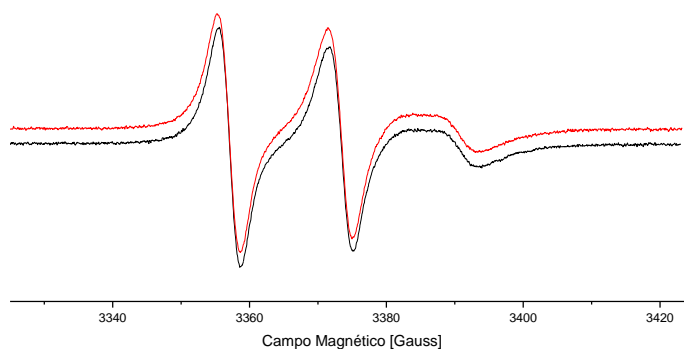


Figura 71 - Espectros de RPE da B-FABP em tampão Tris-HCl 40 mM, pH 7,95, 10 mM CaCl₂ . Em preto temos vesículas de DOPC 6 mM com 0,5% DPPTC para o experimento controle. Em vermelho temos o mesmo experimento com a presença de 60 μM B-FABP com uma relação proteína-lipídio cerca de 1:100.

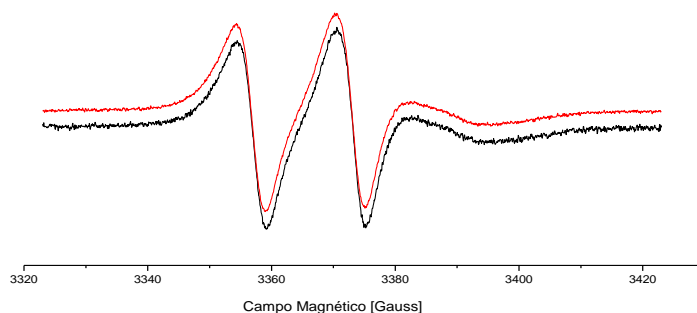


Figura 72 - Espectros de RPE da B-FABP em tampão Tris-HCl 40 mM, pH 7,95, 10 mM CaCl₂ . Em preto temos vesículas de DOPG 6 mM com 0,5% DPPTC para o experimento controle. Em vermelho temos o mesmo experimento com a presença de 60 μM B-FABP com uma relação proteína-lipídio cerca de 1:100

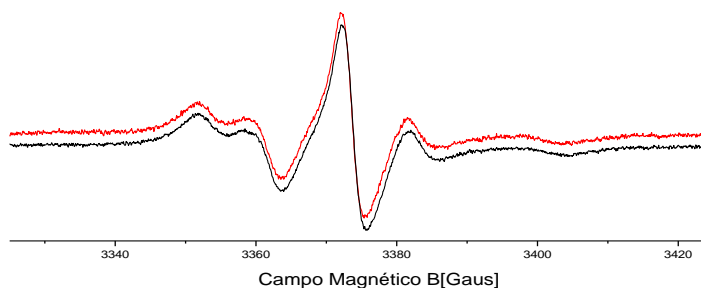


Figura 73 - Espectros de RPE da B-FABP em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8,2. Em preto temos vesículas de DOPG 6 mM com 0,5% 5-PC para o experimento controle. Em vermelho temos o mesmo experimento com a presença de B-FABP 60 μ M com uma relação proteína-lipídio cerca de 1:7.

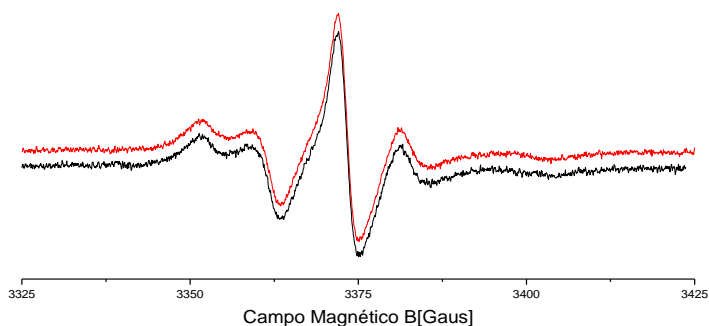


Figura 74 - Espectros de RPE da B-FABP em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8,2. Em preto temos vesículas de DOPC 6 mM com 0,5% 5-PC para o experimento controle. Em vermelho temos o mesmo experimento com a presença de 60 μ M B-FABP com uma relação proteína-lipídio cerca de 1:100.

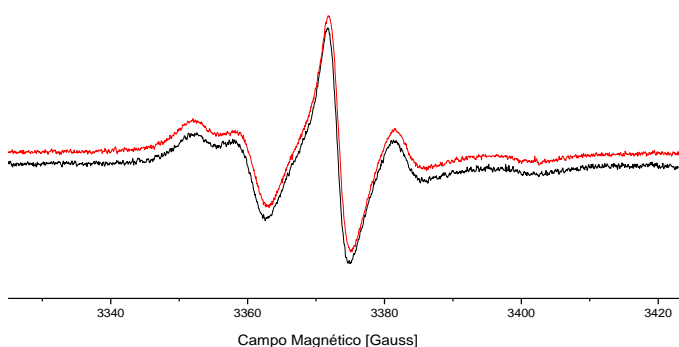


Figura 75 - Espectros de RPE da B-FABP em tampão Tris-HCl 40 mM, pH 7,95, 10 mM CaCl_2 . Em preto temos vesículas de DOPC 6 mM com 0,5% 7-PC para o experimento controle. Em vermelho temos o mesmo experimento com a presença de 60 μ M B-FABP com uma relação proteína-lipídio cerca de 1:100.

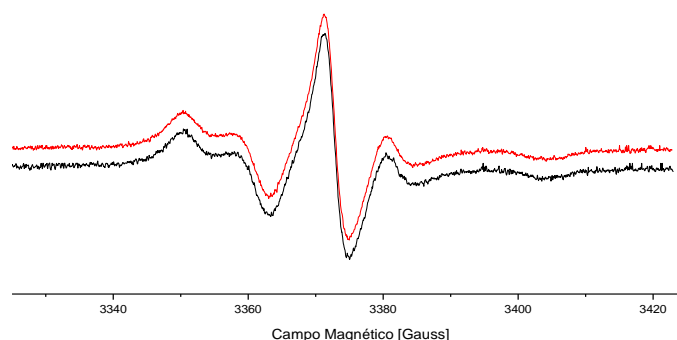


Figura 76 - Espectros de RPE da B-FABP em tampão Tris-HCl 40 mM, pH 7,95, 10 mM CaCl₂. Em preto temos vesículas de DOPG 6 mM com 0,5% 7-PC para o experimento controle. Em vermelho temos o mesmo experimento com a presença de 60 μM B-FABP com uma relação proteína-lipídio cerca de 1:100.

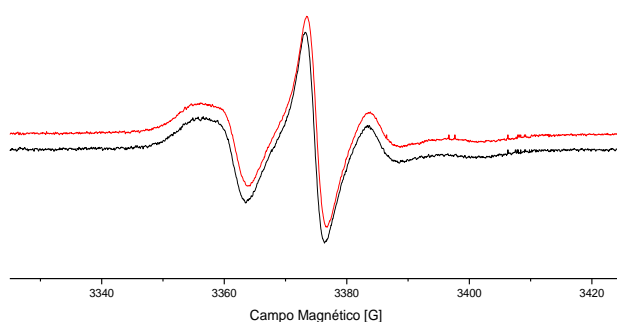


Figura 77 - Espectros de RPE da B-FABP em tampão Tris-HCl 40 mM, pH 8,2, 10 mM CaCl₂. Em preto temos vesículas de DOPC 6 mM com 0,5% 10-PC para o experimento controle. Em vermelho temos o mesmo experimento com a presença de 90 μM B-FABP com uma relação proteína-lipídio cerca de 1:70.

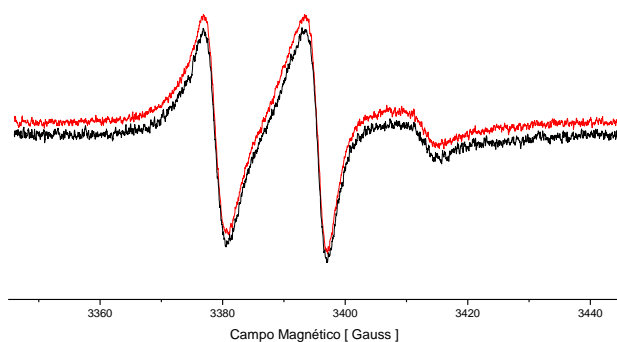


Figura 78: Espectros de RPE da B-FABP em tampão Tris-HCl 40 mM, pH 8,2. Em preto temos vesículas de DMPC:DMPG (30:70) 5 mM com 0,8% DPPTC para o experimento controle. Em vermelho temos o mesmo experimento com a presença de 900 μM B-FABP com uma relação proteína-lipídio cerca de 1:6.

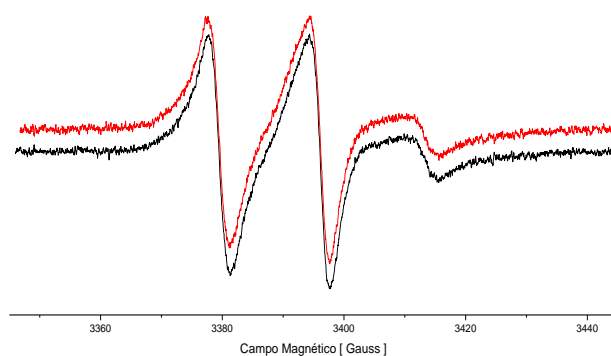


Figura 79 - Espectros de RPE da B-FABP em tampão Tris-HCl 40 mM, pH 8,2. Em preto temos vesículas de DMPC 5 mM com 0,8% DPPTC para o experimento controle. Em vermelho temos o mesmo experimento com a presença de 900 μ M B-FABP com uma relação proteína-lipídio cerca de 1:6.