

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



DOUGLAS RICARDO NORBERTO

**ASPECTOS TERMODINÂMICOS E BASES MOLECULARES NA
INTERAÇÃO DE PROTEÍNAS MONOMÉRICAS COM
AGENTES DESNATURANTES E ALTA PRESSÃO
HIDROSTÁTICA**

Este exemplar corresponde à redação final

da tese defendida pelo(a) candidato (a)

DOUGLAS RICARDO NORBERTO

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Doutor em Biologia Funcional e
Molecular, na área de Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Francisco Sampaio Bonafé

Co-orientador: Prof. Dr. Claudio Chrysostomo Werneck

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

N75a	<p>Norberto, Douglas Ricardo, 1970- Aspectos termodinâmicos e bases moleculares na interação de proteínas monoméricas com agentes desnaturantes e alta pressão hidrostática / Douglas Ricardo Norberto. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.</p> <p>Orientador: Carlos Francisco Sampaio Bonafé. Corientador: Claudio Chrysostomo Werneck. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Proteínas monoméricas. 2. Desnaturação protéica. 3. Alta pressão hidrostática. 4. Termodinâmica. 5. Albumina de soro bovino. I. Bonafé, Carlos Francisco Sampaio, 1961-. II. Werneck, Claudio Chrysostomo, 1966-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.</p>
------	---

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Thermodynamic aspects and molecular basis of monomeric proteins interaction with desnaturants and high hydrostatic pressure

Palavras-chave em Inglês:

Monomeric proteins

Protein denaturation

High hydrostatic pressure

Thermodynamics

Bovine serum albumin

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Doutor em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Carlos Francisco Sampaio Bonafé [Orientador]

José Camillo Novello

Jörg Kobarg

Lígia Ely Morganti Ferreira Dias

Jerson Lima da Silva

Data da defesa: 30-08-2011

Programa de Pós Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 30 de agosto de 2011

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Francisco Sampaio Bonafé (Orientador)


Assinatura

Profa. Dra. Inês Joekes


Assinatura

Prof. Dr. Jörg Kobarg


Assinatura

Profa. Dra. Ligia Ely Morganti Ferreira Dias


Assinatura

Prof. Dr. Jerson Lima da Silva


Assinatura

Prof. Dr. José Camillo Novello


Assinatura

Prof. Dr. Reginaldo Guirardello


Assinatura

Profa. Dra. Maria Goreti de Almeida Oliveira


Assinatura

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Carlos F. S. Bonafé por toda orientação e pelo incentivo dado nesta importante fase de minha formação.

Aos colegas de laboratório de Termodinâmica de Proteínas, José L. Santos, Gustavo Landini, Ailton Bispo, Ancelmo Souza, Ricardo Carvalho e Joelma Vieira, pelo companheirismo e pelas discussões indispensáveis.

Aos docentes, funcionários e alunos do programa de Biologia Funcional e Molecular, no Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da UNICAMP, com quem convivi estes anos. Em especial à técnica do nosso laboratório, Juliana Mattoso, por colaborar com a realização dos experimentos, e à Andreia Vigilatto pela atenção junto à secretaria de Pós Graduação.

À Catherine A. Royer e toda a sua equipe, ao Jean-Louis Saldana, Jean-Baptiste Rouget, Julien Roche e Didier Debain, no Centre de Biochimie Structurale (CBS), em Montpellier, França, e a Bertrand Garcia-Moreno e Alfredo Caro, da Johns Hopkins University (EUA) pelo auxílio nas atividades de espectroscopia com as SNases, na análise dos resultados e pelas entusiasmadas discussões sobre bioquímica e biologia molecular estrutural integrada.

Aos docentes da UNICAMP, Ione Salgado (Departamento de Bioquímica/Instituto de Biologia), Maria do Carmo Gonçalves e Ricardo Aparício (Departamento de Físico-Química/Instituto de Química) e Marisa Masumi Beppu (Departamento de Termofluidodinâmica/Faculdade de Engenharia Química) pela atuação junto a banca de qualificação de tese com importantes sugestões e orientações.

Agradeço muito particularmente aos meus pais, Mário e Ana e à minha filha Teresa.

Ao CNPq, à FAPESP, CAPES e FAEP-UNICAMP pelo suporte financeiro.

É para Natasha Marzliak Norberto

ÍNDICE GERAL

LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE TABELAS.....	9
LISTA DE EQUAÇÕES.....	10
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES.....	11
RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	14
INTRODUÇÃO.....	15
ALTA PRESSÃO COMO FERRAMENTA DE ESTUDO NA DESNATURAÇÃO DE PROTEÍNAS	17
CARACTERÍSTICAS DA SORO ALBUMINA - PRINCIPAL MODELO DE ESTUDO	20
ACOMPANHANDO A DESNATURAÇÃO NA BSA ATRAVÉS DA ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA	22
OBJETIVO.....	24
MATERIAIS E MÉTODOS	25
PREPARAÇÃO DAS PROTEÍNAS E REAGENTES	25
EQUIPAMENTO DE ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA	26
MEDIDAS DE FLUORESCÊNCIA SOB PRESSÃO	28
TEORIA TERMODINÂMICA	29
RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	32

EFEITO DA UREIA E DA PRESSÃO SOBRE A BSA	33
DEPENDÊNCIA LINEAR DO ΔG^0 DE DESNATURAÇÃO COM $[U]$	46
DEPENDÊNCIA LINEAR DO ΔG^0 DE DESNATURAÇÃO COM $\ln[U]$	48
POPULAÇÕES HETEROGÊNEAS	54
ESTADOS NATIVO E DESNATURADO	59
ANÁLISE COMPLEMENTAR: RESULTADOS PRELIMINARES PARA A SNASE	60
DEMAIS POSSIBILIDADES. PERSPECTIVAS A PARTIR DE OUTRAS TÉCNICAS BIOFÍSICAS.....	65
CONCLUSÃO	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
ANEXO	81
ANEXO I – CURVAS DA TABELA 1	82
ANEXO II – ARTIGO SUBMETIDO SOBRE A BSA.....	88

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da HSA	21
Figura 2 - Foto do gerador de pressão	27
Figura 3 - Espectros de fluorescência da BSA.....	33
Figura 4 - Efeito da pressão e ureia sobre o centro de massa da emissão do espectro de fluorescência da BSA.....	35
Figura 5 - Grau de desnaturação α em função da pressão e da concentração de ureia.....	36
Figura 6 - O correspondente grau de desnaturação.....	37
Figura 7 - Efeito da concentração da ureia sobre a energia livre de Gibbs de desnaturação.....	38
Figura 8 - Efeito da ureia sobre a variação do volume de desnaturação.....	41
Figura 9 - Efeito da pressão sobre o centro de massa do espectro de emissão de fluorescência da BSA.....	43
Figura 10 - Influência do tempo de incubação sobre a desnaturação induzida por pressão da BSA.....	44
Figura 11 - Ciclos completos de compressão e descompressão sobre a proteína BSA.....	45
Figura 12 - Função hipotética da dependência logarítmica apresentada para um longo e um curto intervalo de variação.....	49

Figura 13 - Comparação dos pontos experimentais com as curvas teóricas para a desnaturação de soro albumina	53
Figura 14 - Populações de proteína e estequiometrias da ureia a partir das simulações teóricas realizadas em curvas de desnaturação da BSA	56
Figura 15 - Evolução dos espectros de emissão de fluorescência do triptofano na SNase Δ +PHS I92A	58
Figura 16 - Evolução dos espectros de emissão de fluorescência do triptofano na SNase Δ +PHS I92A.....	62
Figura 17 (a) - Representação do efeito da pressão e GuHCl sobre o centro de massa do espectro de emissão da SNase Δ +PHS I92A.....	63
Figura 17 (b) - Efeito da concentração do GuHCl sobre a energia livre de Gibbs de desnaturação da SNase Δ +PHS I92A..	63
 LISTA DE TABELAS	
Tabela 1. Parâmetros m e ν calculados.....	47
Tabela 2. Taxas de variação relacionados com ν	50
Tabela 3. Valores totais de $\Delta\Delta G_{[U]}^0$ de desnaturação.....	52
Tabela 4. Distribuição das espécies	57

LISTA DE EQUAÇÕES

1. $M = \frac{A}{\varepsilon}$ 25
2. $\nu_p = \frac{\sum \nu_i F_i}{F_i}$ 28
3. $\alpha_p = \left[1 + \frac{Q(\langle \nu_p \rangle - \langle \nu_{des} \rangle)}{(\langle \nu_n \rangle - \langle \nu_{des} \rangle)} \right]^{-1}$ 29
4. $\Delta G_{[U]}^0 = -RT \ln K - RT \ln[U]^v = \Delta G_{U_1}^0 - vRT \ln[U]$ 30
5. $K_{[U],p} = K_{[U]} \exp(-p\Delta V/RT)$ 30
6. $K_{[U],p} = \frac{\alpha_{[U],p}}{1-\alpha_{[U],p}}$ 30
7. $\Delta G_{[U],p} = \Delta G_{[U]} + p\Delta V$ 30
8. $\alpha_U^* = \sum_{i=1}^n f_i \alpha_i$ 31
9. $\Delta G_{[U]}^0 = -RT \ln \left[\frac{\alpha_U^*}{1-\alpha_U^*} \right] = -RT \ln \left[\frac{\sum_{i=1}^n \frac{K_i[U]^{v^*} f_i}{1+K_i[U]^{v^*}}}{\sum_{i=1}^n 1 - \frac{K_i[U]^{v^*} f_i}{1+K_i[U]^{v^*}}} \right]$ 31
10. $A^{(1)} + v_1 U \xrightleftharpoons{K_1} A^{(1)}U_{v_1}$ 59
11. $A^{(1)}U_{v_1} + v_2 U \xrightleftharpoons{K_2} A^{(1)}U_{v_1 v_2}$ 59

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

A	Absorbância
BSA	Soro albumina bovina
HSA	Soro albumina humana
CJD	Doença de Creutzfeldt-Jakob
Da	Dalton
E	Energia
Ec	Eritrocrurina
f_j	Distribuição da população heterogênea
FKBP	FK Binding Protein (Peptidil-propil cis-trans isomerase)
GuHCl	Hidrocloreto de guanidina
IL-1Ra	Antagonista do receptor de interleucina 1
K_{U_1}	Constante de equilíbrio aparente de desnaturação em base molar
K_{atm}	Constante de equilíbrio de desnaturação em P_{atm}
K_p	Constante de equilíbrio de desnaturação a pressão p
$\ln[U]$	Logaritmo natural da concentração de ureia
m	Parâmetro m
MD	Dinâmica Molecular
PDEE	Programa de Doutorado com Estágio no Exterior
PrP ^C	Conformação P ^c priônica
PrP ^{Sc}	Conformação P ^{sc} priônica
R	Constante universal dos gases
RNase	Ribonuclease
SNase	Nuclease <i>Staphylococcal</i>
TMV	Vírus do Mosaico do Tabaco
TSE	Conjunto do Estado de Transição
[U]	Concentração de ureia

α_{den}	Grau de desnaturação
$\alpha_{[U],p}$	Grau de desnaturação à pressão p
α^*	Grau de desnaturação particionado com respeito à heterogeneidade
ΔG_{eq}	Varição de energia livre de Gibbs de equilíbrio
$\Delta G_{[U]}^0$	Varição de energia livre de Gibbs de desnaturação
$\Delta G_{[U]}^{atm}$	Varição de energia livre de Gibbs de desnaturação à pressão atmosférica
$\Delta + \text{PHS}$	Mutante estável da SNase “wild type”, obtido a partir de deleções sequenciais dos resíduos Prolina (P), Histidina (H) e Serina (S)
$\Delta + \text{PHS I92A}$	Mutante $\Delta + \text{PHS}$ com substituição do resíduo Isoleucina (I), na posição 92 da sequência, pela Alanina (A)
ΔV	Varição de volume de desnaturação
ε	Coefficiente de extinção molar
ν	Coefficiente estequiométrico aparente
ν^*	Coefficiente estequiométrico aparente com respeito à heterogeneidade

RESUMO

Ureia desnatura proteínas em diferentes concentrações, dependendo das condições experimentais e da proteína. A proteína monomérica soro albumina bovina (BSA) foi o principal modelo de investigação na presença de concentrações subdesnaturantes de ureia com base no modelo de equilíbrio de dois estados. A desnaturação induzida por alta pressão foi intensificada em concentrações de ureia ($[U]$) entre 3,5 M e 8,0 M, com variação de energia livre à pressão atmosférica ($\Delta G_{[U]}^0$) de +5,0 a -2,5 kJ/mol de BSA, e variação do volume de desnaturação (ΔV) de -30 a -36 mL/mol de BSA. Os parâmetros m apresentaram caráter bifásico, com valores de m_1 e m_2 de 0,92 e 2,35 kJ.mol⁻¹.M⁻¹, respectivamente. A partir de gráficos da variação de $\Delta G_{[U]}^0$ com relação à $\ln[U]$ foram obtidos valores de ν , o coeficiente estequiométrico aparente do agente desnaturante, de 1,68 e 6,67 mol de ureia/mol de BSA, respectivamente ν_1 e ν_2 , correspondentes à m_1 e m_2 . Estes resultados foram comparados com os de outras proteínas monoméricas da literatura e com um conjunto de dados da SNase Δ +PHS I92A e estequiometrias sistematicamente baixas foram observadas. No entanto, um valor de 140 mols de ureia/mol de BSA pode ser alcançado a partir de abordagem que considera a existência de uma população heterogênea com respeito a energia livre de desnaturação e aspectos moleculares da interação proteína-solvente puderam ser melhor interpretados.

ABSTRACT

Urea denatures proteins at different concentrations, depending on the experimental conditions and the protein. We investigated the pressure-induced denaturation of bovine serum albumin (BSA) as a model in the presence of subdenaturing concentrations of urea based on a two-state equilibrium model. Pressure-induced denaturation was enhanced at urea concentrations ($[U]$) of 3.5 M to 8.0 M, with the free energy of denaturation at atmospheric pressure ($\Delta G_{[U]}^0$) ranging from +5.0 to -2.5 kJ/mol of BSA while the volume change ranged from -30 to -36 mL/mol of BSA. The m values appeared to be biphasic, with m_1 and m_2 of 0.92 and 2.35 kJ.mol⁻¹.M⁻¹, respectively. Plots of $\Delta G_{[U]}^0$ *versu* $\ln[U]$ yielded values of ν , the apparent stoichiometric coefficient, of 1.68 and 6.67 mol of urea/mol of BSA respectively for m_1 and m_2 . These results were compared with the m and ν values of other monomeric proteins reported from the literature and of SNase Δ +PHS I92A and the very low values of ν were systematically observed. However, a value of 140 moles of urea/mole of BSA could be reached by considering the existence of a heterogeneous molecular population with respect to the free energy of denaturation and the molecular binding aspects could be better interpreted.

INTRODUÇÃO

O mecanismo de enovelamento de polipeptídeos que resulta na formação de estruturas terciárias funcionais, o chamado “protein folding”, constitui um dos mais importantes problemas e dos que mais concentram estudos em biofísica química e biologia molecular. Há alguns anos, a revista *Science* (2005, 309:79-102) colocou o enovelamento protéico como pertencente aos 125 principais problemas ainda não resolvidos e, apesar do trabalho intensivo dos últimos tempos, o fenômeno continua não completamente compreendido.

Um melhor entendimento dos aspectos dinâmicos e enérgicos do processo de desnaturação de proteínas prefigura um componente essencial para decifrar as sutilezas codificadas no genoma e elucidar questões sobre função e origem de doenças de mau enovelamento. Apesar da alta eficiência do processo de enovelamento protéico, ocorre eventualmente a formação de espécies provenientes de enovelamentos incorretos e que estão implicadas num número expressivo de doenças, as quais podem ser agrupadas sob a denominação de desordens de enovelamento protéico, ou seja, doenças que se relacionam com a má constituição da estrutura terciária (Horwich, 2002). São o caso das denominadas doenças amilóides, caracterizadas pelo depósito de fibrilas protéicas na matriz extracelular de diversos órgãos, onde uma grande quantidade de proteínas com enovelamento incorreto se agrega, destruindo células cerebrais e de outros tecidos. Neste grupo estão, por exemplo, doenças como as de Parkinson, Alzheimer, a doença de Huntington e diabetes tipo II (Caughey & Lansbury, 2003). Os príons são proteínas que se replicam autocataliticamente (Foguel & Silva, 2004) e são conhecidas por promover as encefalopatias espongiiformes transmissíveis e doenças infecciosas tais como a doença de Creutzfeldt-Jakob (CJD), também conhecida como a ‘doença da vaca louca’, a doença de Lou Gehrig e outras (Prusiner, 1998; Caughey & Lansbury, 2003). Num segundo grupo estão as doenças onde o enovelamento incorreto da proteína é atribuído a erros genéticos isolados, até mesmo afetando um único aminoácido, e que causam importantes alterações funcionais na proteína ou as torna suscetíveis à protease celular. Neste grupo estão incluídos o câncer, o enfisema, e as doenças associadas à fibrose cística. Em alguns casos, tanto a agregação quanto a perda de função contribuem para o efeito patogênico.

No caso particular da CJD, a doença surge a partir de um mal enovelamento de uma proteína natural denominada PrP^C que resulta na sua forma anômala PrP^{Sc} (Kuwata et al., 2002). A PrP^C possui estrutura predominantemente de α -hélices, ao passo que a forma PrP^{Sc} é composta na maioria de folhas β pregueadas e a conversão de uma forma noutra tem origem numa alteração no seu mecanismo de enovelamento. Apesar da configuração PrP^{Sc} corresponder à forma termodinamicamente mais estável (Kuwata et al., 2002), se sugere que a elevada barreira da energia de ativação vem a limitar a taxa de sua formação, o que resulta no fato da conformação PrP^C possuir maior incidência tissular (Kuwata et al., 2002, Marchal et al., 2005).

Outro ponto a ser citado é a existência de proteínas nativamente desenoveladas. É o caso das partículas virais que se enovelam espontaneamente somente no momento de sua atividade funcional, tornando muito mais difícil sua caracterização. As abordagens farmacêuticas para projeto de drogas requerem muitas vezes que a proteína possa ser manipulada em solução e que apresente estabilidade durante o tempo de obtenção de sua estrutura, a ser obtida a partir de técnicas tais como a ressonância magnética nuclear (RMN) ou ainda através do elaborado processo de cristalização para posterior resolução por raio-X. Tais proteínas virais nativamente desenoveladas são por muitas vezes excelentes alvos de ação de novas drogas mas, geralmente, são altamente flexíveis em regiões desnaturadas e possuem pouca homologia com outras estruturas já conhecidas de proteínas. Uma mais ampla descrição do processo de desnaturação vem ao encontro de melhores modelos *in-vitro* que possam ser utilizados como base para elaboração de novos fármacos (Warshel et al., 1984; Da Poian et al., 2002). O maior entendimento sobre o processo de enovelamento nos ajuda na compreensão destes tipos de doenças e na condução de tratamentos de maior eficácia.

Nesse sentido, historicamente, e de forma cada vez mais premente, a caracterização dos aspectos físicos e energéticos da dinâmica de desnaturação de proteínas têm tido um intensivo aumento de pesquisas (Pace, 1986; Creighton, 1988, Courtenay et al., 2000 e 2001, Auton & Bolen, 2005, Zangi et al., 2009, Schroer et al., 2010). Um aspecto muito presente é uso de agentes desnaturantes tais como a ureia e hidrocloreto de guanidina (GuHCl), que permitem que conceitos relacionados com as forças que governam a estabilidade e os mecanismos de enovelamento, tais como as

ligações covalentes e iônicas, as ligações de hidrogênio, as interações hidrofóbicas e de Van der Waals, passam a ser melhor investigados.

Alta pressão como ferramenta de estudo na desnaturação de proteínas

Pressão é um importante parâmetro termodinâmico, comumente utilizado em diferentes processos (Mozhaev et al., 1996, Masson et al., 2001), mas sua importância com relação aos estudos de desnaturação de proteínas surgiu somente no início do século passado, quando Bridgman (1914) desnaturou a molécula de ovalbumina sob pressão. Desde então, muitos trabalhos buscaram entender o mecanismo de desnaturação sob alta pressão de inúmeras proteínas, tais como a tripsina e a quimotripsina (Curl & Jansen, 1950), o inibidor de tripsina pancreática bovina (Akasaka et al., 1999), o complexo apomioglobina-ANS (Bismuto et al., 1996), a ribonuclease A (Brandts et al., 1970), a nuclease *Staphylococcal* (Seemann et al., 2001) e outras. A observação do efeito da pressão hidrostática combinada com outros fatores tais como temperatura subzero, ureia, pH e outros agentes químicos têm crescentemente contribuído para uma maior compreensão dos mecanismos envolvidos nas interações protéicas que estabilizam grandes agregados e que coordenam transições estruturais (Weber, 1986; Ruan & Weber, 1989; Cioni & Strambini, 1996; Silva et al., 1992 e 2001; Foguel et al., 1992, 2005; Bonafe et al., 1998; Da Poian et al., 2002; Foguel & Silva, 2004; Rouget et al., 2010). Análises do processo de dissociação viral por pressão permitem, por exemplo, a investigação dos mecanismos envolvidos nos processos de infecção viral em células hospedeiras, e fornecem informações termodinâmicas importantes a respeito destes sistemas (Da Poian et al., 1993 e 2002). Em tais casos, as subunidades protéicas dissociadas mostraram baixa afinidade entre si quando comparadas à forma nativa, demonstrando que este comportamento tem importância também no estudo de oligômeros (King et al., 1986; Weber, 1986, Foguel & Silva, 2004; Bispo et al., 2005 e 2007). Estas investigações são relevantes em aplicações biotecnológicas tais como as observadas no desenvolvimento de vacinas antivirais (Da Poian et al., 1993). Nestes casos a compreensão dos mecanismos envolvidos durante a desnaturação, e por extensão, na

dissociação protéica, pode conduzir ao melhoramento da imunogenicidade e da inativação viral através do controle das estruturas formadas. Atualmente, uma das inovações obtidas através do uso de alta pressão é a estabilização de intermediários do processo de enovelamento protéico tais como nas conformações pouco acessíveis denominadas como ‘molten-globule’, permitindo, assim, uma oportunidade única de se obter uma caracterização energética destas estruturas. A designação ‘molten-globule’ descreve uma série de características conformacionais da etapa intermediária do processo de desnaturação da proteína. Basicamente, a estrutura secundária se apresenta ainda conservada como na estrutura nativa, mas não mais hermeticamente confinada no seu interior hidrofóbico. Há ainda a perda da estrutura terciária sem a definição de uma conformação que caracterize por completo o estado completamente desenovelado, nos altos níveis energéticos da forma desnaturada. O termo foi primeiramente estabelecido por M. Ohgushi e A. Wada em ensaios com o citocromo c (1983) onde se observou que o volume de desnaturação destas moléculas se apresentava como semelhante ao do empacotamento da forma nativa, mesmo após a transição de desnaturação.

As proteínas são estabilizadas numa faixa de ΔG_{eq} (diferença entre a energia livre de Gibbs do estado nativo, ou enovelado, e do desnaturado, desenovelado) que vai até valores em torno de 40 kJ/mol. A razão para esta relativa baixa estabilidade é geralmente atribuída ao fato de que as proteínas precisam de uma alta flexibilidade conformacional que venha a permitir a passagem transmembranar e a ligação aos seus substratos, ou ainda à demanda energética imposta por diversos outros processos tais como os que envolvem transdução de sinal e sinalização alostérica (Cooper, 1976; Tournier et al., 2004). Como reflexo dessa baixa estabilidade, a população do estado nativo e desnaturado pode ser apenas bem definida em condições específicas de pressão, temperatura e na presença de demais agentes caotrópicos.

Além de ser particularmente útil em se tratando do estudo de inativação viral, como comentado, a alta pressão hidrostática tem sido utilizada para a determinação de parâmetros termodinâmicos e propriedades de dissociação em proteínas multiméricas (Bonafe et al., 1998; Santos et al., 2008), assim como no estudo das condições de reassociação (Bonafe et al., 1991). Em trabalhos recentes desenvolvidos em nosso laboratório, foi investigado o efeito de prótons e alta pressão na dissociação do vírus do

mosaico do tabaco (TMV) e da hemoglobina extracelular multimérica, a eritrocruorina (Ec), com a quantificação e análise estequiométrica da liberação de prótons no processo (Santos et al., 2004; Bispo et al., 2007). Experimentos similares na presença de ureia em concentração até 7,0 M demonstraram uma estequiometria aparente significativamente maior da ureia na desnaturação em comparação com a etapa de dissociação. No TMV, a fase inicial de dissociação foi identificada pelo espalhamento de luz, ao passo que as fases de desnaturação foram monitoradas através das mudanças nas propriedades do espectro de emissão de fluorescência (Bonafe et al., 1998). Medidas similares de fluorescência e espalhamento de luz foram apresentadas para outros vírus. A maior parte dos valores obtidos como coeficiente estequiométrico aparente da ureia durante o processo de dissociação variou de 0,5 a 1,5 mol de ureia/mol de subunidade, enquanto que para a desnaturação a variação foi de 4,0 a 11,0 mol de ureia/mol de subunidade (Santos et al., 2008).

Estudos sobre a desnaturação de proteínas são relacionados com a descrição das interações proteína-solvente (Simpson & Kauzmann, 1953; Tanford, 1961; Wyman, 1964; Schellman, 1975 e 1978; Baskakov & Bolen, 1998; Kita et al., 1994). Mais recentemente, Auton e Bolen (2005) sugeriram que a interação direta do agente desnaturante com a cadeia polipeptídica apresentava uma maior contribuição no processo de desnaturação induzida por ureia, comparativamente às interações com os resíduos laterais. Já foi mostrado que, numa condição em que o equilíbrio final pudesse ser interpretado como uma “reação” de desnaturação envolvendo a proteína e o solvente, a análise das curvas de desnaturação em função do logaritmo da concentração de desnaturante $\ln[D]$ sistematicamente resultou em valores estequiométricos do solvente muito baixos. Estes valores abaixo do que seria esperado conduziu a rumos alternativos de interpretação da desnaturação de proteínas, resultando na análise onde a energia livre de desnaturação deveria ser considerada linearmente dependente da concentração de desnaturante $[U]$, em detrimento da análise da variação da energia livre como dependente linearmente do logaritmo natural da concentração de desnaturante. Greene & Pace (1974) apresentaram uma abordagem teórica baseada numa relação linear e que vem desde então sendo aplicada à maioria das proteínas investigadas. Contudo, Schellman (1987) estudou extensivamente o tema e observou que não haveria razões para esperar que a energia livre

de desnaturação possuisse um comportamento de variação estritamente linear com relação à concentração de desnaturante.

Numa ampla abordagem sobre tais questões, esta tese se propõe a investigar se a desnaturação por ureia e pressão da proteína monomérica modelo soro albumina bovina (BSA) ocorre linearmente ou logaritmicamente com relação a concentração do agente desnaturante. Esta relação foi analisada pelo cálculo dos valores de m e de outros parâmetros termodinâmicos. Em contraste às 2130 subunidades capsídicas associadas com o RNA, como no caso do TMV, a proteína BSA é monomérica e constitui um sistema de maior acessibilidade cinética. Os resultados são comparados com os descritos para proteínas monoméricas da literatura. Baseado nos achados deste estudo, é proposta uma alternativa de explicação para os baixos valores encontrados a partir das curvas de ΔG de desnaturação em função de $\ln[D]$, ou seja, a partir da heterogeneidade com respeito a energia livre de desnaturação no processo.

Características da soro albumina - principal modelo de estudo

As soro albuminas são as mais abundantes proteínas presentes no sistema circulatório, com uma concentração típica de 5 g/100 ml no plasma, e contribuem em 80% para a manutenção da pressão osmótica do sangue (Khan et al., 1987; Tanaka et al., 1997). Apesar da existência de enorme porosidade nos capilares sanguíneos, a presença de uma quantidade adequada de grandes proteínas, em especial a albumina, que possui dimensão maior que a dos poros, consegue reter a maior parte do plasma. A albumina da circulação sanguínea possui meia-vida de 19 dias, e a diminuição de sua quantidade no plasma pode ser resultado de patologia hepática ou ainda de um distúrbio renal que venha a permitir que a albumina seja acentuadamente secretada pela urina. A diminuição de sua síntese pode estar relacionada à desnutrição ou à uma dieta desprovida de proteínas (Ahmad et al., 2004). A albumina é também notadamente uma das principais responsáveis pela manutenção do pH sanguíneo. Nos mamíferos, ela possui síntese no fígado inicialmente como prealbumina, sendo a proalbumina a forma obtida pela

remoção do seu peptídeo sinal e em seguida pela modificação de seis de seus resíduos de propeptídeo do novo terminal N (Ahmad et al., 2004).

Há décadas são consideradas muitas discussões sobre a determinação estrutural das albuminas. O principal modelo deriva dos resultados com estudos a partir de hidrodinâmica e espalhamento de raios-X, onde a molécula apresenta conformação elipsóide de 140 x 40 Å (Tanaka et al., 1997). As albuminas, com cerca de 583 aminoácidos na estrutura primária, são caracterizadas por conter um número pequeno de resíduos de triptofano e metioninas e um alto número de cisteínas e polares com carga, ácidos aspártico e glutâmico, lisinas e argininas (Holowachuck, 1991). O conteúdo de glicina e isoleucina é menor que a média encontrada em proteínas com semelhante peso molecular, ou seja, entre 50 e 100 kDa.

Tanto a BSA quanto a HSA são monômeros e possuem três domínios homólogos e seis subdomínios, representados pela Fig. 1 (Shihui et al., 2008). Sua massa molecular é de em torno de 65 kDa.

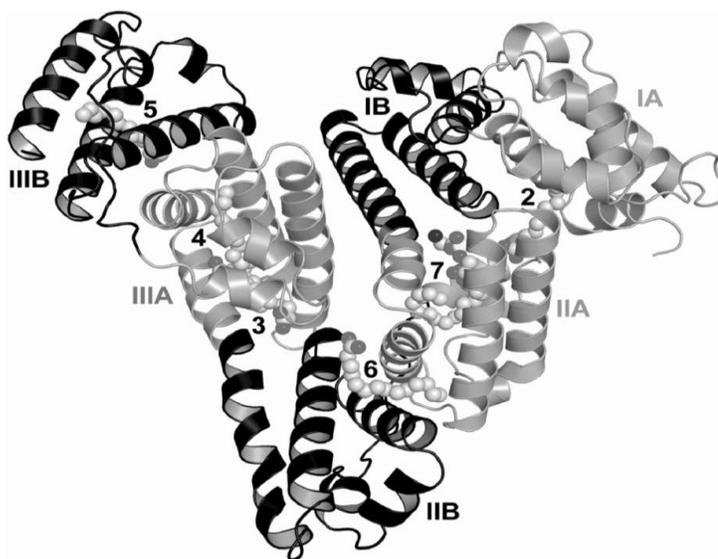


Figura 1. Estrutura da HSA com a indicação da posição dos domínios e subdomínios da molécula (de IA a IIIB). Nesta representação destacam-se alguns conjuntos de ligantes tais como o dos ácidos graxos e lisofosfolípidos (bolas claras e escuras) e a enumeração de alguns de seus sítios de ligação (até 7). Cristalografia de raio-X com faixa de resolução 50,0–2.8 (Å). Código de identificação PDB: 3CX9 (Shihui et al., 2008).

A albumina possui habilidade de se ligar a uma grande variedade de moléculas biológicas (Carter & Ho, 1994). Apesar do seu papel estrutural de contenção do material plasmático, se qualificam como uma molécula extremamente flexível. Sua estrutura de voltas (“loops”) interligadas permite rápida expansão, contração e flexão, características que lhe são intrínsecas, mas também que lhe são atribuídas extrinsecamente quando na presença adicional de outros ligantes (Kolthoff et al., 1958). São moléculas que, embora estruturalmente definidas como sendo multidomínio, tendem, dependendo do pH, a recuperar sua estrutura nativa após mudanças estruturais decorrentes de condições desnaturantes (Harmsem & Braam, 1988). Há pouco ou nenhum efeito de ureia em concentrações abaixo de valores em torno 4 M (Khan et al., 1987; Tanaka et al., 1997; Ahmad et al., 2004 e 2005). Suas propriedades fisiológicas e farmacológicas têm sido alvo de extensivos estudos nas últimas décadas (Koch, 1998, Tanaka, 1997; Ahmad, 2005), se tornando um modelo muito versátil do ponto de vista experimental e de compreensão sobre a natureza da desnaturação protéica.

Acompanhando a desnaturação na BSA através da espectroscopia de fluorescência

A emissão de fluorescência é amplamente atribuída ao triptofano em albuminas. Assim como em proteínas em geral, o fluoróforo intrínseco dominante é o resíduo de triptofano, composto heteroaromático que absorve radiação da luz monocromática incidente em comprimento de onda em torno de 280 nm e emite fluorescência em torno de 340 nm. Os fluoróforos são divididos em duas classes gerais, os intrínsecos e os extrínsecos. Fluoróforos extrínsecos são aqueles que são adicionados a uma amostra por ela não exibir as propriedades espectrais desejadas. Os intrínsecos são aqueles que ocorrem naturalmente. A emissão pode sofrer um deslocamento para o azul, caso a região que possui o elemento fluoróforo sofra um confinamento em região centralizada da conformação nativa da proteína, ou um deslocamento para comprimentos de onda mais longos (desvio para o vermelho), caso a proteína passe a assumir sua conformação desnaturada (Lakowicz, 1999). Portanto, a evolução do pico máximo de emissão de fluorescência do Trp em diferentes pressões e concentrações de agente desnaturante traz

informação sobre a dependência deste com relação às mudanças no ambiente local e imediato do resíduo. A mudança perceptível no espectro de emissão de fluorescência é vista em dois diferentes níveis. Um no qual o resíduo está totalmente imerso e confinado estruturalmente e, portanto, inacessível ao solvente, e outro onde ele está em região da molécula protéica completamente exposta ao solvente. Pode existir uma contribuição das tirosinas no espectro de emissão, aspecto eventualmente indesejável que pode ser contornável com a verificação da emissão sobre um intervalo de comprimento de onda de excitação, geralmente entre 295 e 305 nm, que seleciona puramente o sinal do espectro de emissão do triptofano a ser registrado (Steinhardt et al., 1971; Lakowicz, 1999).

A monitorização do estado de agregação da proteína sob pressão pode ser realizada a partir de medidas de espalhamento de luz a 90° em relação à luz incidente à amostra. O espalhamento Rayleigh da luz é uma ferramenta eficaz para detectar mudanças de forma em macromoléculas e formação ou dissociação de agregados quando estes são partículas de dimensões menores que o comprimento de onda associado à luz monocromática incidente. A intensidade da luz espalhada é função da intensidade desta luz incidente, e podemos assumir que é proporcional à uma determinada massa molecular média para soluções diluídas de proteína (Silva & Weber, 1988). Em oligômeros, do mesmo modo, o processo de dissociação leva à exposição de resíduos de triptofano ao solvente, igualmente ocorrendo desvio para o vermelho do espectro de emissão de fluorescência (Silva & Weber, 1988).

A utilização da BSA possui alguns diferenciais positivos em comparação à utilização da HSA neste estudo. A energia máxima obtida no espectro de emissão da BSA, aspecto relacionado diretamente com a qualidade da monitorização da desnaturação sob pressão, é em torno de 2,7 vezes maior que a do espectro da HSA, o que revela que o único Trp existente na HSA possui, devido à proximidade do grupo tyrosil existente, intensidade de emissão de fluorescência suprimida quanticamente (“quenching”). No caso dos dois Trps da BSA, eles se mostram essencialmente isentos de supressão (Steinhardt et al., 1971). O Trp-214 da BSA ocupa posição similar ao Trp da HSA, no quarto “loop”. O conceito que ainda prevalece na literatura confirma esta posição como pertencente a uma região conservada no interior hidrofóbico da estrutura, numa espécie

de matriz protegida da exposição a solventes polares (Steinhardt et al., 1971; Eftink & Ghiron, 1977). A presença deste Trp no centro da BSA torna eficaz a monitorização conformacional da molécula sob pressão através de espectroscopia de emissão de fluorescência (ver Materiais e Métodos).

OBJETIVO

Esta tese tem por objetivo estudar a desnaturação da proteína monomérica BSA através da combinação de ureia e alta pressão hidrostática e discutir amplamente a dependência da energia livre de desnaturação com a concentração do agente desnaturante. Serão calculados parâmetros termodinâmicos tais como a constante de equilíbrio do processo de desnaturação (K), a variação do volume de desnaturação (ΔV), a variação de energia livre de desnaturação (ΔG), a estequiometria aparente do agente desnaturante (ν) e o parâmetro m . Os resultados serão comparados com os obtidos para proteínas monoméricas da literatura e com um conjunto de dados obtido complementarmente para a SNase Δ +PHS I92A. A proposta é elucidar alternativamente os baixos valores de ν de desnaturante sistematicamente encontrados a partir das curvas de ΔG de desnaturação em função de $\ln[D]$, e inferir sobre a ocorrência de distribuições de espécies heterogêneas no processo de desnaturação de proteínas, proporcionando assim melhor interpretação dos aspectos moleculares e termodinâmicos envolvidos na estabilidade da sua conformação nativa.

MATERIAIS E MÉTODOS

Preparação das proteínas e reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Foi utilizada água deionizada através de sistema de purificação Milipore (resistência de 18 Ω). Os experimentos com a BSA foram realizados com tampão Tris HCl 100 mM em pH 7,4 e com a SNase Δ +PHS I92A em Tris HCl 50 mM em pH 7,0. O ajuste dos pHs foi feito nas temperaturas de cada experimento, 22 °C para a BSA e 18 °C para SNase. A escolha do Tris HCl como sistema tamponante foi em razão da baixa dependência de seus pKas em função da pressão (Neuman et al., 1973). BSA essencialmente livre de ácidos graxos, ureia e GuHCL foram obtidos da Sigma. O mutante I92A da proteína SNase Δ +PHS trabalhado foi obtido junto ao grupo da Johns Hopkins University (EUA), colaboradores do Centre de Biochimie Structurale (CBS), em Montpellier (França), laboratório onde atuei em meu estágio PDEE. A variante I92A da SNase Δ +PHS foi produzida e purificada conforme previamente descrito por Shortle & Meeker (1986).

A concentração da BSA utilizada nos experimentos foi de 0,5 mg/mL (7,7 μ M) e da SNase foi de 1,6 mg/mL (100 μ M). A concentração molar das soluções estoque foi determinada através de medição da absorbância realizada em espectrofotômetro “Beckman-DU640”, e da utilização da relação

$$M = \frac{A}{\epsilon} \quad (1)$$

onde A é a absorbância num dado comprimento de onda considerado, ϵ o coeficiente de extinção molar (para a BSA: $\epsilon_M, 279 \text{ nm}, 1 \text{ cm} = 43824$; para a SNase: $\epsilon_M, 270 \text{ nm}, 1 \text{ cm} = 50828$) e M a concentração molar da proteína na amostra analisada. Foram realizadas correções dos possíveis efeitos de interferentes ópticos, trabalhando dentro dos limites de linearidade da variação da absorbância com a concentração a ser determinada e com a utilização de cubeta de quartzo. Foram também consideradas desprezíveis as mudanças

com relação às propriedades coligativas do soluto e às consequências de uma eventual ionização acentuada da proteína.

Equipamento de alta pressão hidrostática

O sistema utilizado para as medições de fluorescência consiste de um gerador de pressão “HIP” conectado à câmara de pressão hidrostática modelo “ISS HP”, Figs. 2A e 2B, respectivamente. Essa câmara possui três janelas ópticas de safira, através das quais se realizam as medidas espectroscópicas das amostras a pressões de até 250 MPa, limite que essas janelas toleram. No interior da câmara se coloca uma cubeta cilíndrica de quartzo com volume de aproximadamente 1,2 mL que contém a amostra a ser submetida à alta pressão. Para evitar contato da amostra com o fluido que transmite a pressão, no caso o etanol, a cubeta é selada com um tubo de polietileno cuja extremidade é selada por aquecimento, Fig. 2C. Esse tubo colapsado permite a equalização da pressão entre o meio hidrostático e a amostra dentro da cubeta, evitando ao mesmo tempo a mistura dos líquidos. A cubeta é fixada em uma base cilíndrica metálica para evitar o movimento desta no interior da bomba. A escolha do etanol absoluto como meio líquido para a transmissão da pressão é devido ao seu índice de refração próximo ao do quartzo, minimizando a perda de sinal nas medidas espectroscópicas. Através de um sistema adaptado, a amostra pode permanecer sob diferentes temperaturas, pois esta câmara está conectada a um banho refrigerador. O sistema gerador de pressão é automatizado e controlado por um software denominado “Automa” escrito na linguagem de programação Delphi (versão 5,0) e compatível com o Windows. Um computador controla a movimentação de um motor acoplado ao gerador de pressão, coleta os valores de comprimento de onda de emissão e excitação do monocromador do fluorímetro e movimenta os motores para os ajuste das janelas e para as leituras de fluorescência e espalhamento de luz, Fig. 2D. O software recebe informações das medidas de pressão através de um sensor analógico-digital, que permite o controle da pressão em tempo real (adaptado de Paladini & Weber, 1981).

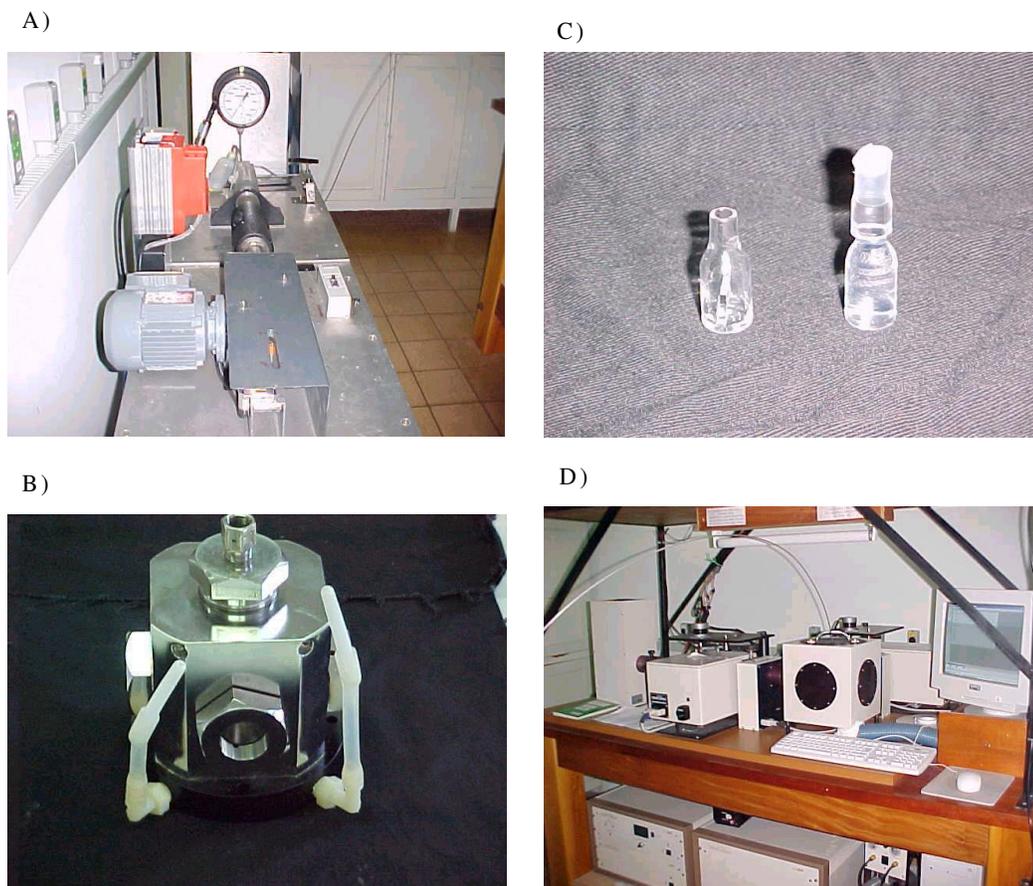


Figura 2 - (A) Foto do gerador de pressão. (B) Foto da câmara de pressão onde são colocadas as cubetas para realização dos experimentos, mostrando as janelas por onde passam os feixes de luz para realização das medidas espectroscópicas e os tubos onde é conectado o sistema refrigerador. (C) Foto das cubetas de quartzo, uma sem ser selada (lado esquerdo) e a outra selada com tubo de polietileno (lado direito). (D) Foto do fluorímetro e do computador, responsável por executar uma série de funções automatizadas.

Medidas de fluorescência sob pressão

As medidas de espectros de fluorescência foram registradas em um espectrofluorímetro “Edimburg FL 900”, equipado com uma lâmpada fonte de xenônio. O sistema de pressão automatizado se encontra detalhado por Santos et al. (2004). Nas medidas com a BSA foi utilizado o comprimento de onda de excitação de 280 nm, com monitorização da emissão entre 300 e 450 nm. Previamente também foram realizadas algumas medições com excitação com comprimento de onda fixado entre 285 e 305 nm, com intuito de identificar, como mencionado, possíveis interferências de emissão das tirosinas, resíduos também presentes na molécula. Para a SNase foi utilizado um sistema muito similar ao utilizado para a BSA. O feixe de luz de excitação, igualmente proveniente de lâmpada de xenônio, teve comprimento de onda fixado em 280 nm, dentro do mencionado intervalo do comprimento característico de excitação do Trp. Diferentemente, o feixe de luz é transportado até a câmara contendo a amostra através de fibra óptica. O intervalo de leitura do espectro de emissão foi selecionado em 320 e 450 nm. Essa câmara permite medidas espectroscópicas das amostras à pressões de até 300 MPa, limite um pouco superior ao da câmara utilizada para a BSA.

É possível representar as curvas de desnaturação a partir de plots da área sob a curva ou a partir do centro de massa do espectro para cada pressão e concentração de agente desnaturante. A área sob a curva pode apresentar problemas, pois os erros eventualmente atribuídos se tornam dependentes das variáveis pressão e concentração e, além disso, o pico máximo de emissão de fluorescência pode ser de difícil definição pelo ajuste gaussiano, o que conduz a desvios significativos. A fim de se obterem resultados mais coerentes, foi adotado o centro de massa de cada espectro de emissão para o tratamento dos dados diretamente obtidos. As alterações nos espectros de fluorescência resultantes da exposição dos resíduos de triptofano foram quantificados pelo centro de massa espectral (ν_p),

$$\nu_p = \frac{\sum \nu_i F_i}{\sum F_i} \quad (2)$$

Onde F_i é a fluorescência emitida no número de ondas e ν_i o somatório realizado durante um intervalo de valores apreciáveis de F . O grau de desnaturação à pressão p (α_p) está relacionado com ν pela expressão

$$\alpha_p = \left[1 + \frac{Q(\langle \nu_p \rangle - \langle \nu_{des} \rangle)}{(\langle \nu_n \rangle - \langle \nu_{des} \rangle)} \right]^{-1} \quad (3)$$

onde Q vem a ser a relação entre os rendimentos quânticos dos diferentes estados conformacionais, $\langle \nu_p \rangle$ o centro de massa à pressão p , e $\langle \nu_n \rangle$ e $\langle \nu_{des} \rangle$ os centros de massa correspondentes às formas nativa e desnaturada, respectivamente. O software "Mathematica" foi usado para que fosse obtido o ajuste das curvas de desnaturação. Para as medidas de espalhamento de luz foram utilizados valores de comprimento de onda de excitação de 340 nm e monitorização de emissão no intervalo de 349 a 354 nm.

TEORIA TERMODINÂMICA

Perfis de desnaturação foram analisados com base no equilíbrio de ligantes para a interação da molécula de proteína com a ureia a partir do modelo de dois estados para a transição da forma nativa para a desnaturada. A conformação nativa da proteína sofre mudanças com acréscimos de concentração dos denominados agentes caotrópicos, tais como a ureia e o GuHCl, e a estimativa dos valores de $\Delta G_{[U]}^0$ quando trabalhados em um grande intervalo de concentração de solvente vem a ser bastante informativo do ponto vista do estudo da estabilidade (Schellman, 1987 e 2003). A análise do efeito da ureia sobre a BSA foi realizada a partir de uma abordagem semelhante à descrita anteriormente para o efeito deste agente e prótons sobre agregados de proteína (Bispo et al., 2007; Santos et al., 2004 e 2008). Assim, a constante de desnaturação aparente obtida a cada concentração de ureia, $K_{[U]}$, é relacionada com a constante de desnaturação K na forma $K_{[U]} = K[U]^v$ como em Santos et al., (2004). A correspondente energia livre de desnaturação aparente em base molar, $\Delta G_{[U]}^0$, é dada por:

$$\Delta G_{[U]}^0 = -RT \ln K - RT \ln[U]^{\nu} = \Delta G_{U_1}^0 - \nu RT \ln[U] \quad (4)$$

onde U_1 indica uma concentração de ureia de 1 M e ν corresponde a uma determinada estequiometria aparente de ureia. Nota-se que a constante de equilíbrio em 1 M de ureia, K_{U_1} , vem a ser igual a K^*I^{ν} , e portanto $-RT \ln K_{U_1} = -RT \ln K = \Delta G_{U_1}^0$.

A partir do gráfico da variação dos valores de $\Delta G_{[U]}^0$ com relação a $\ln[U]$ é obtida uma reta com inclinação (coeficiente angular) numericamente correspondente à $-\nu RT$. O cálculo da constante de equilíbrio à pressão p a uma dada concentração de ureia $[U]$, ou seja, $K_{[U],p}$, é baseado na relação (Santos et al., 2004)

$$K_{[U],p} = K_{[U]} \exp(-p\Delta V/RT) \quad (5)$$

onde ΔV é a variação do volume de desnaturação e o índice $[U], p$ na expressão representa a concentração de ureia das espécies à sua pressão correspondente. O cálculo da constante de equilíbrio, $K_{[U],p}$, pode ser feito com base no respectivo grau de desnaturação, $\alpha_{[U],p}$, como

$$K_{[U],p} = \frac{\alpha_{[U],p}}{1-\alpha_{[U],p}} \quad (6)$$

A respectiva energia livre de desnaturação à pressão p é

$$\Delta G_{[U],p} = \Delta G_{[U]} + p\Delta V \quad (7)$$

tal que, estudando a variação de $\Delta G_{[U],p}$ com relação a pressão p , através das curvas obtidas a partir da (Eq.7), é obtido como inclinação da reta o ΔV , e o parâmetro $\Delta G_{[U]}^0$ como a energia livre de desnaturação à pressão atmosférica. Uma acentuada alteração na inclinação nas retas obtidas de $\Delta G_{[U]}^0$ versus $\ln[U]$, como resposta às diferentes

concentrações de ureia, é interpretada como um indicador de distintas sensibilidades da proteína à ação do solvente ureia. Conseqüentemente, a desnaturação global, ou total, vem a refletir uma totalidade de respostas de uma população específica de moléculas de BSA, igualmente, com suas diferentes sensibilidades. Tal somatório das diferentes sensibilidades fornece a constante de equilíbrio geral $K_i[U]^v$, onde $K_{i,[U]} = K_i[U]^v$, e o índice i representa cada população BSA.

Com base nesta concepção, os dados experimentais passam a corresponder à soma das distintas populações envolvidas no processo e um grau de desnaturação α^* é interpretado como um parâmetro particionado da seguinte forma

$$\alpha_U^* = \sum_{i=1}^n f_i \alpha_i \quad (8)$$

onde o coeficiente f_i representa a fração de espécies presentes. Assim, a correspondente energia livre de desnaturação resultante em função das constantes de equilíbrio passa a ser expressa como

$$\Delta G_{[U]}^0 = -RT \ln \left[\frac{\alpha_U^*}{1 - \alpha_U^*} \right] = -RT \ln \left[\frac{\sum_{i=1}^n \frac{K_i[U]^v f_i}{1 + K_i[U]^v}}{\sum_{i=1}^n \frac{1 - K_i[U]^v f_i}{1 + K_i[U]^v}} \right] \quad (9)$$

Esta abordagem alternativa do estudo do processo da desnaturação de proteínas na presença de agentes desnaturantes se baseia no ocorrência de uma população heterogênea de proteínas. Como será visto, a ideia em que se baseia tal abordagem fornece, mais coerentemente, elevados valores de estequiometria do ligante, v .

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Efeito da ureia e da pressão sobre a BSA

Foram investigadas as alterações do espectro de emissão de fluorescência da BSA em diferentes concentrações de ureia e em diferentes pressões buscando correlacionar com as respectivas alterações conformacionais. Comparado com o espectro de emissão de fluorescência obtido na ausência de ureia, uma alta concentração de agente desnaturante produziu um desvio significativo para o vermelho, que se intensificou com o aumento da pressão hidrostática.

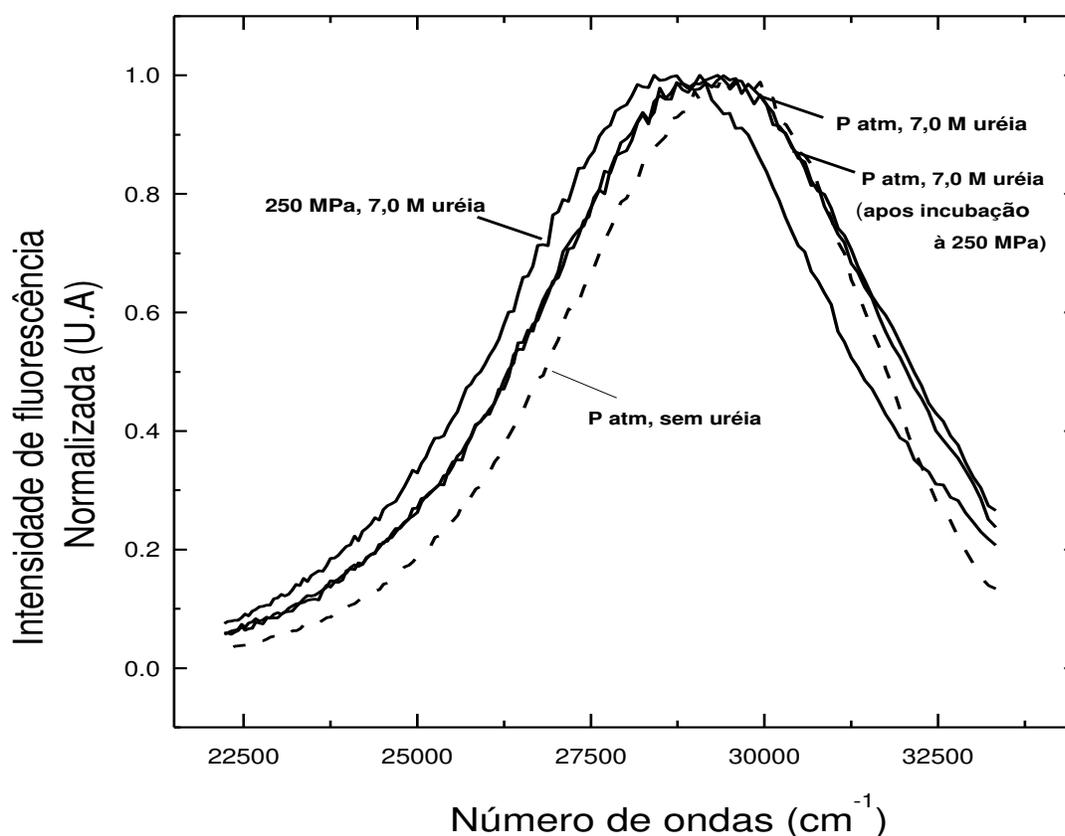


Figura 3 – Espectros de fluorescência da BSA, após normalização, em diversas concentrações de ureia e em diferentes pressões (valores de pressão indicados no gráfico). Excitação em 280 nm e emissão entre 300-450 nm. Valores expressos em número de ondas. A concentração de BSA foi de 0,5 mg/mL em 100 mM de tampão Tris-HCl, pH 7,4 e à temperatura, estabilizada em incubação inicial, de 22 °C.

O espectro de fluorescência registrado após o retorno à pressão atmosférica é muito similar ao obtido antes do aumento de pressão (Fig. 3), indicando a reversibilidade do fenômeno de transição estudado nas condições experimentais.

Os centros de massa dos espectros de emissão de fluorescência da BSA, medidos em número de ondas e calculados de acordo com a Eq. 2, forneceram valores que revelaram o grau de exposição dos aminoácidos aromáticos da proteína, os resíduos de triptofano. Esse parâmetro reflete o grau de desnaturação. Segundo descrito na literatura, o pico máximo de intensidade na emissão de fluorescência do Trp quando localizado conformacionalmente no interior do núcleo hidrofóbico é em torno de 340 nm (ou 29800 cm^{-1}), e quando ele está completamente exposto à ação do solvente, é de em torno de 350 nm (ou 28400 cm^{-1}) (Lakowicz, 1999). No entanto, tais dados são referenciais mais efetivos em casos de idealidade. Numa análise mais rigorosa, devemos ter em mente que o máximo desvio resultante durante o processo de desnaturação pode sofrer alguma influência espectral de grupos proximais locais, como por exemplo no caso da presença de demais aminoácidos vizinhos ao Trp, podendo proporcionar uma pequena alteração do desvio para o vermelho dos espectros obtidos (Kita et al., 1994).

O efeito da pressão sobre o centro de massa espectral em concentrações de ureia até 8,0 M é mostrado na Fig. 4, a seguir. A pressão produziu um desvio para o vermelho nos espectros de fluorescência em todas as concentrações de ureia, indicando aumento da desnaturação na presença deste agente. Os valores de centro de massa obtidos no retorno à pressão atmosférica foram idênticos àqueles obtidos antes da aplicação de pressão para todas as concentrações de ureia (dados não mostrados), indicando que o processo de desnaturação induzido por pressão se mostrou reversível, acentuando a validade dos parâmetros termodinâmicos trabalhados. Claramente se observa que o processo de desnaturação foi favorecido pelo aumento de pressão em presença de concentrações de ureia entre 3,5 e 8,0 mol/L.

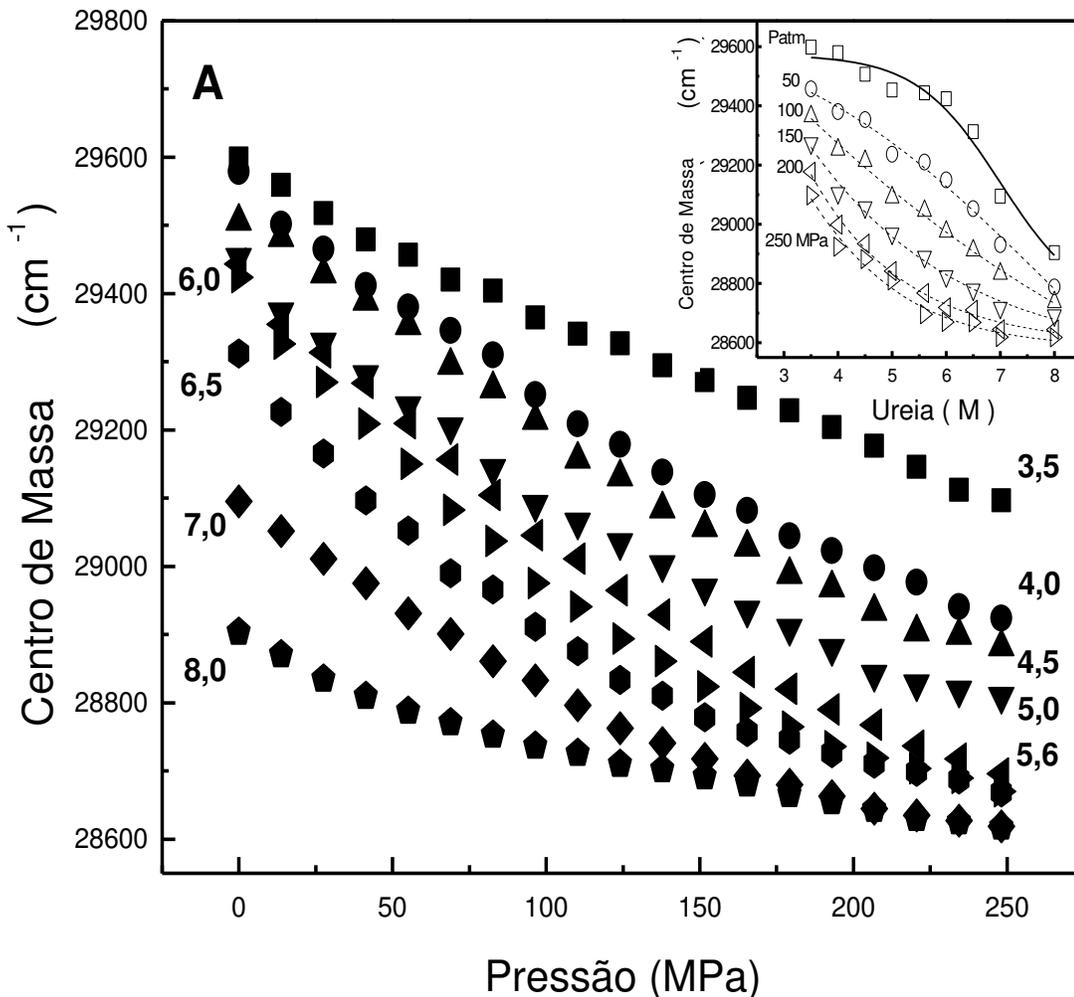


Figura 4 - Efeito da pressão e ureia sobre o centro de massa do espectro de emissão de fluorescência da BSA. A cada pressão foram obtidos os dados após intervalo de incubação de 10 minutos. Os experimentos foram realizados em triplicatas e os resultados da análise do desvio-padrão foram menores do que os símbolos denotados. O efeito da ureia sobre o centro de massa em diferentes pressões com base nesses dados é mostrado na inserção (detalhe superior). Todas as outras condições experimentais como na Fig. 1.

O efeito de pressão na BSA em diferentes concentrações é mostrado na mesma Fig. 4, no detalhe superior inserido. O respectivo grau de desnaturação, calculado através da Eq. 3, é apresentado na Fig. 5.

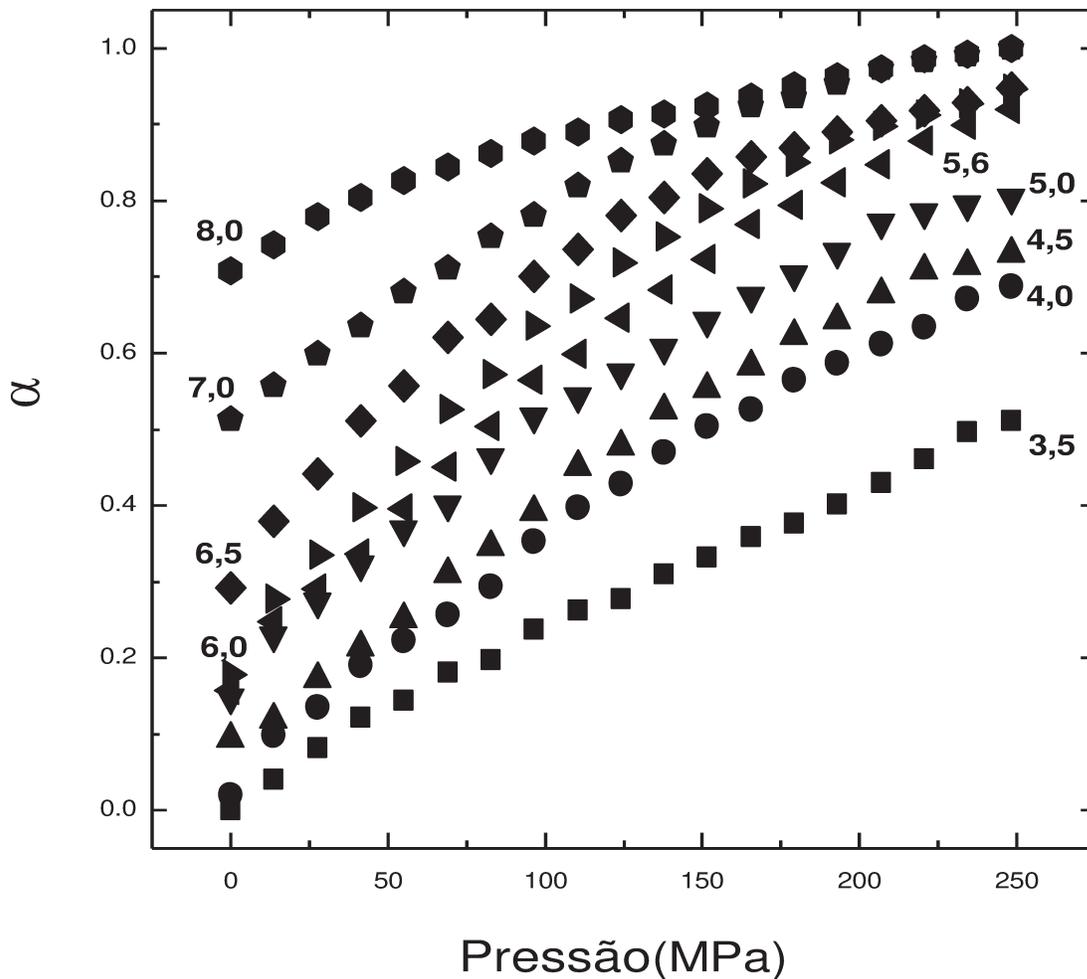


Figura 5 - Grau de desnaturação α em função da pressão e da concentração de ureia. Valores correspondentes à Eq. 3. Mesmas condições experimentais anteriores.

É interessante notar que nas curvas obtidas na Fig. 4 (e no seu detalhe superior, em cada concentração de ureia) os centros de massa não se apresentam alinhados em mesma linha referencial de base, ou platô, nas pressões inicial, atmosférica, e final, de 250 MPa. Tal observação destaca a diversidade conformacional da BSA, provável reflexo de sua heterogeneidade populacional, o que será melhor abordado adiante. Esse fenômeno pode ser resultante do acesso, possível através de métodos que se utilizam da perturbação por alta pressão, às características volumétricas do estado desnaturado. A esse respeito, se sugere a ocorrência de etapas de desestabilização por pressão precedentes à etapas desestabilizadoras resultantes da ação da ureia, como igualmente verificado em proteínas

globulares tais como a Ankirina (Rouget et al., 2010), onde perfis espectroscópicos de desnaturação muito semelhantes são verificados e aprofundadamente discutidos.

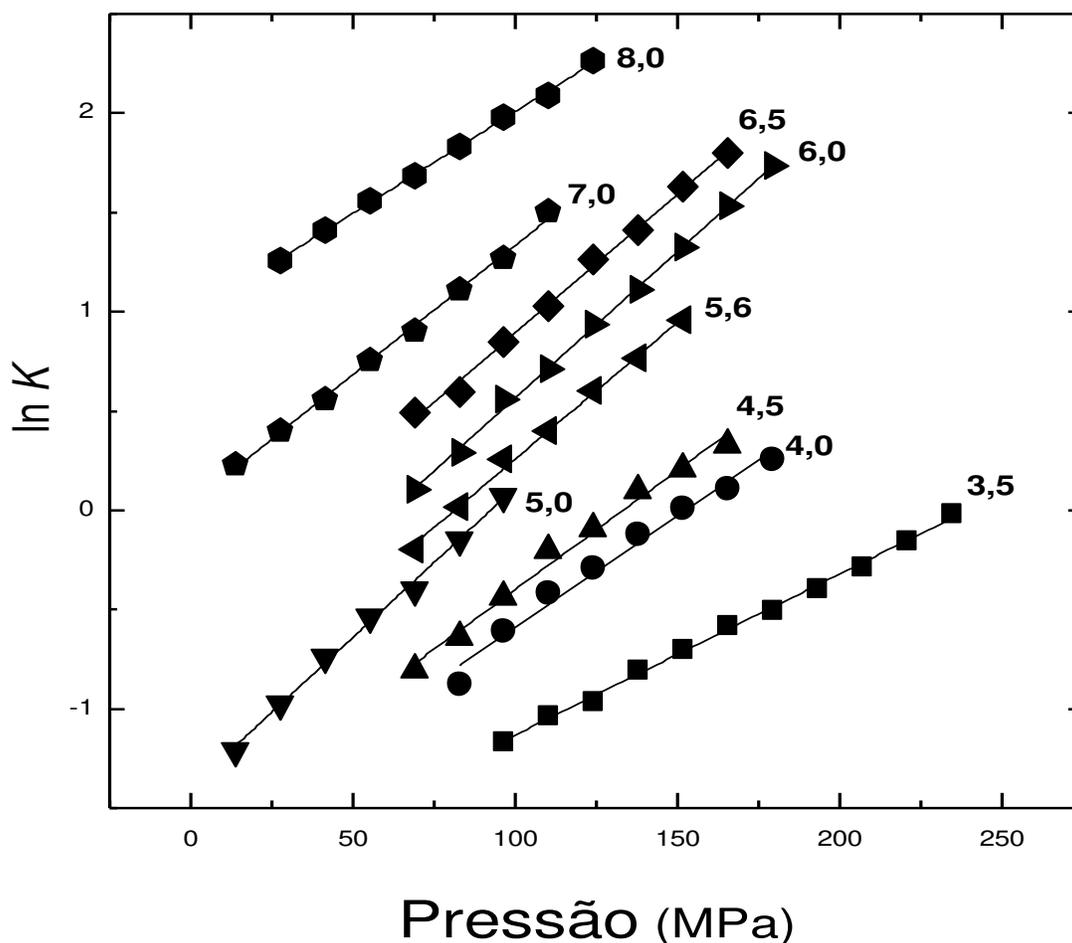


Figura 6 – Curvas correspondentes a $\ln K$ por pressão, nas diferentes concentrações de ureia, como calculado a partir de Eq. 5. Condições experimentais como na Fig. 1.

A pressão facilitou a desnaturação da BSA por ureia ($\Delta G_{[U],p}$) em todas as concentrações verificadas (Figs. 4 e 5). As curvas do logaritmo natural de K em função da pressão nas diferentes concentrações de ureia resultaram numa dependência linear em todos os casos (Fig. 6, acima).

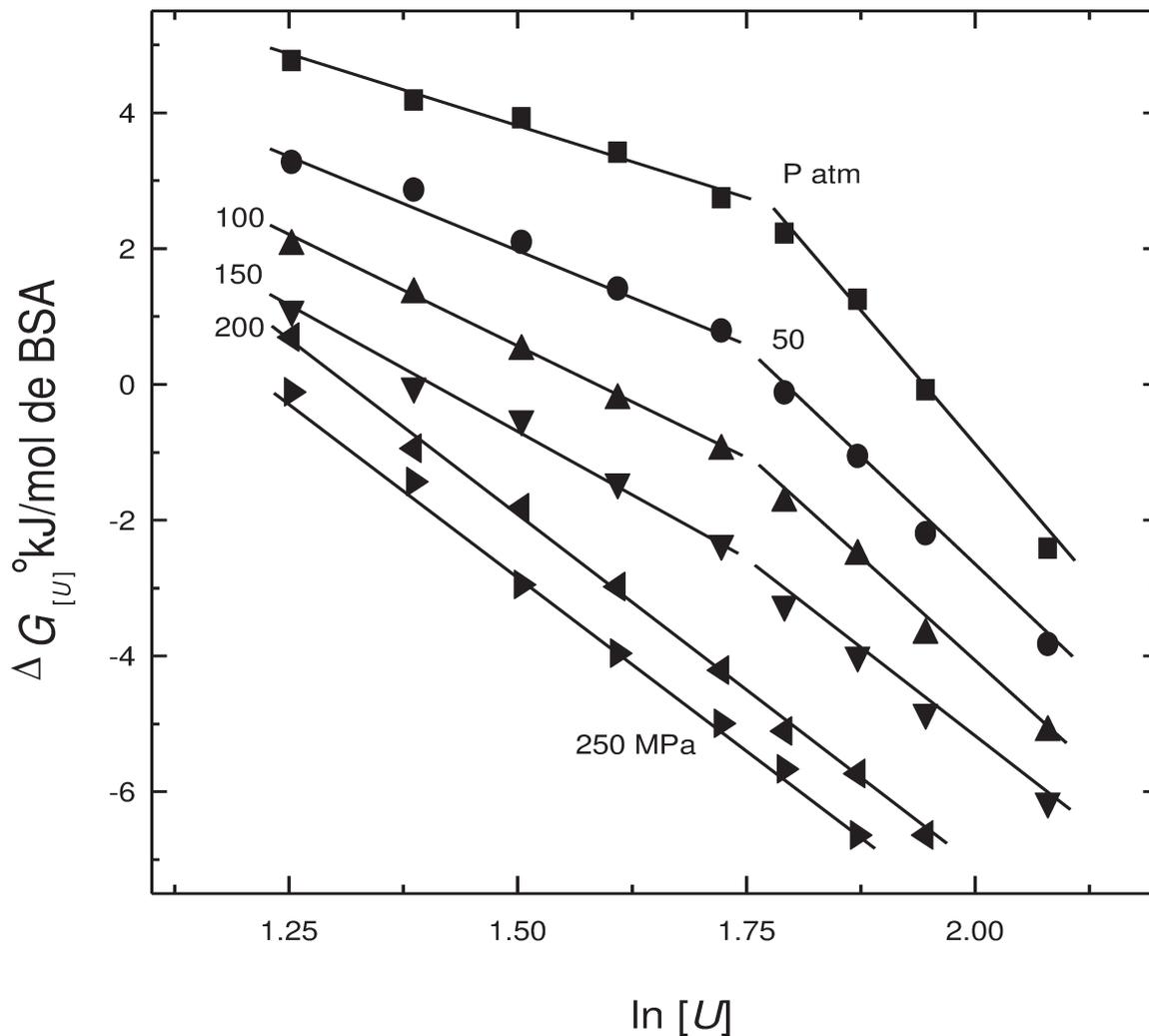


Figura 7 - Efeito da concentração da ureia sobre a energia livre de Gibbs de desnaturação da BSA em diferentes pressões, com base nos dados da Fig. 4 (inserção) e Eq. 4.

A alta pressão induziu a transição de um perfil bifásico de transição para um perfil monofásico ($\Delta G_{[U],p}$ versus $\ln[U]$; Fig. 7). Os acréscimos de pressão parecem não alterar o ponto onde ocorre a mudança do perfil de variação do $\Delta G_{[U],p}$ em resposta às variações de concentração de ureia. Este ponto se mostrou como em torno de $\ln[U] = 1,75$, ou seja, $[U] = 4,5$ M. O que pode ser postulado é a hipótese de ocorrência de uma mudança

de fase em torno desta concentração de solvente, em pressões até 150 MPa, resultado justamente das diferenças de acessibilidade do solvente na transição conformacional da proteína, nas diferentes combinações do par pressão e concentração do agente desnaturante.

Novas abordagens visando à compreensão das interações proteína-desnaturante e dos mecanismos da desnaturação têm sido propostas por muitos autores (Schellman, 1978, 1987 e 2003; Baskakov et al., 1999; Barrick et al., 2006). Em geral, a desnaturação de proteínas é tida como resultante do rompimento de um refinado balanço de forças existente nas interações proteína-proteína e proteína-solvente. Neste processo de transição entre os estados nativo e desnaturado ocorrem contribuições significativas das ligações de hidrogênio da cadeia peptídica, dos resíduos laterais e das regiões que passam a ficar expostas na proteína. O modelo teórico apresentado nesta tese se baseia no equilíbrio de dois estados e permitiu a quantificação de proteínas nativas e desnaturadas. O modelo de equilíbrio é bastante dependente da distribuição de energias locais, do nível de cooperatividade envolvido no processo e até mesmo da topologia da molécula protéica (Barrick et al., 2008 e 2009). A desnaturação induzida por agentes como a ureia e a GuHCl pode geralmente ser considerada como um processo que envolve equilíbrio de dois estados, resultado de uma brusca transição da proteína de seu estado nativo para seu estado desnaturado (Pace, 1998; Latypov et al., 2007), assim como descrito para a HSA (Farruggia & Pico, 1999). A acumulação de conformações intermediárias neste tipo de transição também se relaciona com a natureza do solvente escolhido para o estudo do processo de desnaturação e com as condições de pH (Carra et al., 1994). No caso da BSA, extremos ácidos e alcalinos de pH influenciam sensivelmente a capacidade da ureia em desnaturar a proteína e formar estruturas intermediárias (Sen et al., 2008). Como mostrado no detalhe da Fig. 4 (inserção superior), em pressões maiores que 50 MPa o perfil de desnaturação se tornou mais abrupto, refletindo que uma transição característica de dois estados se tornou ainda mais acentuada com o aumento da pressão. Na análise aqui apresentada, se optou por utilizar a curva de desnaturação da BSA à pressão atmosférica ajustando o modelo proposto, razão pela qual seria mais prático e exequível

simular o comportamento bifásico resultante e que se relaciona com os aspectos que serão discutidos e que se envolvem com a heterogeneidade.

A presença de intermediários no processo foi sugerida por Khan et al. (1987) e estudos anteriores sobre a desnaturação da HSA, molécula com alto grau de homologia com a BSA, em processo induzido por ureia à pressão atmosférica e em pH neutro, revelaram um perfil de desnaturação semelhante ao observado nestas condições experimentais adotadas (Tanaka et al., 1997).

A desnaturação da BSA induzida sob pressão e em concentrações subdesnaturantes de ureia consistentemente produziu uma mudança significativa de volume e permitiu a obtenção da energia livre de desnaturação à pressão atmosférica (Fig. 8). Os valores para as menores concentrações de ureia variou entre -20 e -30 ml/mol de BSA, enquanto que para as concentrações de ureia maiores que 6 M foi de -36 ml/mol de BSA. Os efeitos da pressão são procedentes da diferença entre os volumes específicos do sistema constituído pela proteína (BSA) e solventes (água e agente desnaturante) na sua transição para a forma desnaturada. A maior parte das proteínas até hoje estudadas tipicamente apresentam um maior volume específico no estado nativo do que no estado desnaturado, devido sobretudo a presença de cavidades, ou espaços vazios, no interior da conformação nativa. Pressão e volume são grandezas termodinâmicas conjugadas e, pelo princípio de Le Chatelier, a aplicação da pressão conduz o sistema inicial ao menor volume final de desnaturação (Royer, 2002; Sen, et al., 2007). Como mostrado, a variação do volume de desnaturação foi maior nas concentrações mais elevadas de ureia.

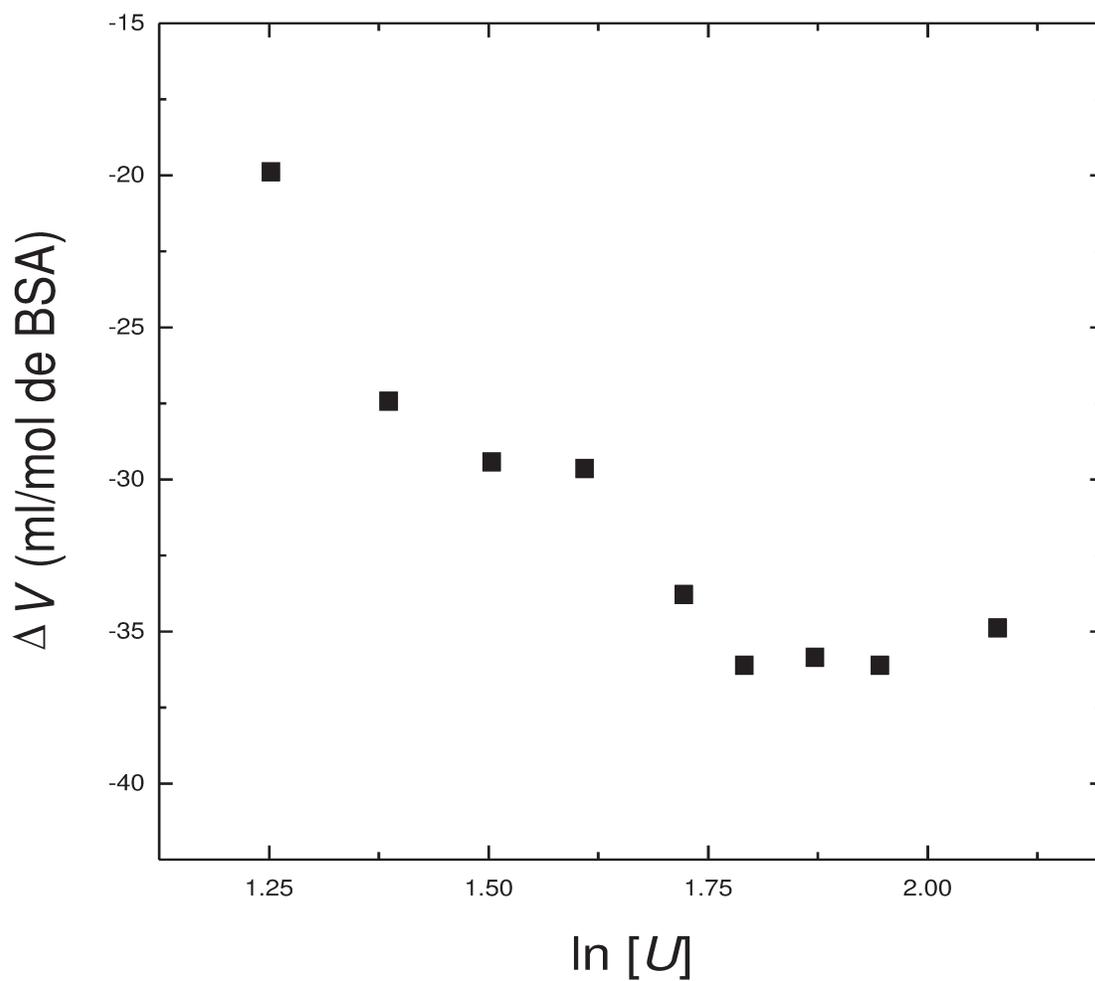


Figura 8 – Efeito da ureia sobre a variação do volume de desnaturação, com base nos dados da Figura 4 e Eq. 7. Erro calculado em torno 6%. Condições experimentais como nas figuras anteriores.

O comportamento cinético da BSA foi estudado a partir de perfis de relaxação em múltiplas situações de incubação obtidas para uma concentração fixa de 4,5 M de ureia. A Fig. 9 mostra a dependência do desvio para o vermelho do centro de massa espectral quando a BSA é pressurizada abruptamente da pressão atmosférica até a pressão de 250 MPa. Se observa que após 20 minutos, a relaxação do centro de massa atingiu cerca de 85% do máximo desvio possível no perfil de decaimento apresentado. Posteriormente, a comparação obtida para diferentes tempos de incubação após sucessivos acréscimos de pressão indicou que os resultados para tempos maiores que 10 minutos foram idênticos (Fig. 10), sugerindo que o processo de desnaturação atingiu seu equilíbrio cinético. Na Fig. 11 são mostrados os ciclos completos de compressão e descompressão sobre a proteína BSA nas mesmas condições anteriores, ou seja, na presença de ureia em concentração de 4,5 M. Observa-se que o retorno à pressão atmosférica resulta em recuperação quase que total da fluorescência original, com roteiros semelhantes adotados pelos ciclos de ida e volta, refletindo novamente o aspecto de reversibilidade do processo estudado.

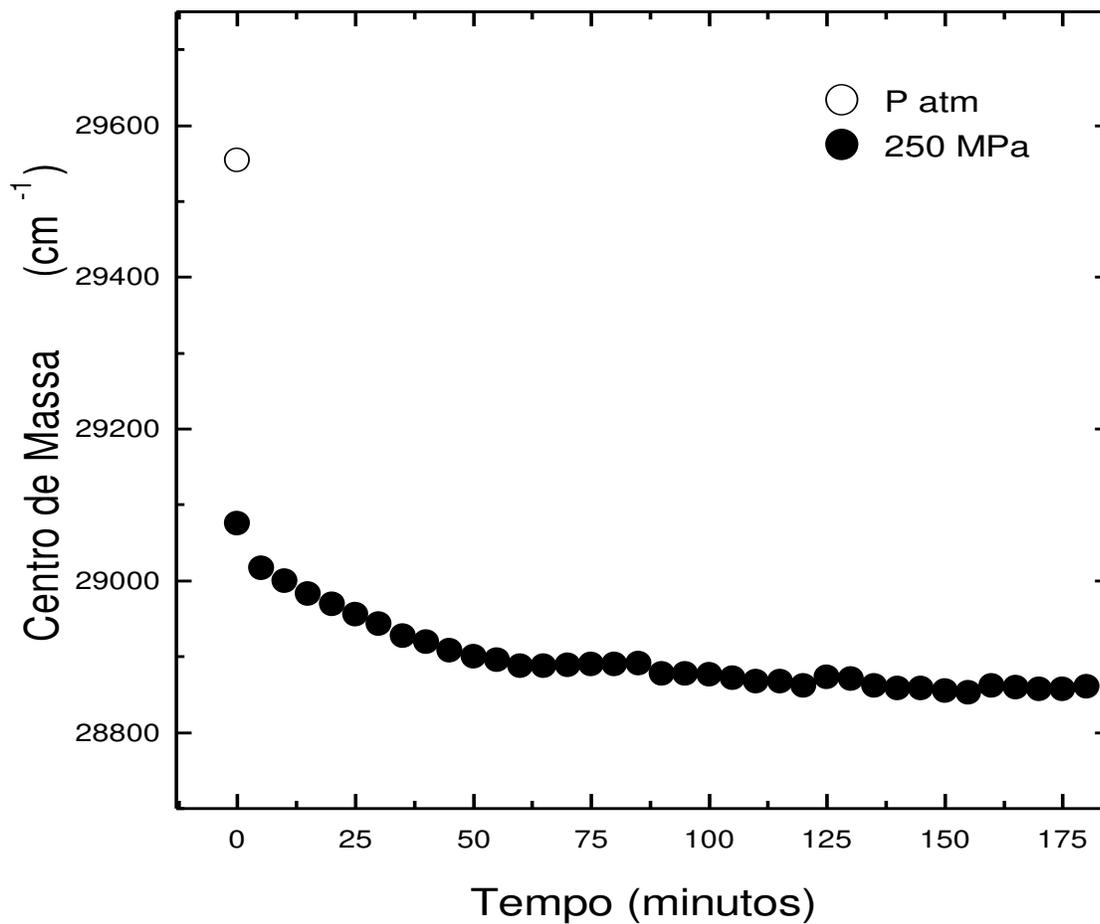


Figura 9 – Efeito da pressão sobre o centro de massa do espectro de emissão de fluorescência da BSA na concentração de ureia de 4,5 M. A solução foi pressurizada desde a pressão atmosférica até 250 MPa em 1,5 min. e depois sua relaxação foi acompanhada.

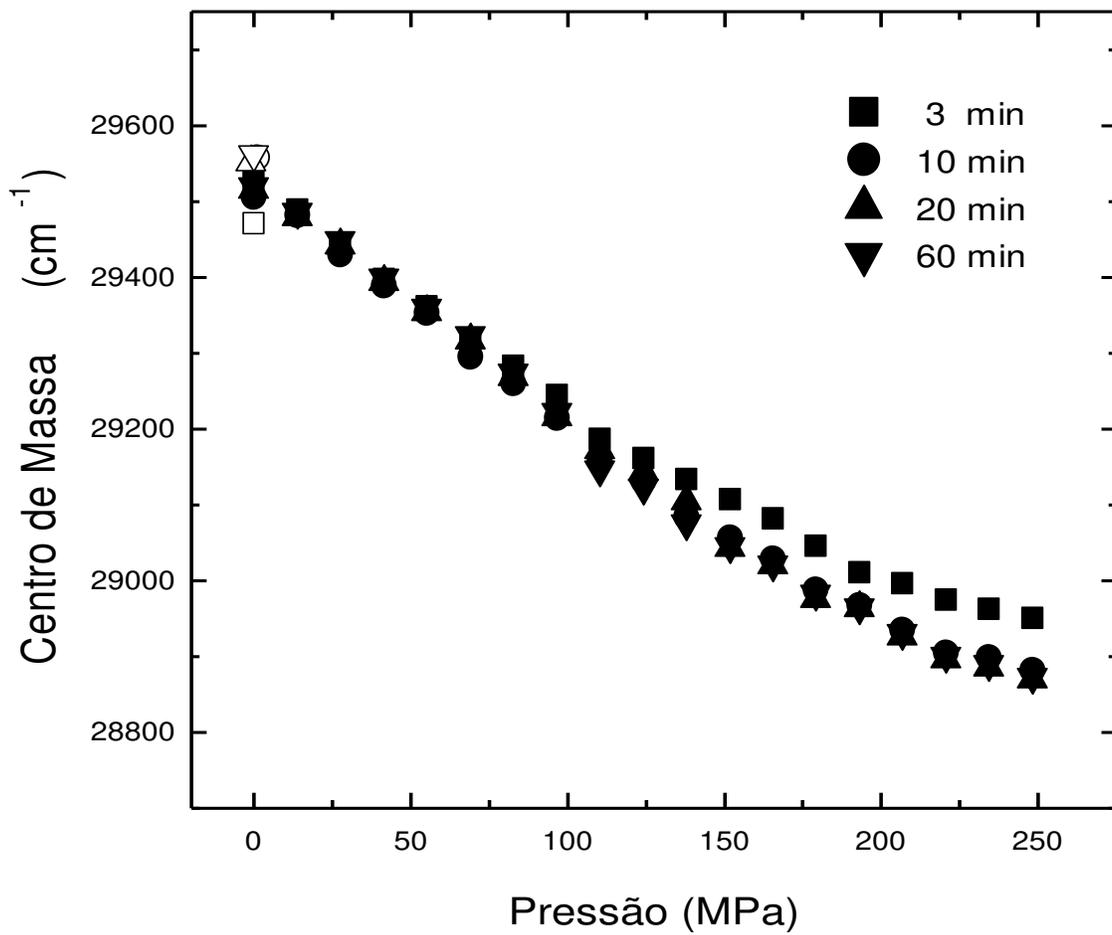


Figura 10 – Influência do tempo de incubação sobre a desnaturação induzida por pressão da BSA em concentração de ureia igual a 4,5 M. Os pontos não preenchidos representam o retorno à pressão atmosférica após a incubação.

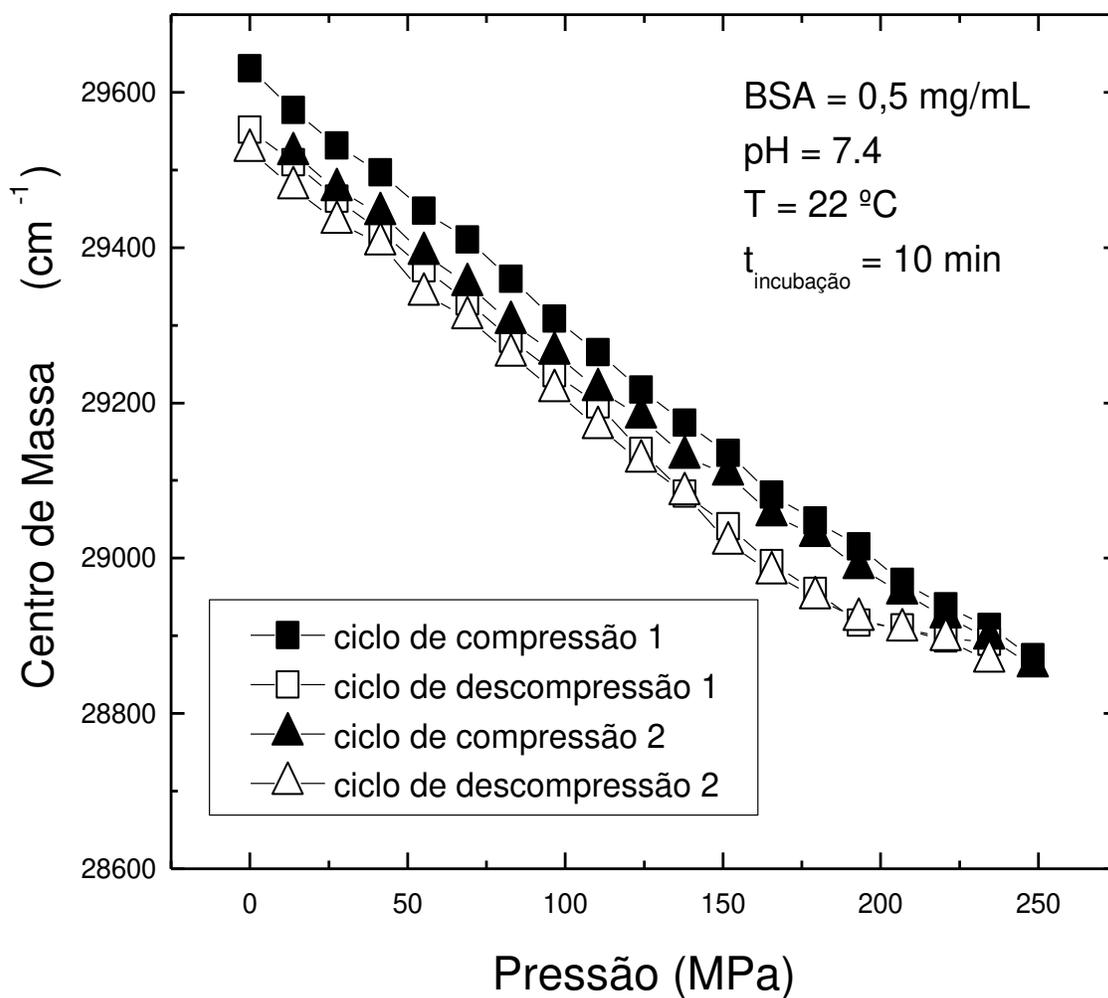


Figura 11 – Ciclos completos de compressão e descompressão sobre a proteína BSA em ureia com concentração igual a 4,5 M. Todas as outras condições mantidas como na Fig.1.

Dependência linear do ΔG^0 de desnaturação com $[U]$

A dependência linear da energia livre de desnaturação em resposta à variação de concentração do solvente fornece o parâmetro m , uma constante determinada empiricamente e que tem tido aplicação a inúmeros sistemas proteína-solvente (Greene & Pace, 1974). Esse parâmetro representa a diferença na variação da energia livre transferida da água para uma solução padrão de 1 M de ureia num modelo onde são estudados diversos aspectos relacionados com a dimensão e a topologia da proteína. Tal modelo permite, por exemplo, analisar as mudanças que ocorrem na superfície exposta ao solvente na transição do processo de desnaturação (Auton & Bolen, 2005). Os parâmetros m foram determinados para a BSA. A partir de espectros de desnaturação descritos na literatura para outras proteínas monoméricas, foram igualmente calculados os tais parâmetros com base nos denominados “plots de Tanford”, ou seja, nas respectivas curvas de $\Delta G_{[U],p}$ versus $[U]$ destes monômeros (mostrados no Anexo I). Os valores foram comparados com os valores de m obtidos originalmente nos respectivos trabalhos (dados não apresentados) e se mostraram em concordância. Cabe ressaltar que os valores de m para BSA foram calculados com base nas curvas experimentais de desnaturação induzida por diferentes pressões e em diferentes concentrações de ureia, resultados apresentados na linha 1 da Tab. 1. Esta abordagem traz um aperfeiçoamento qualitativo em relação aos valores obtidos por medição direta da fluorescência à pressão atmosférica, como os verificados nos trabalhos consultados. O aprimoramento ocorre sobretudo em baixas concentrações de ureia, onde vem a ser mais crítica a quantificação da desnaturação e onde podem ocorrer desvios importantes.

Na referida Tab. 1 se pode observar um conjunto de proteínas monoméricas que exibe mudanças nos seus valores de parâmetro m e refletem uma transição bifásica (m_1 e m_2). Em geral, estas proteínas apresentam maior sensibilidade à ação da ureia na fase final de desnaturação. Mudanças nos valores de m são geralmente atribuídos à alterações na conformação dos estados nativo e desnaturado (Greene & Pace, 1974). Luque et al. (2002) revelou que a presença de formas intermediárias pode resultar em curva com perfil bifásico envolvendo equilíbrio entre proteínas nativas e estruturas ainda não completamente desnaturadas.

Proteína	Forma	ν_1	Ureia (M)	ν ou ν_2	Ureia (M)	m_1 (kJ.mol ⁻¹ .M ⁻¹)	Ureia (M)	m ou m_2 (kJ.mol ⁻¹ .M ⁻¹)	Ureia (M)	Método	pH	T (°C)	Ref.
BSA	nativa	1,68	3,5–5,6	6,67	6,5–8,0	0,92	3,5–5,6	2,35	6,5–8,0	c. m.	7,4	22	Este estudo
HSA	isômero N	4,13	2,5–4,5	7,99	5,33–7,7	2,96	2,5–4,5	3,11	5,33–7,7	fl.	7,0	20	Ahmad, 2005
FKBP	clonada	-	-	8,46	2,1–6,7	-	-	5,12	2,1–6,7	d. c..	7,2	25	Egan, 2003
RNase T1	nativa	1,66	0,65–2	6,89	2,3–5,1	-	-	4,73	0,6–5,1	fl.	8,0	30	Pace, 1986
RNase Ba	nativa	0,51	0–2,5	14,92	3–8,0	-	-	10,65	3,0–7,0	fl.	7,0	25	Pace, 1986
RNase Ba	nativa	1,42	0–0,8	7,24	1–4,0	1,05	1–4,0	8,14	1,0–2,7	fl.	3,0	25	Pace, 1992
RNase Sa	nativa	-	-	10,0	4,6–8,1	-	-	4,03	2,1–3,9	d. c.	7,0	25	Pace, 1998
RNase Sa2	nativa	-	-	5,98	0,9–3,9	-	-	5,66	4,6–8,1	d. c.	7,0	25	Pace, 1998
RNase Sa3	nativa	-	-	11,6	3,5–7	9,26	3,5–7	4,37	3,5–7	d. c.	7,0	25	Pace, 1998
β-Tripsina	nativa	-	-	9,19	1,6–4,5	-	-	8,55	1,6–4,5	c. m.	2,8	25	Brumano, 2004
IL-1Ra	nativa	-	-	14,96	3,3–7,1	-	-	0,29	3,3–7,1	fl.	7,0	25	Latypov, 2007
β-Lactoglobulina	nativa	-	-	9,05	4,6–8,1	-	-	4,32	4,6–8,1	d. c.	2,0	25	Dar, 2007
Citocromo c	nativa	0,56	0–6,0	13,22	6,4–10,0	0,34	6,4–10	4,06	6,4–10,0	d.c.	7,0	25	Shiu, 2008
Lisozima	nativa	1,06	1,0–4,0	11,79	4,5–8	1,22	4,5–7	5,12	4,6–7,0	fl.	2,9	25	Shiu, 2008
Transtiretina	M-TTR	-	-	9,89	2,0–5,0	-	-	6,79	2,0–4,5	fl.	7,4	24	Babbes, 2008

Tabela 1 - Parâmetros m e ν calculados para diferentes proteínas monoméricas. Processo de desnaturação com base nos dados espectroscópicos, onde c. m. = centro de massa do espectro de emissão, fl. = fluorescência a um determinado comprimento de onda fixado e d. c. = dicroísmo circular.

Assim, os diferentes valores de m obtidos para BSA, na abordagem mais precisa que é aqui proposta, podem refletir a interação de ureia com diferentes domínios da proteína. Tanaka et al. (1997) relataram que o domínio III da HSA se mostrou particularmente sensível à desnaturação induzida por ureia. Ahmad et al. (2004) também observaram essa maior susceptibilidade deste domínio em uma concentração de ureia $< 4,8$ M, enquanto que os domínios I e II se mostraram sensíveis às concentrações de ureia acima de 5 M. Deste modo, é interessante notar que o valor de m_1 aqui obtido e relatado sugere correspondência com às mudanças no domínio III da BSA, e o valor do m_2 , por sua vez, uma associação com as alterações nos domínios I e II.

Dependência linear do ΔG^0 de desnaturação com $\ln[U]$

Conforme mencionado na Introdução, o ΔG^0 de desnaturação pode apresentar uma dependência logarítmica com a concentração de desnaturante e é, neste momento, retomada a discussão a partir dos perfis obtidos na Fig. 7. Um aspecto a ser inicialmente discutido é o fato de que uma análise mais rigorosa desta relação pode revelar que uma determinada resposta aparentemente linear seja apenas uma parte fragmentada de uma resposta na realidade não linear. Isto pode ocorrer se examinarmos um intervalo mais amplo de concentrações, como analogamente é mostrado na Fig. 12.

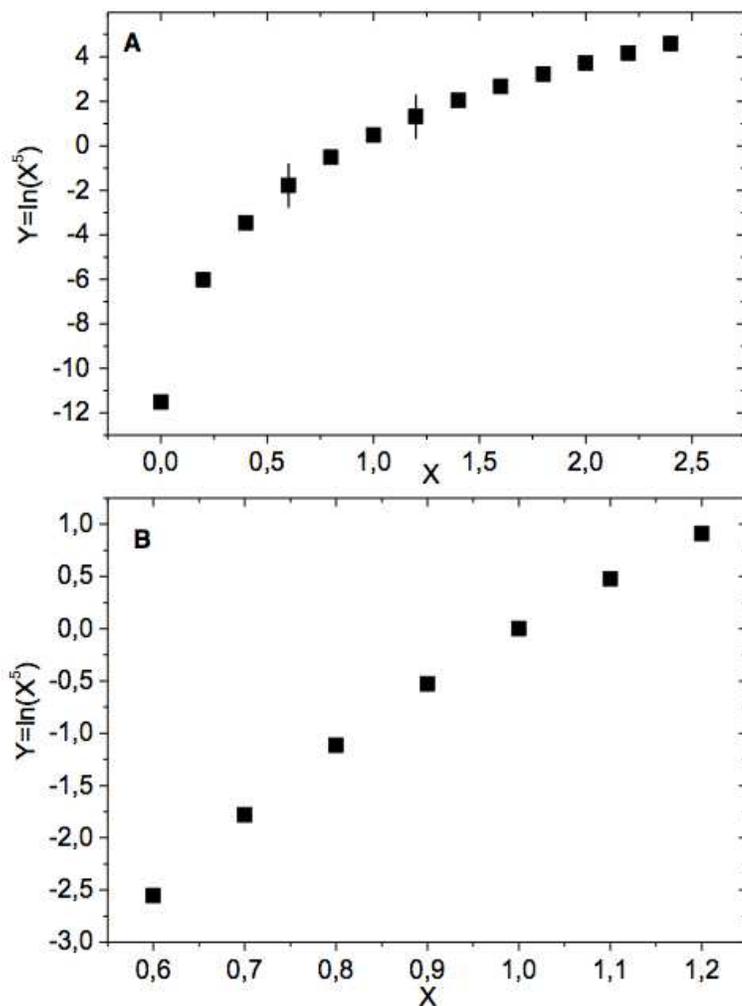


Figura 12 – Uma função hipotética mostrando a dependência logarítmica a partir de um longo intervalo de variação (a) e um curto intervalo (b).

A respeito da variação do ΔG^0 de desnaturação com a concentração de desnaturante, Schellman (1987) foi bastante afirmativo em dizer que o parâmetro m resultante desta abordagem empírica pode sofrer alterações com a variação da concentração de desnaturante, o que pode ser interpretado com uma dependência não-linear. Além disso, as curvas de

desnaturação de algumas proteínas globulares, em determinados pHs, quando induzidas, por exemplo, por temperaturas maiores e GuHCL como efetores desnaturantes agindo conjuntamente, podem apresentar um padrão acentuadamente não linear (Schellman, 1987; Ferreon & Bolen, 2004; Kokubo et al., 2007).

A Tab. 2 a seguir traz os valores de ν para a proteína BSA, os coeficientes calculados a partir das curvas de variação de $\Delta G_{[U],p}$ versus $\ln[U]$ e da Eq. 4. Na abordagem proposta, o ν corresponde a taxa de variação $\frac{d(\Delta G_{[U]}^{\circ})}{d(\ln[U])}$ e é interpretado como uma quantidade aparente de ureia que interage com a proteína BSA, a denominada estequiometria aparente. São mostrados valores de ν em diferentes condições de pressão e em dois intervalos de concentração de ureia, “1” e “2”, entre 3,5 a 8,0 M.

Intervalo	Parâmetro	Pressão (MPa)					
		0	50	100	150	200	250
1	$\frac{d(\Delta G_{[U]}^{\circ})}{d(\ln[U])}$	-4,09	-5,49	-8,52	-9,14	-10,42	-10,44
		-	-	-	-		
2	$\frac{d(\Delta G_{[U]}^{\circ})}{d(\ln[U])}$	16,38	13,04	11,00	10,47	4,25	4,26
		1,67	2,24	3,66	3,91		
1	ν_1	1,67	2,24	3,66	3,91	4,25	4,26
2	ν_2	6,68	5,32	4,89	4,27		

Tabela 2 – Taxa de variação $\frac{d(\Delta G_{[U]}^{\circ})}{d(\ln[U])}$ correspondente à inclinação das diferentes retas obtidas na Fig. 7, associados aos valores de estequiometria aparente de ureia (ν), em mol de ureia/mol do BSA, nas fases “1” e “2” de transição e nas respectivas pressões de 0 a 250 MPa.

Como apresentado no início deste tópico, em condições de pressões mais elevadas, o perfil de desnaturação refletiu uma transição mais acentuada entre os estados nativo e desnaturado. O que se verifica é uma tendência de convergência para valores únicos de coeficiente estequiométrico aparente da ureia na transição em pressões acima de 50 MPa.

Sobre a Tab. 1 apresentada, ainda acrescentam-se algumas observações. Nela, se tem um resumo dos valores de ν para a variedade de proteínas monoméricas estudadas, incluindo a BSA, igualmente representando os coeficientes calculados a partir das curvas do $\Delta G_{[U],p}$ versus $\ln[U]$ e Eq. 4. No Anexo I é representado o trabalho de obtenção de alguns dos resultados de parâmetro m e ν a partir dos dados espectroscópicos. O caráter bifásico para BSA à pressão atmosférica se mostrou em concordância com os diferentes valores do parâmetro m (Fig. 7 e Tab. 1) e sugeriu a ocorrência de maior cooperatividade em concentrações mais elevadas de ureia. Igualmente, em razão de que os dados da desnaturação da BSA que originaram os valores de ν foram os mesmos utilizados para calcular os valores de m , o nível de precisão da estequiometria obtida pode ser, do mesmo modo, considerado substancialmente aprimorado com relação ao das outras proteínas. O comportamento bifásico do ν também foi observado para demais monômeros. De modo geral, os valores ν_1 variaram entre 1 e 4 mol de ureia/mol de proteína enquanto os valores de ν_2 variaram entre 4 e 13 mol de ureia/mol de proteína. Aquelas proteínas que apresentaram apenas um valor de ν tiveram estes valores obtidos entre 5 e 15 mol de ureia/mol de proteína.

A seguir, os valores correspondentes de $\Delta\Delta G_{[U]}^0$ de desnaturação calculados a partir da Eq. 4 (Tab. 3) são apresentados e se mostraram semelhantes aos relatados originalmente na literatura.

Proteína	$\Delta\Delta G_{[U]}^0$ Calculado (kJ/mol de Proteína)	$\Delta\Delta G_{[U]}^0$ Literatura* (kJ/mol de Proteína)
BSA (presente estudo)	7,5	7,6
HSA	10,4	11,6
FKBP	23,6	24,2
RNase T₁	20,7	20,9
RNase Ba (pH7)	36,2	36,5
RNase Ba (pH3)	22,0	20,5
RNase Sa	22,9	24,2
RNase Sa₂	15,1	13,8
RNase Sa₃	21,7	22,1
β-Tripsina	23,2	21,7
IL-1Ra	27,1	28,5
β-Lactoglobulina	16,4	18,3
Citocromo c	26,1	28,7
Lisozima	22,2	24,3
Transtiretina	15,9	16,0

Tabela 3 - Valores totais de $\Delta\Delta G_{[U]}^0$ de desnaturação determinados pela metodologia para os diferentes monômeros a partir de seus dados espectroscópicos e os valores de $\Delta\Delta G_{[U]}^0$ originalmente descritos na literatura. * Referências apresentadas na Tab. 1.

Outro ponto que merece análise vem a ser a correlação existente entre o coeficiente estequiométrico aparente e os valores de parâmetro m calculados (Tab.1 e Fig 13). A exceção ocorre para a RNase Ba (pH 3) e RNase Sa2, cujos valores de m se apresentam muito elevados. A causa identificada de tal comportamento é a própria relação estabelecida entre m e ν representada pela variação de $([U])$ em função de $(\ln[U])$. É esperado que em medições em baixas concentrações de ureia, mais precisamente em valores menores que 1 M, o processo de desnaturação devido aos acréscimos de concentração de ureia forneça cada vez mais maiores valores de m . Os potenciais erros decorrentes de se trabalhar uma informação do perfil de desnaturação neste intervalo de concentração de ureia podem ser grandes.

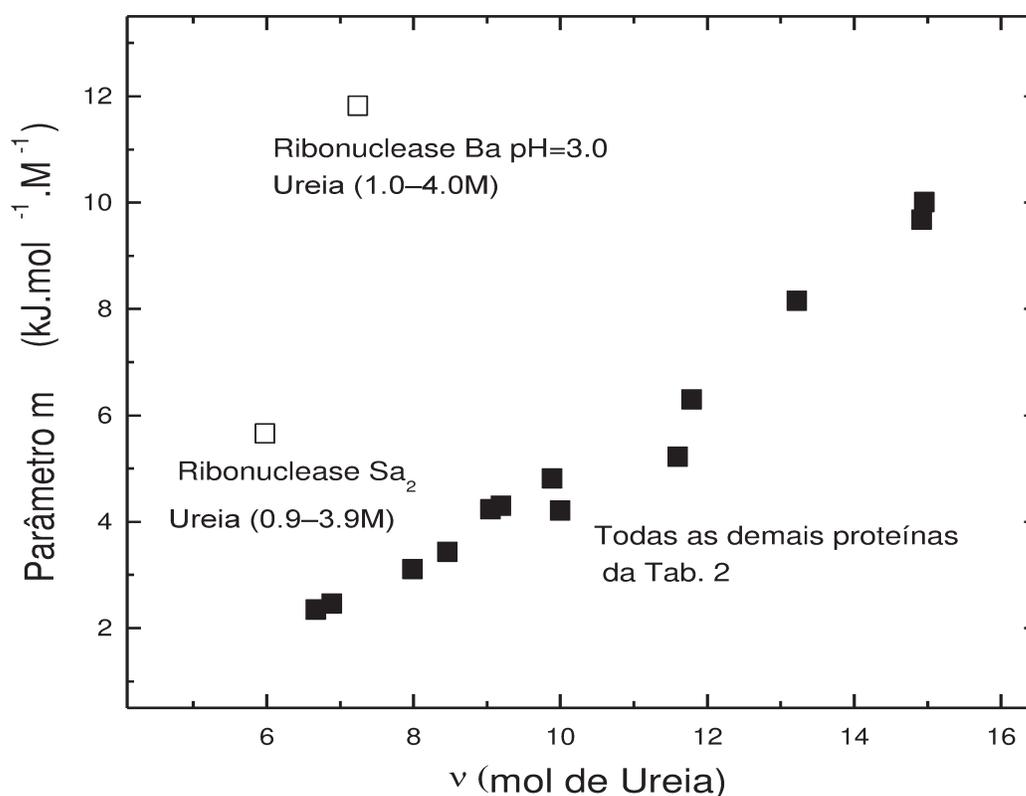


Figura 13 - Correlação entre o coeficiente estequiométrico aparente ν e os valores de parâmetro m calculados (Tab. 1).

Abordagens sobre a estequiometria aparente com base na relação $\Delta G_{[U],p}$ versus $\ln[U]$ não são amplamente utilizadas, como mencionado, devido aos baixos valores sistematicamente obtidos a partir da inclinação da reta resultante. Uma explicação para tal constatação inclui uma forte interação proteína-ureia que se esperaria de apenas algumas poucas moléculas (alguns mols de desnaturante) consideradas como sendo responsáveis pelo processo de desnaturação (Greene & Pace, 1974), tal como referido na Introdução. Em contraste aos valores geralmente baixos calculados para ν , veremos que podemos obter valores maiores que 100 no processo de transição se considerarmos a presença da heterogeneidade, característica implícita ao estado desnaturado das proteínas. O perfil bifásico para BSA e várias outras proteínas (Tab. 1) também será discutido adiante.

Populações heterogêneas

Do ponto de vista da formação de espécies intermediárias, sua própria existência, em princípio, não romperia com a característica de linearidade da curva de $\Delta G_{[U],p}$ versus $\ln[U]$. A despeito dos aspectos de não idealidade envolvidos num conjunto de interações entre ligantes tais como as existentes entre as moléculas de soro albumina (A) e a ureia (U), um suposto equilíbrio com duas estequiometrias aparentes numa sequência de reações, com constantes de equilíbrio K_1 e K_2 , como no esboço das Eqs. (10) e (11), corresponderia, mesmo assim, à apenas uma reação com estequiometria aparente resultante do produto $K_1.K_2$



Assim, se partiu para explicações alternativas que pudessem descrever a curva bifásica obtida. Com uma combinação contendo 84,4% de espécies com $\ln K = -13,22$ e 15,6% das espécies com $\ln K = 0,57$ (Fig. 14, destaque superior) foi possível obter o ajuste da curva experimental (Fig. 14) com valores de 1,65 e 6,67, respectivamente para ν_1 e ν_2 , considerando, deste modo, a possibilidade da ocorrência de uma heterogeneidade populacional em relação à energia livre de desnaturação. Com respeito às estequiometrias aparentes, foram então feitas algumas considerações, tais como a de uma população heterogênea com um valor de coeficiente estequiométrico muito maior. Para isso, a abordagem conceitual procurou balisamento na teoria vigente. Ela postula que no estado desnaturado as proteínas tendem a ter maior área de superfície exposta ao solvente e conseqüentemente um maior número de sítios de ligação (Greene & Pace, 1974). Nesta configuração, estudos anteriores ainda revelaram vários aspectos da interação proteína-ureia, como por exemplo, o efeito solubilizador da ureia em interação com os grupos apolares da cadeia peptídica, a formação de fracas ligações de hidrogênio, e ainda o interfaceamento da molécula de água com as regiões confinadas do núcleo hidrofóbico das proteínas (Stumpe et al., 2007). Interpretando que o $\Delta G_{[U]}^\circ$ de desnaturação para a transição de denaturação de 3,5 a 8 M de ureia se situe em torno 7,0 kJ/mol de proteína, o que vem a ser um padrão de estabilidade da forma nativa comparável ao da BSA neste estudo, e ainda que a partir de curvas de desnaturação por solvente se pode estimar uma energia média de interação entre as moléculas de proteína e ureia em torno de 50 J/mol de ureia, um número total de moléculas de ureia (teórico, simbolizado aqui por ν^*) a ser considerado para as simulações convergiria a um valor de 140 mol/mol de proteína. Partindo deste número, foi então examinada a distribuição de $\Delta G_{[U]}^\circ$ e $\ln K$ para 14 espécies (Fig. 14, destaque inferior, e Tab. 4).

A curva resultante foi ajustada à curva experimental subestimando, consistentemente com o esperado, os valores experimentais para a estequiometria aparente (Fig. 14). Para quatro das espécies não foi considerada nenhuma contribuição (ocorrência fracionária igual a 0%) e um número total efetivo resultante vem a ser o de 10

populações distintas. Com base na curva original (Fig. 7, Patm), também foi investigado o número mínimo de populações diferentes de BSA em valores crescentes de ν .

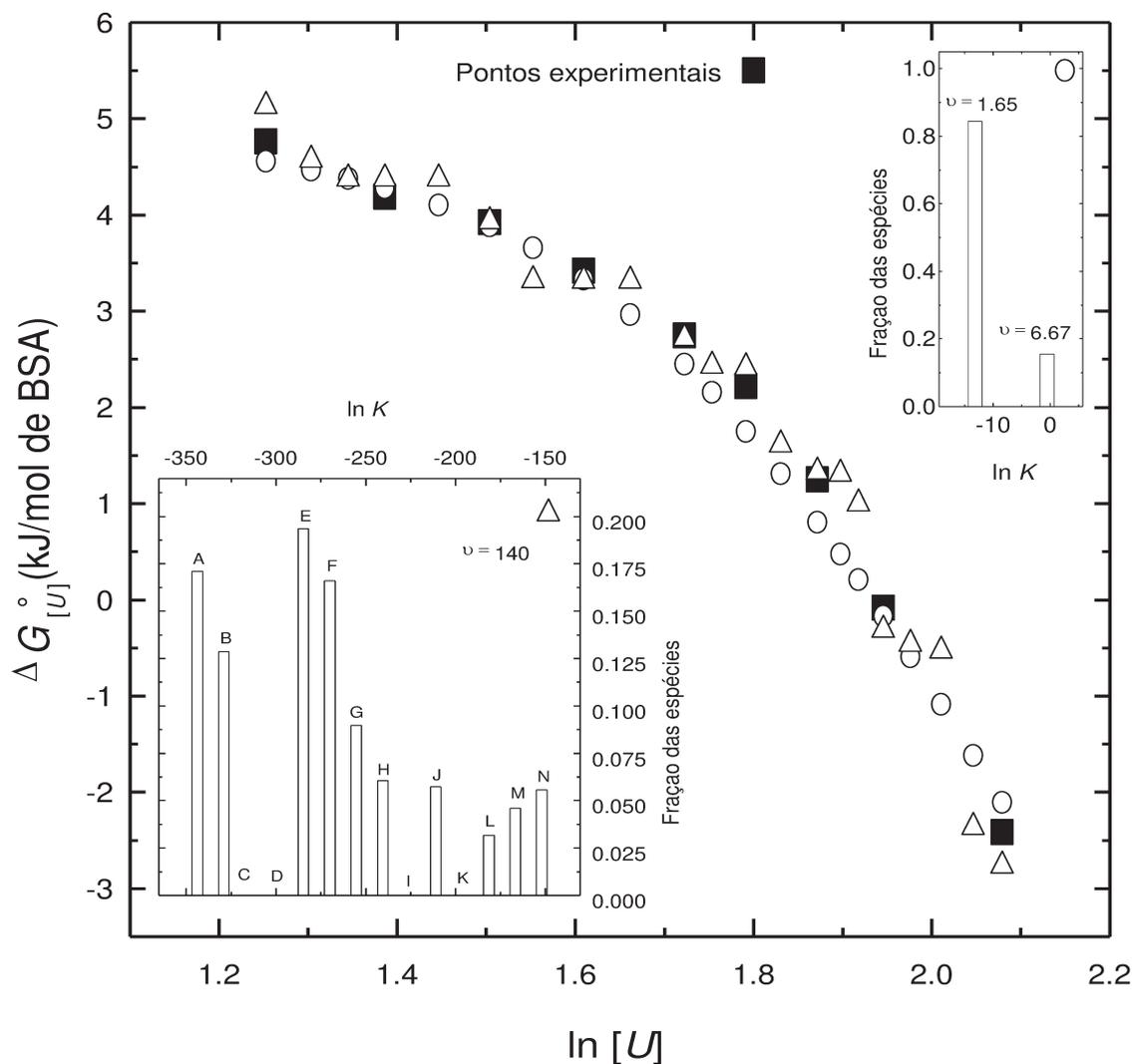


Figura 14 - Comparação dos pontos experimentais (quadrados preenchidos) com as curvas teóricas para a desnaturação da BSA a partir de duas populações com diferentes coeficientes estequiométricos aparentes de ureia: 1,65 (para população com a ocorrência de 15,6%) e 6,67 (para população com a ocorrência de 84,4%), mol de ureia/mol de BSA (círculos abertos), e por dez populações, com um coeficiente estequiométrico aparente de ureia: 140 mol de ureia / mol de BSA (triângulos abertos). As respectivas distribuições de espécies para cada população, de acordo com as constantes de desnaturação, são mostrados nos detalhes das figuras de inserção superiores e inferiores, respectivamente.

Os dados experimentais para a energia livre de desnaturação à pressão atmosférica como função de $\ln[U]$, mostrados na Fig. 14 são os determinados a partir das curvas $\ln K$ versus pressão P da Fig. 6.

Espécie	$\ln K$	Ocorrência relativa	Espécie	$\ln K$	Ocorrência relativa
A	-343,80	0,1709	H	-240,55	0,06064
B	-329,05	0,12864	I	-225,80	0
C	-314,30	0	J	-211,05	0,05727
D	-299,55	0	K	-196,30	0
E	-284,80	0,19357	L	-181,55	0,03155
F	-270,05	0,166	M	-166,80	0,04594
G	-255,30	0,08974	N	-152,05	0,05574

Tabela 4 – Distribuição das 10 diferentes espécies da proteína para a energia livre de desnaturação mostrada na Fig. 14. Aqui, $\ln K = -343,80 + 14,75 n$, onde n varia de 0 a 13, correspondendo às espécies de A a N.

Os coeficientes angulares das curvas obtidas (determinados usando a Eq. 4) produziram os valores aparentes relacionados à desnaturação de ureia: 1,68 e 6,67 mol de ureia/mol de BSA, para cada parte da curva. É interessante observar que processos independentes que envolvem uma combinação de reações e equações podem também produzir curvas semelhantes às obtidas experimentalmente. A combinação de processos individuais numa reação global geraria uma constante de desnaturação igualmente global, e essa constante refletiria a soma de uma série de valores individuais fornecendo um único valor de coeficiente estequiométrico aparente ν .

Como mostrado na figura a seguir (Fig. 15), houve convergência para o número de espécies de BSA, refletindo valores mais elevados de estequiometria aparente de ureia.

Para valores de ν^* em torno de 100 mols de ureia por mol de BSA, há indicação de que uma população de em torno de 14 diferentes espécies se justificaria.

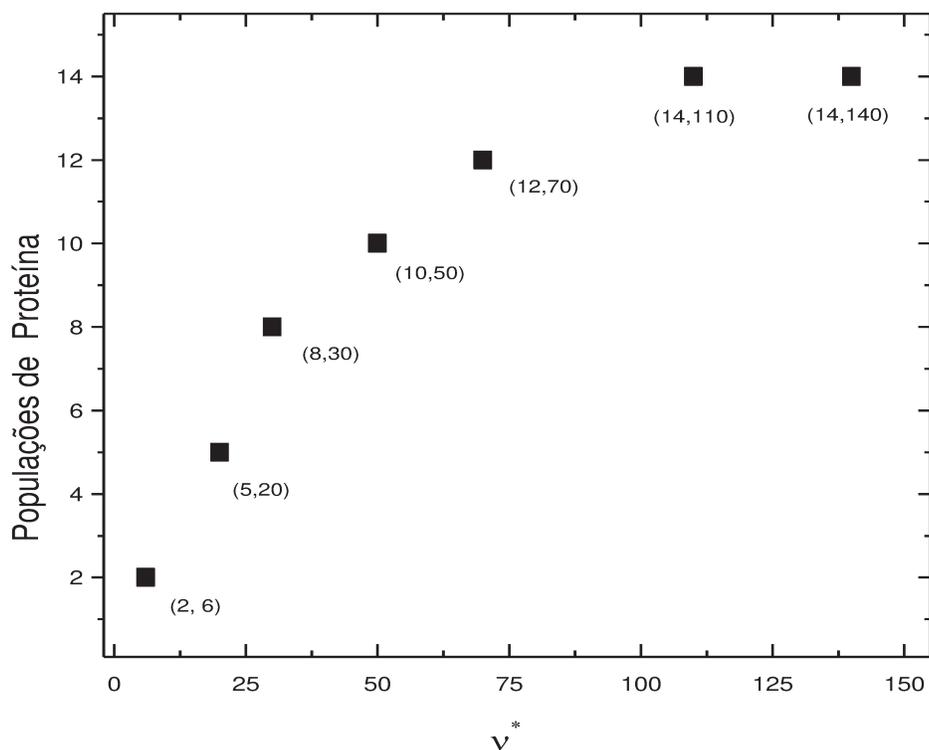


Figura 15 – Populações de proteína em relação às estequiometrias de ureia dos cálculos a partir das simulações teóricas realizadas em diferentes curvas para a desnaturação da BSA.

Geralmente, não é esperada uma significativa heterogeneidade para proteínas nativas. No entanto, isso não é verdade para a conformação desnaturada. Isso é devido, sobretudo, à sua maior flexibilidade, com a presença não uniforme de resíduos de prolina cis e trans na cadeia do polipeptídeo, o que faz com que o estado desnaturado não venha a ser tão bem definido (Creighton, 1988). Tal situação poderia explicar uma possível heterogeneidade com relação aos dados observados para a desnaturação da BSA, pois a molécula possui 28 resíduos de prolina na sua estrutura primária. A discussão é então aprofundada a seguir.

Estados nativo e desnaturado

A conformação nativa enovelada pode ser classificada como possuindo uma configuração única, resolvida em detalhes através de sua estrutura cristalizada. Tal conformação possui um certo grau de flexibilidade, podendo em geral ser entendida como um macro estado obtido de um número finito de micro estados. Por outro lado, o estado desnaturado de uma proteína apresenta como importante propriedade sua enorme heterogeneidade e uma quantidade amplamente maior de micro estados na sua conformação, comparativamente à proteína no seu estado nativo (Weber & Dickamer, 1983). Idealmente, a proteína completamente desnaturada, como por exemplo na presença de altas concentrações molares de ureia e sob alta pressão, possui conformação denominada “random coil”, ou seja, aquela na qual a rotação sobre cada ligação química da cadeia polipeptídica é independente de todas as outras ligações, sendo determinada apenas pela estereoquímica local da cadeia (Ferreon et al., 2004). Tal fato exigiria que os contatos fossem estritamente balanceados pelas interações entre o polipeptídeo adjacente e o solvente, no caso, a solução aquosa de ureia (Pace, 1986; Egan et al., 1993). Acontece que há um número grande de conformações possíveis que possam estar presentes em qualquer proteína em seu estado desnaturado e, a esse respeito, a interpretação das observações experimentais sobre o processo de desnaturação considera a existência de uma população heterogênea. O fenômeno da heterogeneidade na conformação desnaturada é fortemente atribuído à mistura de moléculas com isômeros cis e trans de cada ligação de peptídeo que precede um resíduo de prolina (Brandts et al., 1975). Na forma nativa, cada ligação deste tipo é cis ou trans em essencialmente todas as moléculas, enquanto que no estado desnaturado, há um equilíbrio entre estes isômeros que constitui a população heterogênea, tal que é intuitivo pensar que devam existir diferentes caminhos pelos quais as proteínas verdadeiramente se enovelam ou se desnaturam. A maior compreensão sobre estes caminhos nos traz informações sobre como uma conformação nativa enovelada pode ser prevista, estimada, manipulada e simulada, contribuindo com futuras investigações na área de bioquímica de proteínas, com crescente potencial de convergência biotecnológica e biomédica.

Análise complementar: resultados para a SNase

O total de interações de uma proteína com o solvente deve ser entendido como formado de um grande número de pequenas interações envolvendo toda sua diversificada superfície, constituída de grupos polares, apolares, aromáticos e alifáticos (Schellman, 1994). Diante deste mosaico químico que se constitui a molécula protéica, ganha importância o aprofundamento na comparação realizada dos dados obtidos experimentalmente com as informações sobre as proteínas monoméricas da literatura. O valor médio do peso molecular dos monômeros da Tab. 1 é em torno 14,7 kDa. Do ponto de vista de suas dimensões, se analisarmos o peso molecular da BSA, molécula utilizada como modelo deste estudo, de em torno de 65 kDa, notamos que se trata de uma proteína com peso molecular consideravelmente superior a este valor médio. Ainda, a distribuição destes valores se situa toda abaixo de 19 kDa. Outro aspecto é com relação ao $\Delta\Delta G_{[U]}^0$ de desnaturação. A amplitude média destes valores para os monômeros analisados é de em torno de 19,9 kJ/mol de proteína, um valor quase 3 vezes maior que o da BSA, que é de 7,5 kJ/mol de proteína. Tais diferenças sugeriram a busca por um conjunto de dados complementares que permitissem uma comparação um pouco mais direta com as informações da Tab. 1 e uma posterior análise de eventuais pontos de tensão na abordagem conceitual proposta. Pensou-se num sistema que viesse a possibilitar, futuramente, uma modulação energética e conformacional e que possuísse uma determinada plasticidade para correlações sobre a aplicação da abordagem da heterogeneidade observada para a BSA.

O conjunto de mutantes da proteína monomérica nuclease *Staphylococcal* (SNase), de peso molecular de 16 kDa, há anos vem sendo estudado pelas equipes da Dra. Catherine A. Royer e do Dr. Bertrand Garcia-Moreno, havendo, assim, uma quantidade significativa de informação sobre estes sistemas, passíveis de cruzamentos. Diante disso, em meu período de estágio de doutorado no CBS, foi realizado um estudo termodinâmico complementar do processo de desnaturação a partir do mutante Δ +PHS I92A da SNase em presença de pressão e GuHCl como agente desnaturante. A SNase possui massa molecular, tamanho e níveis de estabilidade mais próximos aos das proteínas monoméricas obtidas da literatura para estudo comparativo realizado com a

BSA. Foram conduzidos estudos de desnaturação sob pressão de até 300 MPa da proteína na presença de GuHCl e obtidos alguns primeiros parâmetros termodinâmicos tais como o ΔG , ΔV , o parâmetro m e coeficiente estequiométrico aparente ν para a proteína. O agente desnaturante GuHCl apresenta as mesmas características caotrópicas da ureia, apenas com um poder desnaturante em média 2 vezes maior.

O variante I92A fora produzido a partir da versão hiperestável da Δ +PHS da SNase, comparável à versão “wild type” desta molécula, com o objetivo de se criar cavidades no interior da proteína. A SNase Δ +PHS I92A possui substituições do resíduo Ile (I), pertencente originalmente ao seu núcleo hidrofóbico na posição 92 da sequência, por Ala (A), igualmente apolar mas de menor dimensão. Igualmente à BSA, a monitorização da desnaturação foi realizada a partir do seu Trp. São apresentados os perfis de desnaturação da SNase, Figs. 16(a) e (b) e 17, onde se observam os efeitos da pressão e do GuHCl sobre os espectros de emissão de fluorescência do Trp e sobre o centro de massa, respectivamente. Os dados são representados sem a normalização trabalhada para a BSA e se nota claramente a diminuição da intensidade de fluorescência com os aumentos de pressão, resultado atribuído principalmente à presença de um número muito grande de grupos supressores presentes próximos ao fluoróforo Trp-105. Tal consequência efetivamente não traz impacto ao desvio para o vermelho obtido (Royer et al., 2006). Verifica-se também que as linhas de base se apresentam melhor definidas, especialmente nas concentrações de 1,4 e 1,6 M de GuHCl e no extremo superior de pressão 300 MPa. A definição de platôs mais estáveis permitiram que estes registros obtidos pudessem ser em seguida tratados, igualmente à luz do modelo de dois estados, diretamente pelo programa BioEQS (Royer et al., 1992; Rosales & Royer C.A., 2008), um algoritmo que aproxima e fornece mais diretamente resultados de parâmetros termodinâmicos de estabilidade da proteína, tais como m e $\Delta G_{[D]}^0$.

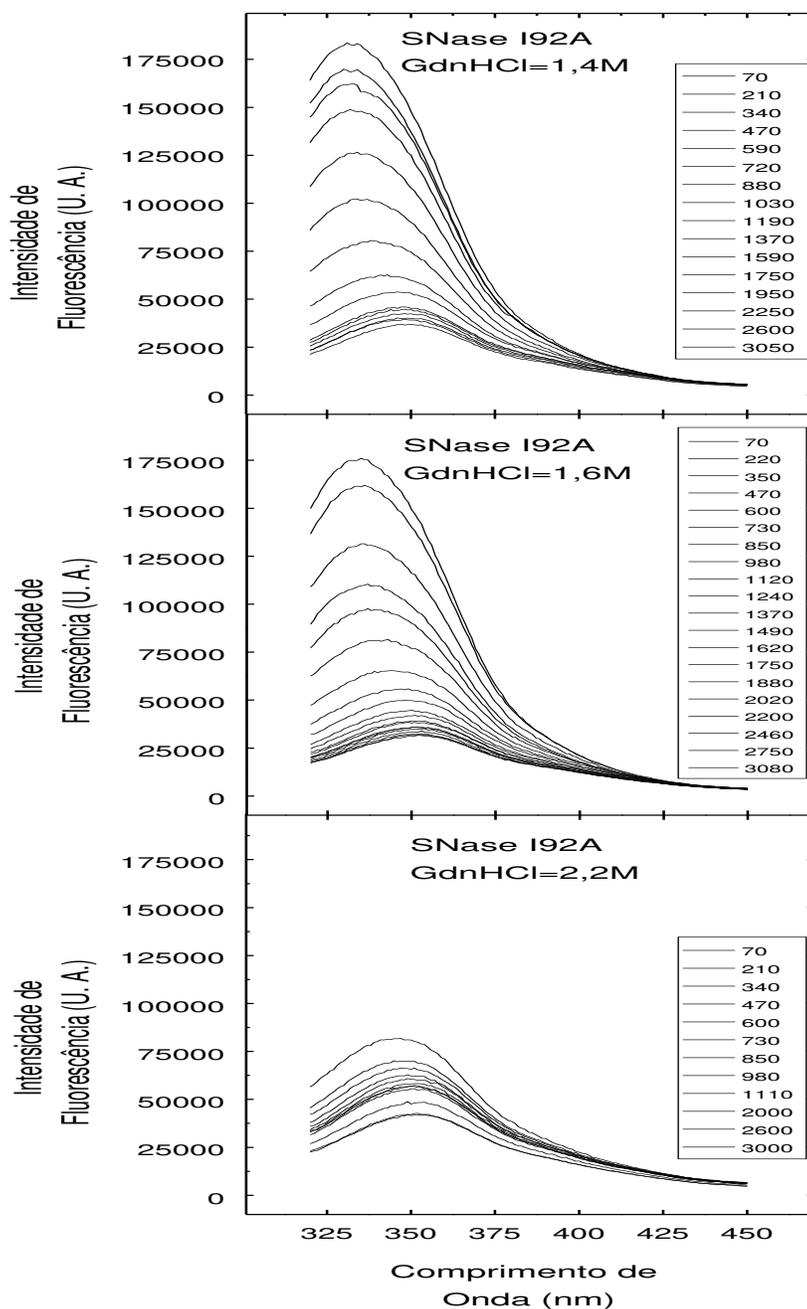


Figura 16 - Evolução dos espectros de emissão de fluorescência do triptofano na SNase Δ +PHS I92A em concentrações de GuHCl 1,4 M, 1,6 M e 2,2 M e em pressões até 3000 Bar (300 MPa). Valores expressos em comprimento de onda (nm). Cada espectro foi obtido sob excitação em 280 nm e a emissão registrada foi entre 320-450 nm. A cada pressão, foram obtidos os dados após incubação de 40 minutos. A concentração de SNase I92A foi de 100 μ M em 50 mmol/L de tampão Tris-HCl, pH 7,0 e temperatura de 18 $^{\circ}$ C.

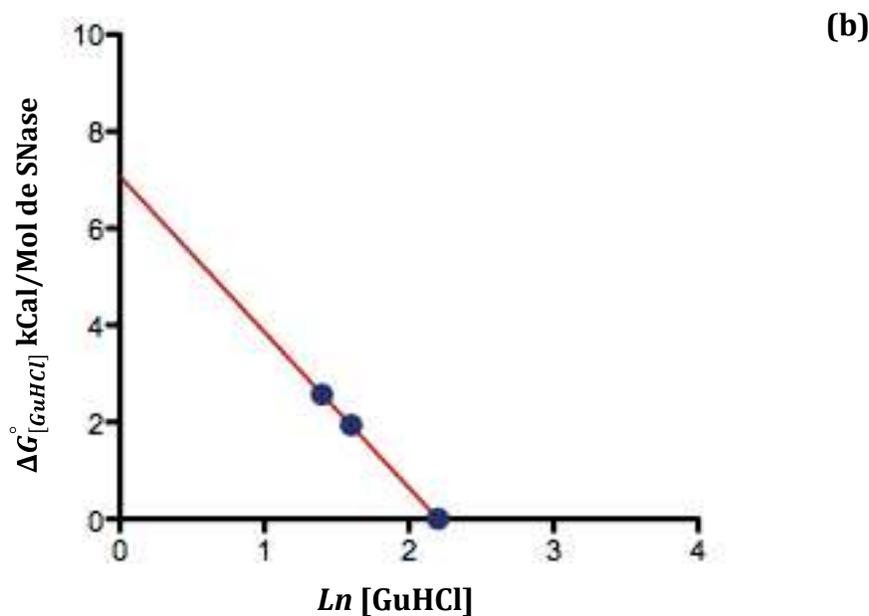
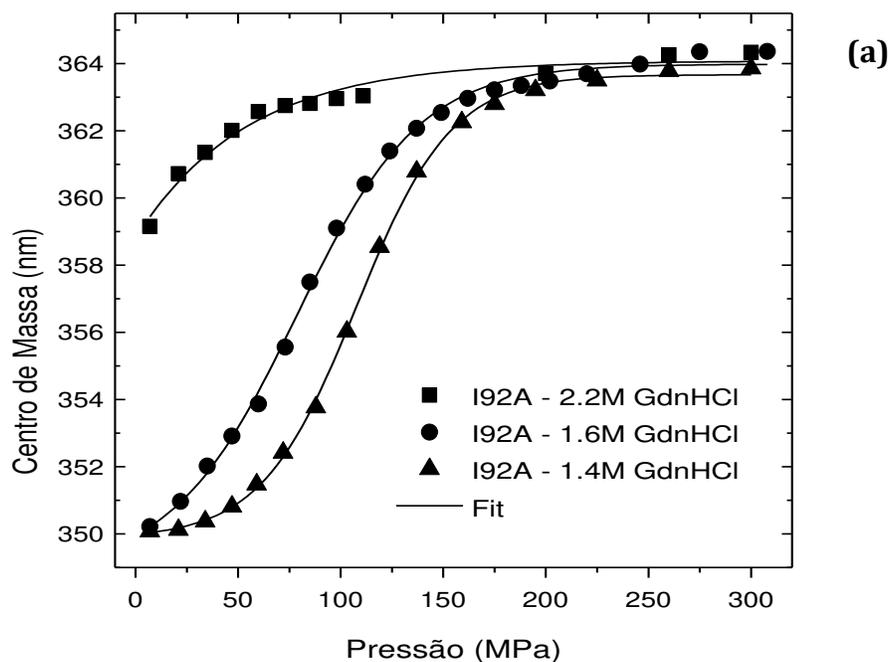


Figura 17 (a) - Representação do efeito da pressão e GuHCl sobre o centro de massa do espectro de emissão de fluorescência (em comprimento de onda) da SNase Δ +PHS I92A. (b) - Efeito da concentração do GuHCl sobre a energia livre de Gibbs de desnaturação da SNase Δ +PHS I92A. Curvas obtidas a partir dos dados experimentais com base nos dados da figura 16 e em utilização do programa BioEQS.

O resultado na curva de $\Delta G_{[GuHCl],p}$ versus $\ln[GuHCl]$ fornece valores calculados para o parâmetro m de $4,1 \text{ kJ/mol}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ e coeficiente ν de $8,2 \text{ mol de GuHCl/mol de SNase } \Delta\text{+PHS I92A}$. De um modo geral, o estudo conduziu a resultados de ΔG de desnaturação de em torno de $+31 \text{ kJ/mol de proteína}$ e de ΔV entre -58 e $-89 \text{ ml/mol de proteína}$, valores que demonstram alta estabilidade da estrutura nativa, em comparação aos resultados de BSA. São mostradas apenas as três primeiras concentrações trabalhadas. Apenas com o prosseguimento da obtenção destes valores, trabalhando-se em um maior intervalo de concentração da GuHCL, é que se permitiria inferir sobre um carácter predominantemente bifásico ou monofásico, mas, de forma interessante, já se verificam valores bastante compatíveis com a magnitude dos resultados obtidos para BSA e que são apresentados na Tab. 1, destacando assim a precisão trabalhada que balizou as simulações sobre a heterogeneidade.

Uma panorama interessante que se estabelece em relação a estes resultados obtidos é a possibilidade de análise dos dados cristalográficos da molécula de SNase conjuntamente com simulações de dinâmica molecular (MD), através do programa McVol (Till & Ullmann, 2009). Neste contexto, pode ser possível simular a heterogeneidade da abordagem aqui proposta e posteriormente realizar o cruzamento de dados com a vasta literatura existente. Tais estudos podem permitir, por exemplo, a visualização das moléculas de água que venham a circundar a estrutura da SNase, em suas cavidades, a partir de simulações de minimização e maximização de energia sob acréscimos de pressão e que ocorrem durante a transição de desnaturação (Schuler, 2002). Numa análise mais detalhada, e que consta de um manuscrito em preparação junto ao grupo do CBS, se pretende demonstrar que a substituição de um simples aminoácido como a Ile em posição crítica de seu centro hidrofóbico pode resultar em drástica alteração do grau de hidratação do seu denominado conjunto de estado de transição (TSE). Melhor aprofundamento ainda vem sendo feito na interpretação destes resultados, com o estudo junto a outros mutantes da SNase e, muito embora os dados ainda não sejam conclusivos em relação à heterogeneidade, demonstram ser bastante promissores no sentido de se quantificar um ν do agente desnaturante num processo de desnaturação de proteínas que envolve aspectos simuláveis por MD.

Demais possibilidades. Algumas perspectivas a partir de outras técnicas biofísicas

A passagem do estado nativo da proteína para sua conformação desnaturada implica mudanças estruturais que podem auxiliar a elucidar o mecanismo do desenovelamento. Assim, passa a ser muito informativo o estudo da dinâmica conformacional do processo de desnaturação. Essa parte deste trabalho sobre a BSA estuda algumas perspectivas relacionadas ao tema.

Uma alternativa que vem sendo recentemente viabilizada, e que pode ter um estudo mais aprofundado para possível aplicação, vem a ser o uso das técnicas de detecção de moléculas individuais (SMD), que permitem obter detalhes originalmente não totalmente acessíveis à utilização isolada de técnicas mais convencionais de detecção, como no caso do uso de métodos baseados no estado estacionário. Pode ser possível detectar os diferentes passos da transição de um estado ao outro da proteína, o surgimento de mecanismos múltiplos e a acumulação de conformações protéicas com pequenas quantidades ou tempos de vida curtos (Haustein & Schwille, 2004). Nesse sentido, uma extensão interessante à tese pode vir a ser o estudo da dinâmica de desnaturação de proteínas monoméricas utilizando as técnicas de fluorescência temporal. Do mesmo modo, se vislumbra a possibilidade de se caracterizar a heterogeneidade da transição em diferentes concentrações de agentes desnaturantes, como aqui proposto, mas também em condições de interações com prótons, variando-se o pH da solução. Pode-se assim obter um aumento dos níveis de certeza quanto à abordagem adotada para a BSA. No caso das técnicas de SMD, um microscópio de excitação a laser alternante (ALEX), de alta resolução temporal, pode ser utilizado em combinação com a detecção de transferência de energia de fluorescência (FRET). Após a fixação de elementos fluoróforos à proteína (extrínsecos), é medida a eficiência da transferência de energia entre o par de fluoróforos doador e receptor, onde o cálculo da distância entre os dois pode fornecer informação de resolução espacial sobre as mudanças de conformação das moléculas durante o processo de desnaturação (Deniz et al., 2000; Schuler et al., 2002; Saxena et al., 2008). Transformações na presença de desnaturante e em diferentes pHs também podem ser detectadas através de alterações em parâmetros tais como o raio hidrodinâmico da proteína e através das correspondentes mudanças no coeficiente de

difusão (Konstantin et al., 1999), com protocolos de investigação a partir da técnica de espectroscopia de correlação de fluorescência (FCS).

A partir de uma investigação com modelo de transição de multi-estados para as proteínas monoméricas, complementarmente aos estudos de alta pressão em modelo de transição de dois estados aqui desenvolvido, pode ser possível a caracterização das proteínas monoméricas com um nível de detalhe ainda maior.

CONCLUSÃO

O efeito da desnaturação induzida por pressão sobre a BSA foi estudado em diferentes concentrações de ureia e a combinação destes dois fatores intensificou o processo de transição entre os estados nativo e desnaturado. Os resultados para a desnaturação da BSA sob diferentes pressões em concentrações subdesnaturantes de ureia puderam ser extrapolados para a pressão atmosférica e foram capazes de fornecer maior precisão aos dados obtidos. Além disso, as curvas de $\Delta G_{[U]}^0$ versus $\ln[U]$ no modelo proposto puderam ser facilmente comparadas com o modelo clássico de estudo da desnaturação a partir das curvas de $\Delta G_{[U]}^0$ versus $[U]$. Embora se tratando de uma proteína monomérica, foi verificado um carácter bifásico nas duas curvas obtidas, o que enfatiza as diferentes sensibilidades da proteína diante da ação da ureia, em etapas de baixa e alta concentração deste solvente, e a ocorrência de heterogeneidade. Tal natureza monomérica da BSA e a magnitude das estequiometrias encontradas no processo de sua desnaturação demonstram mesmo existir uma interferência limitada da ureia e pressão sobre o processo de dissociação, anteriormente verificado em trabalho publicado pelo laboratório sobre o TMV, uma molécula oligomérica de dimensões muito maiores. O estudo comparativo da BSA com demais proteínas monoméricas descritas na literatura, e complementarmente com ensaios preliminares com a variante I92A do monômero SNase Δ +PHS, indica que a abordagem aqui utilizada pode vir a ter aplicação ao estudo das interações solvente-proteína. A investigação dos efeitos de variação de pH pode adicionalmente melhorar o entendimento sobre a desnaturação da BSA sob pressão e ureia. Um outro ponto é que a

heterogeneidade que explica os resultados quantitativos das curvas de desnaturação da proteína vem a ser suscetível à análises posteriores através de técnicas especiais de fluorescência, a partir de adequações quanto a escala de tempo do fenômeno de transição, e de simulações por MD baseadas em algoritmos como por exemplo o MCVol.

Com uso apropriado, a abordagem utilizada para o estudo da desnaturação da BSA monomérica deve permitir uma melhor avaliação da energia livre e de diversos outros parâmetros termodinâmicos que podem ser controlados e assim permitir que se aprimore a compreensão a respeito dos mecanismos de desnaturação e da estabilidade em proteínas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmad, B., Khan, M.K.A., Haq, S.K., Khan, R.H. Intermediate formation at lower urea concentration in B isomer of human serum albumin: a case study using domain specific ligands. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004; 314:166-173.

Ahmad, B., Khan, R.H. Urea induced unfolding of f isomer of human serum albumin: a case study using multiple probes. *Arch. Biochem. Biophys.* 2005; 437: 159-167.

Akasaka, K., Li, H., Yamada, H., Li, R., Thoresen, T., Woodward, C.K. Pressure response of protein backbone structure. Pressure-induced amide ^{15}N chemical shifts in BPTI. *Prot. Sci.* 1999; 8:1946-1953.

Akasaka, K. & Li, H. A novel picture of protein from high pressure. *Tanpakushitsu Kakusan Koso.* 2001; 46(3):208-19.

Auton, M. & Bolen, D.W. Predicting the energetics of osmolyte-induced protein folding/unfolding. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2005; 102:15065-15068.

Babbes, A.R.H., Powers, E.T., Kelly, J.W. Quantification of the thermodynamically linked quaternary and tertiary structural stabilities of transthyretin and its disease-associated variants: the relationship between stability and amyloidosis. *Biochem.* 2008; 7: 6969-6984.

Barrick, D., Ferreira, D.U., Komives, E.A. Folding landscapes of ankyrin repeat proteins: experiments meet theory. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2008; 18:27-34.

Barrick, D. What have we learned from the studies of two-state folders, and what are the unanswered questions about two-state protein folding? *Phys. Biol.* 2009; 6: 1001-1015.

Baskakov, I.V. & Bolen, D.W. Monitoring the sizes of denatured ensembles of staphylococcal nuclease proteins: implications regarding m values, intermediates, and thermodynamics. *Biochem.* 1998; 37:18010-18017.

Baskakov, I.V. & Bolen, D.W. The paradox between m values and ΔC_p 's for denaturation of ribonuclease T1 with disulfide bonds intact and broken. *Prot. Sci.* 1999; 8:1314-1319.

Bismuto, E., Irace, G., Sirangelo, I., Gratton, E. Pressure-induced perturbation of ANS-apomyoglobin complex: frequency domain fluorescence studies on native and acidic compact states. *Protein Sci.* 1996; 5(1):121-126.

Bispo, J.A.C., Landini, G.F., Santos, J.L., Norberto, D.R., Bonafe, C.F. Tendency for oxidation of annelid hemoglobin at alkaline pH and dissociated states probed by redox titration. *Comp. Biochem. Physiol.* 2005; 141:498-504.

Bispo, J.A.C., Santos, J.L., Landini, G.F., Gonçalves, J.M., Bonafe, C.F.S. pH dependence of the dissociation of multimeric hemoglobin probed by high hydrostatic pressure. *Biophys. Chem.* 2007; 125:341-349.

Bonafe, C.F.S., Villas-Boas, M., Suarez, M.C., Silva, J.L. Reassembly of a large multisubunit protein promoted by nonprotein factors. Effects of calcium and glycerol on the association of extracellular hemoglobin. *J. Biol. Chem.* 1991; 266(20):13210-16.

Bonafe, C.F.S., Araújo, J.R., Silva, J.L. Intermediate states of assembly in the dissociation of gastropod hemocyanin by hydrostatic pressure. *Biochem.* 1994; 33(9):2651-60.

Bonafe, C.F.S., Vital, C.M.R., Telles, R.C.B., Gonçalves, M.C., Matsuura, M.S.A., Pessine, F.B.T, Freitas, D.R.C, Vega, J. Tobacco mosaic virus disassembly by high hydrostatic pressure in combination with urea and low temperature. *Biochem.* 1998; 37:11097-11105.

Bonafe, C.F.S., Glaser, M., Voss, E.W., Weber, G., Silva, J.L. Virus inactivation by anilino-naphthalene sulfonate compounds and comparison with other ligands. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000; 275:955-961.

Bonaventura, C. & Bonaventura, J. Preparation of high molecular weight invertebrate hemoglobins. *Meth. Enzymol.* 1981; 76(3):43-54.

Brandts, J.F., Oliveira, R.J., Westort, C. Thermodynamics of protein denaturation. Effect of pressure on the denaturation on ribonuclease A. *Biochem.*, 1970, 9 (4):1038-1047.

Bridgman, P.W. The coagulation of protein by pressure. *J. of Biol. Chem.*, 1914; 3:512-514.

Brumano, M.H., Oliveira, M.G. Urea-induced denaturation of beta-trypsin: an evidence for a molten globule state. *Prot. Pept. Lett.* 2004; 11:133-140.

Camilloni, C, Rocco, A.G., Eberini, I, Gianazza, E, Broglia, R.A., Tiana, G. Urea and guanidinium chloride denature protein L in different ways in molecular dynamics simulations. *Biophys. J.* 2008; 94:4654-4661.

Carra, J.H., Anderson, E.A., Privalov, P.L. Thermodynamics of staphylococcal nuclease denaturation. I. The acid-denatured state. *Prot. Sci.* 1994; 3:944-951.

Carter, D.C. & Ho, J.X. Structure of Serum Albumin. *Adv. Protein Chem.* 1994; 45; 153-203.

Casassa, E.F, Eisenberg, H. Thermodynamic analysis of multicomponent solutions. *Adv. Prot. Chem.* 1964; 19:287-395.

Caughey, B. & Lansbury, P.T. Protofibrils, pores, fibrils, and neuro degeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annu. Rev. Neurosci.* 2003; 26, 267-298.

Cioni, P. & Strambini, G.B. Pressure effects on the structure of oligomeric proteins prior to subunit dissociation. *J. Mol. Biol.* 1996; 263:789-799.

Creighton, T.E. Toward a better understanding of protein folding pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1988; 85:5082-5086.

Cooper, A. Thermodynamic fluctuations in protein molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1976; 73(8):2740–1.

Costa, M.C., Bonafe, C.F.S., Meirelles, N.C., Galembeck, F. Sedimentation coefficient and minimum molecular weight of extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* (Oligochaeta). *Braz. J. Med. Biol.* 1988; Res.21(1):115-8.

Courtenay, E.S., Capp, M.W., Saecker, R.M., Record, M.T Jr. Thermodynamic analysis of interactions between denaturants and protein surface exposed on unfolding: interpretation of urea and guanidinium chloride m-values and their correlation with changes in accessible surface area (ASA) using preferential interaction coefficients and the local bulk domain model. *Prot. Struct. Funct. Genet.* 2000; 41:72-85.

Courtenay, E.S., Capp, M.W., Record, M.T. Jr. Thermodynamics of interactions of urea and guanidinium salts with protein surface: Relationship between solute effects on protein processes and changes in water-accessible surface area. *Protein Sci.* 2001. 10:2485-2497.

Curl, A.L. & Jansen, E.F. Effect of high pressures on trypsin and chymotrypsin. *J. Biol. Chem.* 1950.184: 45-54.

Da Poian, A.T, Oliveira, A.C., Gaspar, L.P., Silva, J.L., Weber, G. Reversible pressure dissociation of R17 bacteriophage: the physical individuality of virus particles. *J. Mol. Biol.* 1993; 231:999-1008.

Da Poian, A.T., Johnson, J.E., Silva, J.L. Protein-RNA interactions and virus stability as probed by the dynamics of tryptophan side chains. *J.Biol.Chem.* 2002; 277(49):47596-602.

Dar, T.A., Singh, L.R., Islam, A., Anjum, F., Moosavi-Movahedi, A.A., Ahmad, F. Guanidinium chloride and urea denaturations of beta-lactoglobulin a at pH 2.0 and 25° C: the equilibrium intermediate contains non-native structures (helix, tryptophan and hydrophobic patches). *Biophys. Chem.* 2007; 127: 140-148.

Deniz, A.A. Single-molecule protein folding: Diffusion fluorescence resonance energy transfer studies of the denaturation of chymotrypsin inhibitor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2000; 5179-5184.

Eftink, M.R. & Ghiron, C.A. Exposure of tryptophanyl residues and protein dynamics. *Biochem.* 1977; 16 (25):5546-5551.

Egan, D.A., Logan, T.M., Liang, H., Matayoshi, E., Fesik, S.W., Holzman, T.F. Equilibrium denaturation of recombinant human FK binding protein in urea. *Biochem.* 1993; 32:1920-1927.

Farruggia, B., Picó, G.A. Thermodynamic features of the chemical and thermal denaturations of human serum albumin. *Int. J. Biol. Macromol.* 1999; 26:317-323

Ferreon, A.C & Bolen, D.W. Thermodynamics of denaturant-induced unfolding of a protein that exhibits variable two-state denaturation. *Biochem.* 2004; 43:13357-13369.

Foguel, D., Chaloub, R.M., Silva, J.L., Crofts, A.R., Weber, G. Pressure and low temperature effects on the fluorescence emission spectra and lifetimes of the photosynthetic components of cyanobacteria. *Biophys. J.* 1992; 63(6):1613-1622.

Foguel, D. & Silva, J.L. New insights into the mechanisms of protein misfolding and aggregation in amyloidogenic diseases derived from pressure studies. *Biochem.* 2004; 43(36):11361-70.

Foguel, D. High pressure studies on transthyretin. *Prot. Pept. Lett.* 2005; 12:245-249.

Greene, R.F. & Pace C.N. Urea and guanidine hydrochloride denaturation of ribonuclease, lysozyme, chymotrypsin, and β -lactoglobulin. *J. Biol. Chem.* 1974; 249:5388-5393.

Harmsen, B.J.M. & Braam, W.J.M. On the conformation of Bovine Serum Albumin after alkaline or thermal denaturation.. *Int. J. Protein Research.* 1988; 225-233.

Haustein, E. & Schwille, P. Single-molecule spectroscopic methods. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2004; 14:531-540.

Holowachuk, E.W. cDNA sequence of bovine preproalbumin. 1971; GeneBank Database Accession # M73993

Ho, G.H.B., McLean, M.A., Sligar, S.G. High pressure, a tool for exploring heme protein active sites. *Biochim. Biophys. Acta.* 2002; 1595:297-308.

Horwich, A. Protein aggregation in disease: a role for folding intermediates forming specific multimeric interactions, *J. Clin. Invest.* 2002; 110:1221-1232.

Khan, M.Y., Agarwal S.K., Hangloo, S. Urea-induced structural transformations in bovine serum albumin. *J Biochem.* 1987; 102:313-317.

King, J., Yu, M. H., Siddiqi, J., Haase, C. Genetic identification of amino acid sequence influencing protein folding. In "Protein Engineering: Application in Science, Medicine and Industry". 1986; (Inouye M. & Sarma, R. Eds.). Academic Press, Orlando.

Kita, Y., Arakawa, T., Lin, T.Y., Timasheff, S.N. Contribution of the surface free energy perturbation to protein-solvent interactions. *Biochem.* 1994; 33:15178-15189.

Kokubo, H., Rösgen, J., Bolen, D.W., Pettitt, B.M. Molecular basis of the apparent near ideality of urea solutions. *Biophys. J.* 2007; 93:3392-3407.

Kolthoff, I.M., Anastasi, A., Tan, B.H. Reactivity of sulfhydryl and disulfide in proteins. II. Reactive disulfide as related to viscosity and optical rotation in denatured Bovine Serum Albumin. *J. Am. Chem. Soc.* 1958; 80; 3235-3240.

Koch, M.H.J., Svergun, D.I., Richards, S., Sayers, Z., Kuprin, S., Zaccai, G. Protein hydration in solution: experimental observation by x-ray and neutron scattering. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1998; 95:2267-2272.

Konstantin, S., Buffle, J., Perez, E. Applications of fluorescence correlation spectroscopy: polydispersity measurements. *J. of Coll. Interf. Sci.* 1999. 213:479-487.

Kuwata, K., Li, H., Yamada, H. Locally disordered conformer of the hamster prion protein: a crucial intermediate to PRP^{Sc}? *Biochem.* 2002; 41:12277-12283.

Lakowicz, J.R. In "Principles of Fluorescence Spectroscopy". Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. 1999.

Latypov, R.F., Harvey T.S., Liu D., Bondarenko, P.V., Kohno, T., Fachini R.A., Rosenfeld, R.D., Ketchum, R.R., Brems, D.N., Raibekas, A.A. Biophysical characterization of structural properties and folding of interleukin-1 receptor antagonist. *J. Mol. Biol.* 2007; 368:1187-1201.

Luque, I., Leavitt, S., Freire, E. The linkage between protein folding and functional cooperativity: two sides of the same coin? *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 2002; 31:235-256.

Marchal, S., Torrent, J., Masson, P., Kornblatt, J. M., Tortora, P., Fusi, P., Lange, R., Balny, C. The powerful high pressure tool for protein conformational studies. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2005; 38(8):2333-2338.

Masson, P., Tonello, C., Balny, C. High-pressure biotechnology in medicine and pharmaceutical science. *J. Biomed. Biotech.* 2001; 1(2):85-88.

Mozhaev, V.V., Heremans, K., Frank, J. Masson, P., Balny, C. High pressure effects on protein structure and function. *Prot.* 1996; 24:81-91.

Neuman, R. C. Jr., Kauzmann, W., Zipp, A. Pressure dependence of weak acid ionization in aqueous buffers. *J. Phys. Chem.* 1973; 77, 2687-91.

Ohgushi, M. & Wada, A. Molten-globule state: a compact form of globular proteins with mobile side-chains. *FEBS Lett.* 1983; 164 (1):21-24.

Pace C.N. Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Meth. Enzymol.* 1986; 131:266-280.

Pace, C.N., Laurents, D.V., Erickson, R.E. Urea denaturation of barnase: pH dependence and characterization of the unfolded state. *Biochem.* 1992; 31: 2728 2734.

Pace, C.N. Conformational stability and thermodynamics of folding of ribonucleases Sa, Sa2 and Sa3. *J. Mol. Biol.* 1998; 279:271-286.

Paladini, A.A. & Weber, G. Absolute measurements of fluorescence polarization at high pressures. *Rev. Sci. Instrum.* 1981; 52:419-427.

Paladini, A.A. & Weber, G. Pressure-induced reversible dissociation of enolase. *Biochemistry.* 1981; 20(9):2587-93.

Prusiner, S.B. Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1998; 95:13363-13383

Rosales, T. & Royer C.A. A graphical user interface for bioEQS: a program for a simulation and analyzing complex biomolecular interactions. *Anal Biochemistry.* 2008. 381(2):270-2.

Royer, C.A. & Beechem, J.B. Numerical Analysis of Binding Data: Advantages, Practical Aspects, and Implications. *Meth. Enzimol.* 1992; (10):481-505.

Royer, C.A. Revisiting volume changes in pressure-induced protein unfolding. *Biochem. Biophys. Acta.* 2002; 1595:201-209.

Rouget, J.B., Schroer M. A., Jeworrek C., Puhse M., Saldana J., Bessin Y., Tolan M., Barrick D., Winter R., Royer C. A. Unique features of the folding landscape of a repeat protein revealed by pressure perturbation. *Biophys. J.* 2010; 2712-2721.

Ruan, K. & Weber, G. Hysteresis and conformational drift of pressure-dissociated glyceraldehydephosphate dehydrogenase. *Biochem.* 1989. 28(5):2144-53.

Ruan, K. & Weber, G. Physical heterogeneity of muscle glycogen phosphorylase revealed by hydrostatic pressure dissociation. *Biochem.* 1993; 32(24):6295-301.

Santos ,J.L.R, Aparicio, R, Joekes, I, Silva, J.L, Bispo, J.A.C, Bonafe C.F.S. Different urea stoichiometries between the dissociation and denaturation of tobacco mosaic virus as probed by hydrostatic pressure. *Biophys. Chem.* 2008; 134:214-224.

Santos, J.L.R, Bispo, J.A.C, Landini, G. F, Bonafe, C.F.S. Proton dependence of tobacco mosaic virus dissociation by pressure. *Biophys. Chem.* 2004; 111:53-61.

Saxena, A.M. Identification of intermediate species in protein-folding by quantitative analysis of amplitudes in time-domain fluorescence spectroscopy. *J. Chem. Sci.* 2007. 117(2):61-69.

Science, 2005, 309:78-102 - Editorial: So much more to know.

Schellman, J. Macromolecular binding. *Biopolymers.* 1975; 14:999-1018.

Schellman, J. Solvent denaturation. *Biopolymers.* 1978; 17:1305-1322.

Schellman, J. The thermodynamic stability of proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 1987; 16:115-137.

Schellman, J. Protein stability in mixed solvents: a balance of contact interaction and excluded volume. *Biophys. J.* 2003; 85:108-125.

Seemann, H., Winter, R., Royer, C.A. Volume, expansivity and isothermal compressibility changes associated with temperature and pressure unfolding of Staphylococcal nuclease. *J. Mol. Biol.* 2001; 307:1091-1102.

Sen, P., Ahmad, B., Khan, R.H. Formation of a molten globule like state in bovine serum albumin at alkaline pH. *Eur. Biophys. J.* 2008; (37):1303-1308.

Shiu, Y.J., Jeng, U.S., Huang, Y.S., Lai, Y.H., Lu, H.F., Liang, C.T., Hsu, I.J., Su, C.H., Su, C., Chao, I., Su, A.C., Lin, S.H. Global and local structural changes of cytochrome c and lysozyme characterized by a multigroup unfolding process. *Biophys J.* 2008; 94: 4828-4836.

Schroer, M.A., Paulus, M., Jeworrek, C., Krywka, C., Schmacke, S., Zhai, Y., Wieland, F., Sahle, C.J., Chimenti, M., Royer, C.A., Garcia-Moreno, B., Tolan, M., Winter, R. High-Pressure SAXS Study of Folded and Unfolded Ensembles of Proteins. *Biophys. J.* 2010; 99(10):3430-3437.

Schuler, B., Lipman, E.A.; Eaton, W.A. Probing the free-energy surface for protein folding with single-molecule fluorescence spectroscopy. *Nature.* 2002; 419. 743-747.

Silva, J. L., Miles, E. W., Weber, G. Pressure dissociation and conformational drift of the beta dimer of tryptophan synthase. *Biochem.* 1986; 25(19):5780-6.

Silva, J.L. & Weber, G. Pressure-induced dissociation of brome mosaic virus. *J. Mol. Biol.* 1988; 199(1):149-159.

Silva, J.L., Silveira, C.F., Pontes L. Dissociation of a native dimer to a molten globule monomer. Effects of pressure and dilution on the association equilibrium of arc repressor. *J. Mol. Biol.* 1992; 223:545-555.

Simpson, R. & Kauzmann, W. The kinetics of protein denaturation. 1. The behavior of the optical rotation of ovalbumin in urea solutions. *J. Am. Chem. Soc.* 1953; 75:5139-41.

Shortle, D., & Meeker, A.K. Mutant forms of staphylococcal nuclease with altered patterns of guanidine hydrochloride and urea denaturation. *Prot.* 1986; 1:81-89.

Steinhardt, J., Krijn, J., Leidy, J.G. Differences between bovine and human serum albumins: binding isotherms, optical rotatory dispersion, viscosity, hydrogen ion titration, and fluorescence effects. *Biochem.* 1971; 10(22):4005-15.

Stumpe, M.C, Grubmüller H. Interaction of urea with amino acids: implications for urea-induced protein denaturation. *J. Am. Chem. Soc.* 2007; 129:16126-16131.

Tanaka, N., Nishizawa, H., Kunugi, S. Structure of pressure-induced denatured state of human serum albumin: a comparison with the intermediate in urea-induced denaturation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1997; 1338:13-20.

Tanford, C. In "Physical Chemistry of Macromolecules". John Wiley & Sons, New York, 1961.

Till, M.S. & Ullmann, G.M. McVol - A program for calculating protein volumes and identifying cavities by a Monte Carlo algorithm. *J. Mol. Model.* 2009; 009-0018.

Tournier, S., Gachet, Y., Buck, V., Hyams, J., Millar, J. Spindle position is monitored by the Bub1, Bub3 and Mad3 checkpoint proteins in fission yeast. *Mol. Biol. Cell.* 2004; 15(7):3345-56.

Warshel, A., Russel, S.T., Churg, A.K. Macroscopic models for studies of electrostatic interactions in proteins: Limitation and applicability. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1984; 81:4785-4789.

Weber, G., Drickamer, H.G. The effect of high pressure upon proteins and other biomolecules. *Q. Rev. Biophys.* 1983; 16(1):89-112.

Weber, G. Phenomenological description of the association of protein subunits subjected to conformational drift. Effect of dilution and of hydrostatic pressure. *Biochem.* 1986; 25:3626-3631.

Wyman, J. Linked functions and reciprocal effects in hemoglobin - a second look. *Adv. Prot. Chem.* 1964; 19:223-286.

Zangi, R., Zhou, R., Berne, B.J. Urea's Action on Hydrophobic Interactions. *J. Am. Chem. Soc.* 2009; 131:1535-1541.

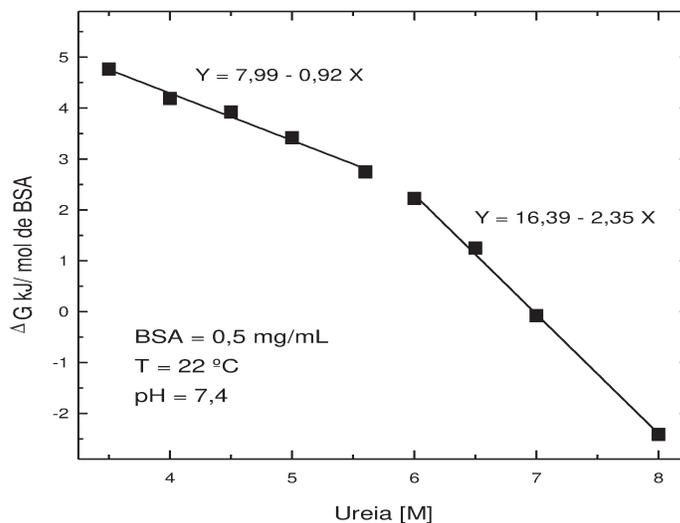
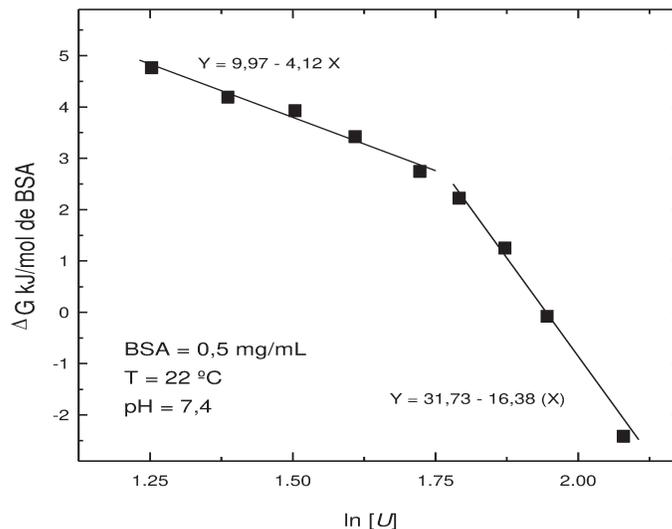
ANEXO

Anexo I

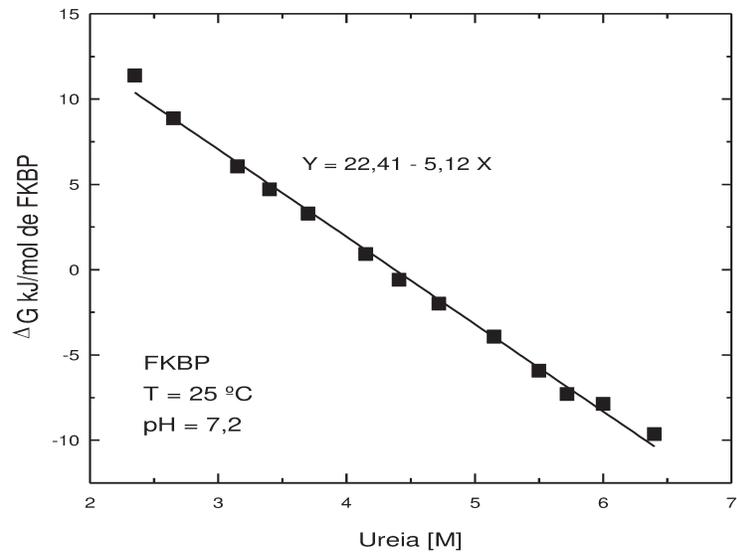
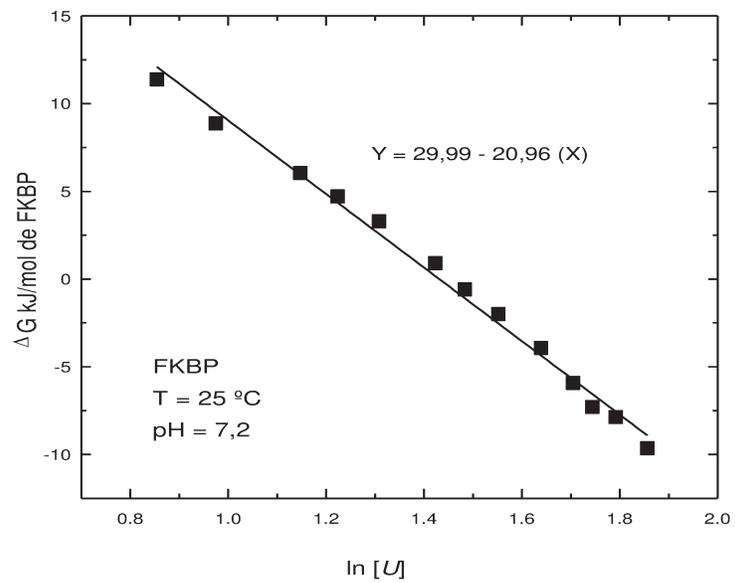
Curvas de $\Delta G_{[U],p}$ versus $\ln[U]$ e de $\Delta G_{[U],p}$ versus $[U]$

São representados a seguir alguns exemplos do trabalho de obtenção dos resultados de parâmetro m e ν que constam na Tab. 1 no presente estudo (BSA), obtidos a partir dos dados de espectrometria de demais proteínas na literatura. As referências são listadas na própria tabela no texto da tese.

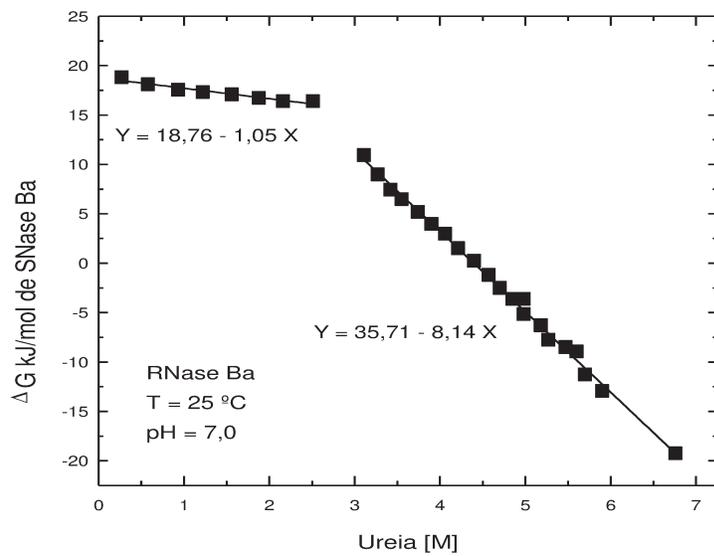
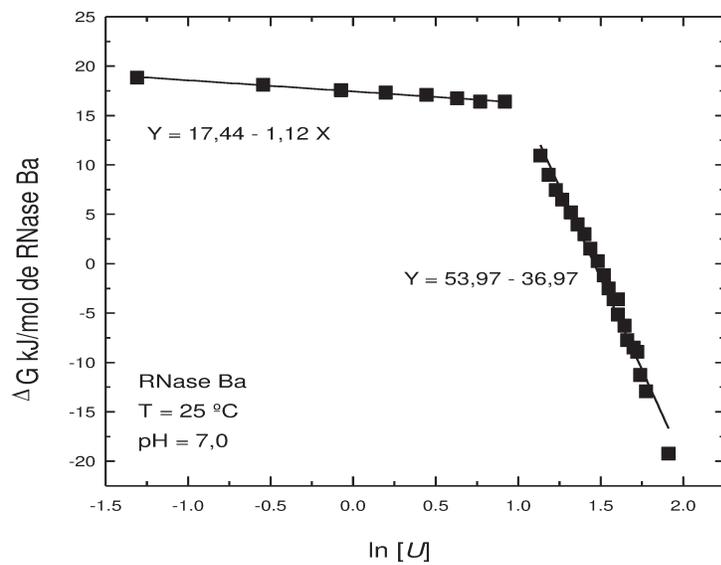
1 - Figuras para a BSA (presente estudo)



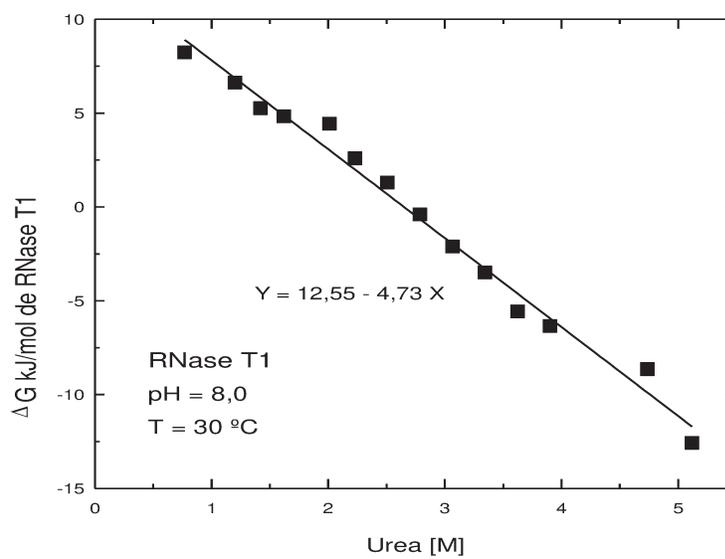
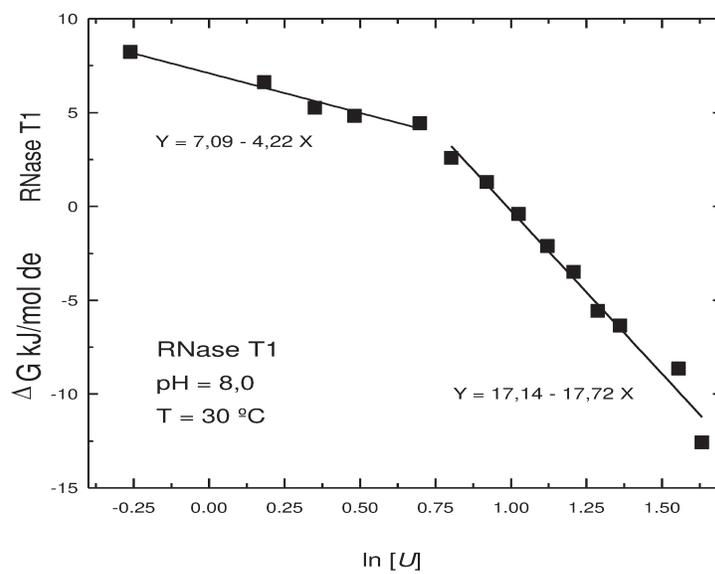
2 - Proteína FKBP



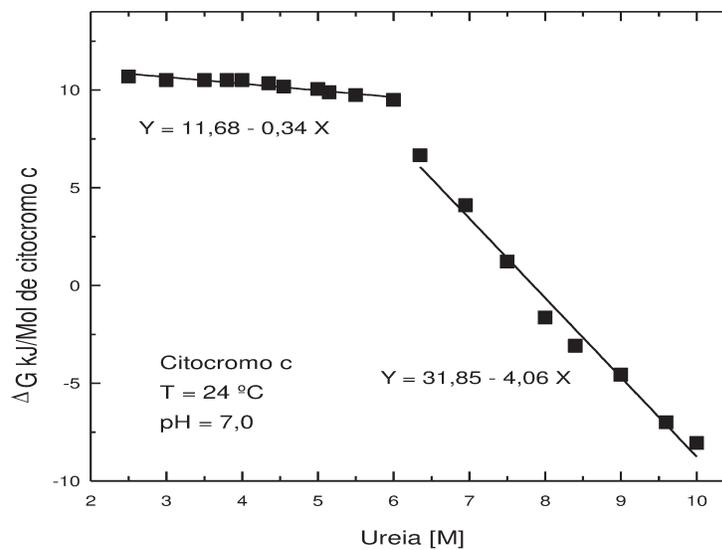
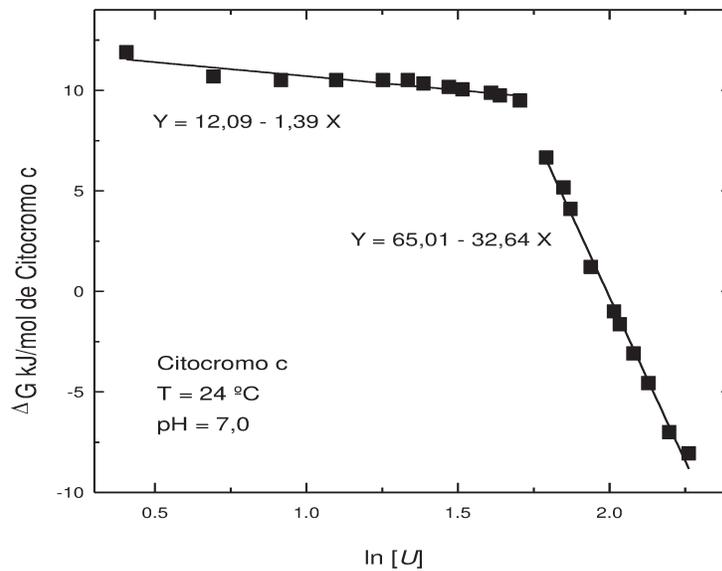
3 - Proteína RNase Ba, pH = 7



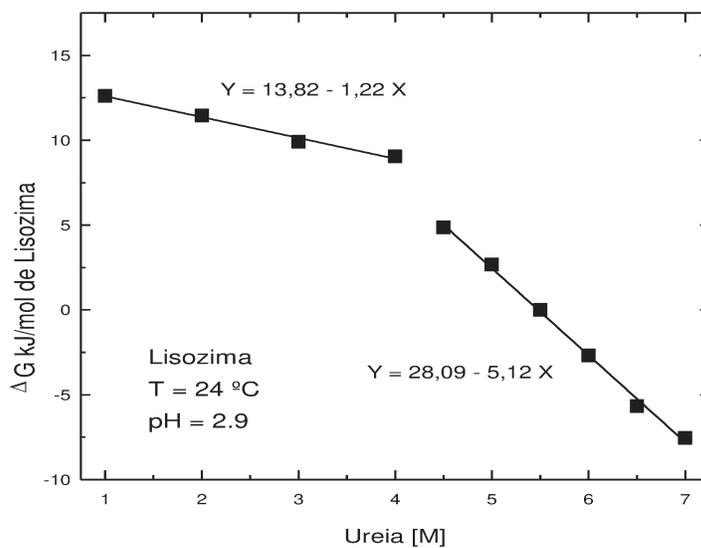
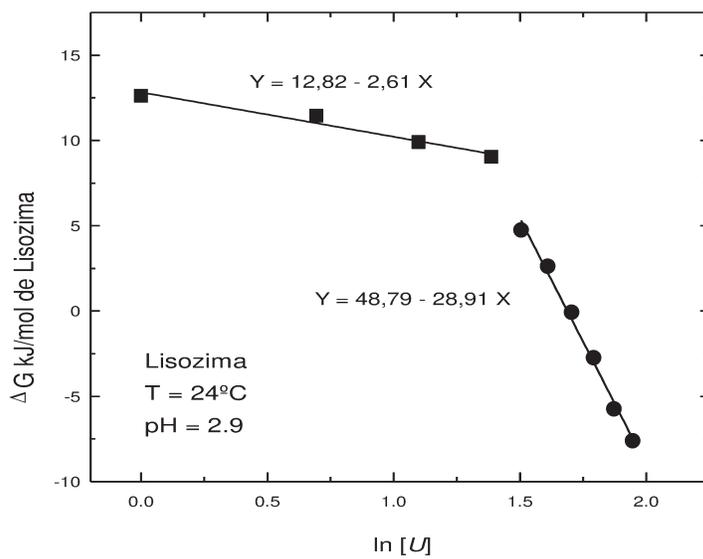
4 - Proteína RNase T1



5 - Proteína Citocromo c



6 - Proteína Lisozima



Anexo II

Artigo submetido sobre a BSA

Pressure- and urea-induced denaturation of bovine serum albumin: considerations about protein heterogeneity

Douglas R. Norberto, Joelma M. Vieira, Ancelmo R. Souza, José A.C. Bispo and Carlos F. S. Bonafe*

Laboratório de Termodinâmica de Proteínas, Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6109, Campinas, SP, 13083-970 Brazil.

Correspondence to Carlos F. S. Bonafe, Laboratório de Termodinâmica de Proteínas, Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6109, Campinas, SP, 13083-970 Brazil 13083-970, Phone 55 19 3521 6229, FAX 55 19 3521 6129. E-mail: bonafe@unicamp.br

Keywords: bovine serum albumin, high pressure-induced denaturation, urea-induced denaturation, protein heterogeneity

ABSTRACT

Urea denatures proteins at different concentrations, depending on the experimental conditions and the protein. We investigated the pressure-induced denaturation of bovine serum albumin (BSA) in the presence of subdenaturing concentrations of urea based on a two-state equilibrium. Pressure-induced denaturation was enhanced at urea concentrations ($[U]$) of 3.5 M to 8.0 M, with the free energy of denaturation at atmospheric pressure ($\Delta G_{[U]}^0$) ranging from +5.0 to -2.5 kJ/mol of BSA. The m values appeared to be biphasic, with m_1 and m_2 of 0.92 and 2.35 kJ mol⁻¹ M⁻¹, respectively. Plots of $\Delta G_{[U]}^0$ versus $\ln[U]$ yielded values of ν , the apparent stoichiometric coefficient, of 1.68 and 6.67 mol of urea/mol of BSA for m_1 and m_2 , respectively. These values were compared with the m and ν values of other monomeric proteins reported in or calculated from the literature. The very low values of ν systematically observed for proteins were considered as a possible protein heterogeneity in respect to the free energy of denaturation. Thus, a ν value of 140 mol of urea/mol of BSA could be reached by considering the existence of a heterogeneous molecular population with respect to the free energy of denaturation.

1. Introduction

Knowledge of protein dissociation and denaturation is fundamental for understanding numerous biological processes. Historically, these phenomena have been studied using denaturing agents such as urea and guanidine hydrochloride [1]. More

recently, hydrostatic pressure and urea have been used to study these processes in proteins and viruses. Hydrostatic pressure is particularly useful for studying viral inactivation, particularly with regard to its application in the development of vaccines [2]. High pressure has been used to determine the thermodynamic parameters and properties of dissociation in multimeric proteins [3, 4] and the conditions of reassociation [5]. Previous work examined the effect of protons and pressure on the dissociation of tobacco mosaic virus (TMV) and giant multimeric hemoglobin, with quantification and stoichiometric analysis of proton release [6, 7]. Similar experiments in the presence of urea at concentrations up to 7.0 M demonstrated a significantly greater involvement of urea in denaturation than in dissociation. The initial step of TMV dissociation can be clearly identified by light scattering, whereas the denaturation phases can be monitored by changes in the fluorescence properties [4]. Similar fluorescence and light scattering measurements at various urea concentrations have been reported for other viruses. Most values for the apparent stoichiometry of urea during dissociation range from 0.5 to 1.5 mol of urea/mol of subunit, while those for denaturation range from 4.0 to 11.0 mol of urea/mol of subunit [4]. Studies of protein denaturation are related to the description of protein-solvent interactions during the denaturation transition [8-14]. More recently, Auton and Bolen [15] suggested that the peptide backbone provided a major contribution to urea-induced denaturation.

Several decades ago it was shown that the analysis of plots of ΔG^0 of denaturation *versus* \ln of the denaturant concentration systematically yielded a very low value for the stoichiometry of the denaturant during protein denaturation, with the final equilibrium being considered as a reaction involving protein and denaturant. These lower-than-expected values led to alternative ways of analyzing protein denaturation. For example, in studies of protein denaturation by chemicals, an important point is whether the free energy of denaturation should be considered to be linearly dependent on $[D]$ (denaturant concentration) or $\ln[D]$. Pace [16] described a theoretical approach based on a linear relationship that has since been applied to most of the proteins investigated. However, Schellman [17] observed that there was no reason to expect the free energy of protein denaturation to be strictly linear with the denaturant concentration.

The aim this work was to investigate whether the denaturation of bovine serum albumin (BSA) by urea and pressure was linearly or logarithmically related to the urea concentration. This relationship was assessed by calculating the m -values and several other thermodynamic parameters. In contrast to the 2130 capsid subunits associated with the RNA of TMV, BSA is a monomeric protein and therefore a much simpler system. Our results were compared with those for other monomeric proteins reported in the literature. Based on our findings, we propose an alternative explanation for the very low value consistently found in plots of the ΔG^0 of denaturation *versus* $\ln[D]$, i.e., that this discrepancy is based on the heterogeneity of the ΔG^0 of denaturation in protein populations.

2. Materials and methods

Chemicals

All reagents were of analytical grade. Distilled water was filtered and deionized through a Millipore water purification system (18 M Ω resistance). Unless stated otherwise, the experiments were done at 5 °C in 100 mM Tris-HCl buffer, pH 7.0. Ultrapure urea and essentially fat-free BSA were obtained from Sigma.

Fluorescence under pressure

The high pressure system used has been described elsewhere [18]. An ISS model high-pressure (HP) cell with sapphire windows connected to a pressure generator (HIP) was used. Fluorescence was recorded with an Edinburgh FL 900 spectrofluorometer equipped with a xenon lamp source. The pressure system was automated and detailed by Santos et al. [6]. The fluorescence data were obtained by excitation of BSA at 280 nm and emission was recorded at 300 - 450 nm. Changes in the fluorescence spectra resulting from the exposure of tryptophan residues were quantified by the spectral center of mass (ν_p),

$$\nu_p = \frac{\sum \nu_i F_i}{\sum F_i} \quad (1)$$

where F_i is the fluorescence emitted at wavenumber ν_i and the summation is carried out over the range of appreciable values of F . The degree of denaturation at pressure p (α_p) is related to ν by the expression

$$\alpha_p = \left[1 + \frac{Q(\langle \nu_p \rangle - \langle \nu_{des} \rangle)}{(\langle \nu_n \rangle - \langle \nu_{des} \rangle)} \right]^{-1} \quad (2)$$

where Q is the ratio of the quantum yields of denatured and native forms, ν_p is the center of mass at pressure p , and ν_{des} and ν_n are the corresponding quantities for the denatured and native forms, respectively [3]. The software "Mathematica" was used to obtain the fitted curves of denaturation.

Theory

Equilibrium denaturation profiles were analyzed based on the binding equilibrium for the interaction of protein with the solvent and by using a two-state model (see Discussion below). Since the conformation of denatured proteins changes with the concentration of urea and guanidine hydrochloride, the evaluation of $\Delta G_{[U]}^0$ over a large solvent concentration range can be rather informative [17, 19].

Analysis of the effect of urea on BSA in this work was done using an approach similar to that previously described for the effect of this co-solvent and protons on protein aggregates [4, 6, 7]. Thus, the apparent constant of denaturation at urea concentration $[U]$, $K_{[U]}$, is correlated to the apparent constant of denaturation K as $K_{[U]} = K[U]^\nu$ [4]. The corresponding apparent free energy of denaturation on a molar basis, $\Delta G_{[U]}^0$, is given by:

$$\Delta G_{[U]}^0 = -RT \ln K - RT \ln [U]^\nu = \Delta G_{U_1}^0 - \nu RT \ln [U] \quad (3)$$

where U_1 indicates a urea concentration of 1 M and ν is the apparent stoichiometry of urea. Note that the equilibrium constant at 1 M urea, K_{U_1} , is equal to $K * 1^\nu = K$, so $-RT \ln K_{U_1} = -RT \ln K = \Delta G_{U_1}^0$.

Plotting $\Delta G_{[U]}^0$ versus $\ln[U]$ should produce a straight line with a slope corresponding to $-\nu RT$. Calculation of the equilibrium constant at pressure p and a given urea concentration $[U]$, $K_{[U],p}$, is based on the relationship [4]

$$K_{[U],p} = K_{[U]} \exp(-p\Delta V/RT) \quad (4)$$

where ΔV is the volume change of denaturation and the index $[U], p$ represents the corresponding pressure and urea concentration of the species. The calculation of $K_{[U],p}$ can be done based on the respective degree of denaturation, $\alpha_{[U],p}$, as

$$K_{[U],p} = \frac{\alpha_{[U],p}}{1-\alpha_{[U],p}} \quad (5)$$

The respective free energy of denaturation at pressure p is

$$\Delta G_{[U],p} = \Delta G_{[U]} + p\Delta V \quad (6)$$

Plotting $\Delta G_{[U],p}$ versus p furnishes ΔV as the slope and $\Delta G_{[U]}^0$ as the free energy of denaturation at atmospheric pressure. A marked change in the slope of the plot $\Delta G_{[U]}^0$ versus $\ln[U]$ at different urea concentrations is indicative of distinct urea sensitivities. Consequently, the overall or global denaturation reflects a summation of the responses of a population of BSA molecules with different susceptibilities and furnishes the general equilibrium constant $K_i[U]^\nu$, where $K_{i,[U]} = K_i[U]^\nu$ and i represents each BSA population.

Based on this idea, the experimental data correspond to the sum of the distinct populations involved and the degree of denaturation α^* is partitioned as follow

$$\alpha_U^* = \sum_{i=1}^n f_i \alpha_i \quad (7)$$

where the coefficient f_i represents the fraction of species i . The corresponding free energy of denaturation as a function of the equilibrium constants is expressed as

$$\Delta G_{[U]}^0 = -RT \ln \left[\frac{\alpha_U^*}{1-\alpha_U^*} \right] = -RT \ln \left[\frac{\sum_{i=1}^n \frac{K_i[U]^\nu f_i}{1+K_i[U]^\nu}}{\sum_{i=1}^n \frac{1 - \frac{K_i[U]^\nu f_i}{1+K_i[U]^\nu}}{1+K_i[U]^\nu}} \right] \quad (8)$$

This alternative approach for assessing denaturation is based on the assumption of a heterogenous protein population. As will be seen, this approach yields high value of ν^* .

3. Results

We investigated the changes in the fluorescence of BSA at different concentrations of urea and pressure (Fig. 1) and attempted to correlate them with structural alterations. Compared to the fluorescence emission spectrum obtained in the absence of urea, a high urea concentration produced a significant red shift that intensified as the hydrostatic pressure increased. The fluorescence spectrum obtained after returning to atmospheric

pressure was very similar to that obtained before the increase in pressure, indicating that the phenomenon was reversible under these experimental conditions.

The centers of mass of the fluorescence emission spectra for BSA measured in wavenumber and calculated according to Eq. 1 yielded values that revealed the degree of exposure of aromatic amino acids, especially tryptophan. This parameter reflects the extent of denaturation. The effect of pressure on the center of mass at urea concentrations up to 8.0 M is shown in Fig. 2A. Pressure produced a marked red shift in the fluorescence spectra at all urea concentrations, indicating enhanced denaturation in the presence of urea. The center of mass values obtained upon returning to atmospheric pressure were identical to those obtained before pressure application for all urea concentrations (not shown), indicating that the pressure-induced denaturation was reversible. This finding also corroborated the validity of the thermodynamic parameters obtained.

The inset in Fig. 2A shows the effect of urea on the center of mass values at different pressures. A more intense red shift was observed in the fluorescence spectra at lower pressures. Fig. 2B shows the respective correlation between the degree of denaturation and the pressure in different urea concentrations, and Fig. 2C shows the corresponding plots of $\ln K$ versus pressure.

Fig. 3 shows the free energy of denaturation ($\Delta G_{[U]}^0$) at different pressures as a function of urea concentration ($\ln[U]$; Eq. 3) by using of the relation $\Delta G_{[U]}^0 = -RT \ln K$. The biphasic nature decreased with increasing pressure and disappeared at high pressure, which suggested a complex pattern of transition from the native to denaturated state.

Fig. 4A shows the time dependence of the red shift in the center of mass when BSA was pressurized from atmospheric pressure to 250 MPa in the presence of urea (4.5 M). After 20 min, the center of mass had reached 85% of its maximal shift. Comparison of the curves obtained for different incubation times with a fixed concentration of urea (4.5 M) indicated that the results for incubation times >10 min were identical (Fig. 4B), suggesting that the denaturation had reached kinetic equilibrium. A return to atmospheric pressure resulted in near total recovery of the original fluorescence, again indicating the reversibility of the process. Plots of the natural logarithm of K as a function of pressure at different urea concentrations resulted in a linear relationship in all cases (Fig. 2C).

Fig. 5 shows the volume change of denaturation for each pressure curve from Fig. 2C (Eq. 6). The values for the lower urea concentrations ranged from -20 to -30 mL/mol of BSA, while that for urea concentrations >6 M was -36 mL/mol of BSA. The data for the free energy of denaturation at atmospheric pressure as a function of $\ln[U]$ (Fig. 3 squares) were determined from the plots of $\ln K$ versus pressure (Fig. 2C). The slopes of the plots (determined using Eq. 3) yielded apparent values related to urea denaturation: 1.68 and 6.67 mol of urea/mol of BSA for each part of the curve. Independent processes involving a combination of reactions and equations can also yield curves similar to those observed here. The combination of individual processes results in an overall reaction that yields a global denaturation constant; this constant reflects the sum of a series of individual values and furnishes a single value of v .

Fig. 6 shows the relationship between $\Delta G_{[U]}^0$ and $\ln [U]$. The apparent denaturation constants and respective contributions of species are shown in the upper inset of this figure. An analysis of 10 protein populations (lower inset in Fig. 6) indicated an apparent stoichiometry of 140 urea molecules.

4. Discussion

New approaches for understanding protein-denaturant interactions and the mechanisms of protein denaturation have been proposed by several authors [11, 17, 19-22]. In general, protein denaturation results from disruption of a fine balance in protein-protein and protein-solvent interactions, with significant contributions from the hydrogen bonds of the exposed sites, peptide backbone and lateral residues of the denaturated protein.

The theoretical model applied to BSA in this study was based on a two-state equilibrium and facilitated the quantification of native and denaturated proteins. The two-state model is very dependent on protein topology, local energy distribution and cooperativity [23, 24]. Urea- and guanidine-induced denaturation can generally be considered as a two-state equilibrium with a quick transition from the native protein to denaturated state [25, 26], as shown for human serum albumin (HSA) [27]. The accumulation of intermediate conformations is closely related to the nature of the solvent used and the experimental conditions. For example, some proteins denature in acidic conditions, resulting in a “molten globule” state [28]. In the case of BSA, extreme acidic and alkaline pH markedly influence the ability of urea to denaturate the protein and form intermediate structures [29]. As shown in the inset of Fig. 2A, at pressures >50 MPa the denaturation profile became more abrupt and reflected a two-state transition that was more marked as the pressure increased. In our analysis, we chose to use the curve for BSA denaturation at atmospheric pressure when fitting the proposed model since it was easier to simulate this biphasic profile and account for cooperative aspects, as discussed below.

Previous studies of urea-induced BSA denaturation at atmospheric pressure reported a denaturation profile similar to that observed here. The presence of intermediates was suggested by Khan [30]. The pressure-induced denaturation of BSA at subdenaturing concentrations of urea consistently produced a significant volume change and allowed measurement of the free energy of denaturation at atmospheric pressure in the presence of urea (Figs. 3 and 5). The pressure effects arose from the difference in the specific volumes of the transition of the protein from native to denaturated states (Eq. 6). Most of the proteins studied so far typically have a larger specific volume in the native state than in the denaturated state, and the application of pressure induces denaturation [31]. As shown in Fig. 5, the volume change of denaturation was greater at higher urea concentrations. In addition, pressure facilitated the denaturation of BSA by urea ($\Delta G_{[U],p}$) at all concentrations tested (Fig. 2C). Pressure also induced the transition from a biphasic to a monophasic curve ($\Delta G_{[U],p}$ versus $\ln[U]$; Fig. 3).

Linear dependence of the ΔG^0 of denaturation on urea concentration

The linear dependence of the free energy on solvent concentration furnishes the m-value, a phenomenological parameter that has been applied to numerous protein-solvent systems [16]. This constant represents the difference in the transfer free energies of the denatured and native states from water to 1 M urea solution, and is correlated with the size of the protein and the change in solvent-exposed surface upon unfolding [15].

The m-values were determined from denaturation data in the literature and in this work for several monomeric proteins, calculated from plots of $\Delta G_{[U],p}$ versus $[U]$, known

as Tanford Plot, and were compared with the m -values from the original reports (Table 1). The m -values for BSA were calculated based on the experimental curves of pressure-induced denaturation at different urea concentrations (underlined results in Table 1). This approach should improve the quality of data when compared to values obtained by direct measurement of fluorescence at atmospheric pressure, especially at low urea concentrations where it is difficult to quantify low levels of denaturation, decreasing the accuracy.

Several monomeric proteins exhibit changes in their m -values that reflect linear and biphasic behaviors (shown in Table 1 as m_1 and m_2 , respectively). These proteins show greater sensitivity to urea in the final phase of denaturation. However, the method used to monitor denaturation can affect the final shape of the denaturation curve and the resulting m -value(s). Changes in the m -value are usually attributed to changes in the conformation of folded or unfolded forms [16]. Luque et al. [32] indicated that the presence of intermediate forms may result in a biphasic curve involving equilibrium between native and intermediate-denatured proteins. The different m -values for BSA may reflect the interaction of urea with distinct domains of the protein. Tanaka et al. [33] reported that domain III of HSA was particularly susceptible to pressure- and urea-induced denaturation. Ahmad et al. [34] also observed this domain sensitivity at a urea concentration <4.8 M, whereas domains I and II were sensitive to urea concentrations >5 M. Thus, the m_1 value reported here would correspond to changes in domain III while the m_2 value would be associated with changes in domains I and II.

Linear dependence of the ΔG^0 of denaturation on $\ln[U]$

As mentioned in the Introduction, the ΔG^0 of denaturation may show a logarithmic dependence on the concentration of denaturant. However, as indicated in Fig. 7, closer analysis of this relationship reveals that an apparently linear response may actually be part of a non-linear one when examined over a wide range of concentrations. Schellman [17] recognized that the m -parameter may change with denaturant concentration, thus implying a non-linear dependence on concentration. In addition, curves for guanidine-induced denaturation of some globular proteins may also be non-linear [17, 35, 36].

Table 1 summarizes the values of ν for a variety of monomeric proteins including BSA, calculated from the slopes of $\Delta G_{[U]}^0$ versus $\ln[U]$ plots and Eq. 3. In this case, ν corresponds to the apparent quantity of urea that interacts with BSA and other proteins, or the apparent stoichiometries. The biphasic character for BSA agreed with the different m -values (Fig. 3 and Table 1) and suggested enhanced cooperativity at higher urea concentrations. Again, since the data for BSA denaturation were the same as those used to calculate the m -values, the level of precision was higher than for the other proteins.

Biphasic plots were also observed for other proteins. The values of ν_1 generally ranged from 1 to 4 mol of urea/mol of protein, while those for ν_2 ranged from 4 to 13 mol of urea/mol of protein. In those proteins with only one value for ν , this ranged from 5 to 15 mol of urea/mol of protein. The corresponding values for the $\Delta\Delta G_{[U]}^0$ of denaturation were calculated using Eq. 3 (data not shown) and were similar to those reported in the literature.

Inferences regarding the apparent stoichiometry based on $\Delta G_{[U]}^0$ versus $\ln[U]$ plot are not widely used nowadays because of the systematically low values furnished by the slope of the plot. An explanation for this finding includes the strong urea-protein interaction of a few molecules responsible for bulk denaturation [17], as mentioned in the

Introduction. The biphasic profile for BSA and several other proteins (Table 1) also deserves better attention, as discussed below. In contrast to the generally low values calculated from the slopes of these plots, we will see that we can get ν values >100 if we account the presence of heterogeneity on the denaturation process.

Heterogeneous populations

In principle, the presence of intermediate species does not disrupt the linearity of the $\Delta G_{[U]}^0$ versus $\ln[U]$ plot. A supposed equilibrium with two apparent stoichiometries in a sequence reaction with equilibrium constants K_1 and K_2 would correspond to one equilibrium reaction with constant K_1K_2 , thus resulting in only one apparent stoichiometry. For this reason, we examined alternative explanations for the biphasic curve. In particular, we considered the possibility of population heterogeneity with respect to the free energy of denaturation. A combination containing 84.4% of species with $\ln K = -13.22$ and 15.6% of species with $\ln K = -0.57$ (Fig. 6, upper inset) resulted in a good fit to the experimental curve (Fig. 6), with ν_1 and ν_2 values of 1.65 and 6.67, respectively.

Concerning the apparent stoichiometries, we made some considerations, as a heterogeneous population with much higher value of ν . Current theory postulates that in the denatured state proteins tend to have more surface area exposed to the solvent and a greater number of binding sites [17]. Previous studies revealed various aspects of urea-protein interactions, e.g., the solubilizing effect of urea on apolar groups, the formation of weak hydrogen bonds with the peptide backbone, and the interface between water and buried regions of the proteins [37]. Assuming the $\Delta\Delta G_{[U]}^0$ of denaturation for 3.5 to 8 M urea to be 7.0 kJ/mol of protein, with an average urea-protein energy of interaction of 50 J/mol of urea, the total number of urea molecules would be 140 mol/mol of protein (a theoretical ν , symbolized here as ν^*). Using this number, we examined the distribution of $\Delta G_{U_1}^0$ and $\ln K$ values for 14 species (Fig. 6, lower inset). The resulting curve was fitted to the experimental curve, but consistently subestimated the experimental values for the apparent stoichiometry ν (Fig. 6). Note that four species gave no contribution (fractional occurrence of 0%) so the total number of distinct populations was 10. Based on the original curve (Fig. 3, P_{atm}), we also investigated the minimum number of different BSA population at increasing values of ν^* . As shown in Fig. 8, there was a tendency for the BSA species near 14 to produce higher values of apparent urea stoichiometry.

Generally, no significant heterogeneity is expected in readily crystallized native proteins. However, this is not true for transition or denatured states because their greater flexibility, with the non-uniform presence of cis and trans prolines in the polypeptide backbone, makes the denatured state less well-defined [38]. Such a situation could explain a possible heterogeneity.

5. Conclusion

The effect of pressure denaturation on BSA was examined at different urea concentrations, and a combination of urea and pressure was found to enhance denaturation. The results for the pressure denaturation of BSA at sub-denaturing concentrations of urea can be extrapolated to atmospheric pressure to yield more precise data. In addition, plots of $\Delta G_{[U]}^0$ versus $\ln[U]$ can easily be compared with the classical plot $\Delta G_{[U]}^0$ versus $\ln[U]$. The biphasic nature of both plots suggests different

urea sensitivities and the presence of protein heterogeneity. The monomeric nature of BSA means that there is limited interference on the dissociation process induced by urea and/or pressure. Comparison with other proteins suggests that the approach used here is applicable to the protein-urea interactions. In addition, examination of the effects of temperature, pH and glycerol could improve our understanding of pressure- and urea-induced BSA denaturation. The heterogeneity that explains the quantitative findings of the denaturation curves should be susceptible to analysis by special biophysical techniques based on dynamic approaches.

With judicious use, the approach used here to study the denaturation of monomeric BSA should allow better free energy measurements of several controlled thermodynamic parameters and should improve our understanding of the mechanisms of protein denaturation and stability.

Acknowledgments

We thank Ines Joekes and Julien Roche for helpful discussions and Stephen Hyslop for editing the English of the manuscript. This work was supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

References

- [1] C. Camilloni, A.G. Rocco, I. Eberini, E. Gianazza, R.A. Broglia, G. Tiana, Urea and guanidinium chloride denature protein L in different ways in molecular dynamics simulations, *Biophys. J.* 94 (2008) 4654-4661.
- [2] C.F.S. Bonafe, M. Glaser, E.W. Voss, G. Weber, J.L. Silva, Virus inactivation by anilino-naphthalene sulfonate compounds and comparison with other ligands, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275 (2000) 955-961.
- [3] C.F.S. Bonafe, C.M.R. Vital, R.C.B. Telles, M.C. Gonçalves, M.S.A. Matsuura, F.B.T. Pessine, D.R.C. Freitas, J. Vega, Tobacco mosaic virus disassembly by high hydrostatic pressure in combination with urea and low temperature, *Biochemistry* 37 (1998) 11097-11105.
- [4] J.L.R. Santos, R. Aparicio, I. Joekes, J.L. Silva, J.A.C. Bispo, C.F.S. Bonafe, Different urea stoichiometries between the dissociation and denaturation of tobacco mosaic virus as probed by hydrostatic pressure, *Biophys. Chem.* 134 (2008) 214-224.
- [5] C.F.S. Bonafe, M. Villas-Boas, M.C. Suarez, J.L. Silva, Reassembly of a large multisubunit protein promoted by nonprotein factors. Effects of calcium and glycerol on the association of extracellular hemoglobin, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 13210-13216.
- [6] J.L.R. Santos, J.A.C. Bispo, G.F. Landini, C.F.S. Bonafe, Proton dependence of tobacco mosaic virus dissociation by pressure, *Biophys. Chem.* 111 (2004) 53-61.
- [7] J.A.C. Bispo, J.L.R. Santos, G.F. Landini, J.M. Gonçalves, C.F.S. Bonafe, pH dependence of the dissociation of multimeric hemoglobin probed by high hydrostatic pressure, *Biophys. Chem.* 125 (2007) 341-349.
- [8] R. Simpson, W. Kauzmann, The kinetics of protein denaturation, 1. The behavior of the optical rotation of ovalbumin in urea solutions, *J. Am. Chem. Soc.* 75 (1953) 5139-5152.

- [9] C. Tanford, *Physical Chemistry of Macromolecules*. John Wiley & Sons, New York, 1961.
- [10] J. Wyman, Linked functions and reciprocal effects in hemoglobin - a second look, *Adv. Protein. Chem.* 19 (1964) 223-286.
- [11] J. Schellman, Solvent denaturation, *Biopolymers* 17 (1978) 1305-1322.
- [12] J. Schellman, Macromolecular binding, *Biopolymers* 14 (1975) 999-1018.
- [13] I.V. Baskakov, D.W. Bolen, Monitoring the sizes of denatured ensembles of staphylococcal nuclease proteins: implications regarding m values, intermediates, and thermodynamics, *Biochemistry* 37 (1998) 18010-18017.
- [14] Y. Kita, T. Arakawa, T.Y. Lin, S.N. Timasheff, Contribution of the surface free energy perturbation to protein-solvent interactions, *Biochemistry* 33 (1994) 15178-15189.
- [15] M. Auton, D.W. Bolen, Predicting the energetics of osmolyte-induced protein folding/unfolding, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 102 (2005) 15065-15068.
- [16] R.F. Greene, C.N. Pace, Urea and guanidine hydrochloride denaturation of ribonuclease, lysozyme, α -chymotrypsin, and β -lactoglobulin, *J. Biol. Chem.* 249 (1974) 5388-5393.
- [17] J.A. Schellman, The thermodynamic stability of proteins, *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 16 (1987) 115-137.
- [18] A.A. Paladini, G. Weber, Absolute measurements of fluorescence polarization at high pressures, *Rev. Sci. Instrum.* 52 (1981) 419-427.
- [19] J.A. Schellman, Protein stability in mixed solvents: a balance of contact interaction and excluded volume, *Biophys. J.* 85 (2003) 108-125.
- [20] E.F. Casassa, H. Eisenberg, Thermodynamic analysis of multicomponent solutions, *Adv. Protein. Chem.* 19 (1964) 287-395.
- [21] E.P. Hade, C. Tanford, Isopiestic compositions as a measure of preferential interactions of macromolecules in two-component solvents. Application to proteins in concentrated aqueous cesium chloride and guanidine hydrochloride, *J. Am. Chem. Soc.* 89 (1967) 5034-5040.
- [22] I.V. Baskakov, D.W. Bolen, The paradox between m values and ΔC_p 's for denaturation of ribonuclease T1 with disulfide bonds intact and broken, *Protein Sci.* 8 (1999) 1314-1319.
- [23] D. Barrick, What have we learned from the studies of two-state folders, and what are the unanswered questions about two-state protein folding?, *Phys. Biol.* 6 (2009) 015001.
- [24] D. Barrick, D.U. Ferreira, E.A. Komives, Folding landscapes of ankyrin repeat proteins: experiments meet theory, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 18 (2008) 27-34.
- [25] C.N. Pace et al, Conformational stability and thermodynamics of folding of ribonucleases Sa, Sa2 and Sa3, *J. Mol. Biol.* 279 (1998) 271-286.
- [26] R.F. Latypov, T.S. Harvey, D. Liu, P.V. Bondarenko, T. Kohno, R.A. Fachini, R.D. Rosenfeld, R.R. Ketchem, D.N. Brems, A.A. Raibekas, Biophysical characterization of structural properties and folding of interleukin-1 receptor antagonist, *J. Mol. Biol.* 368 (2007) 1187-1201.
- [27] B. Farruggia, G.A. Picó, Thermodynamic features of the chemical and thermal denaturations of human serum albumin, *Int. J. Biol. Macromol.* 26 (1999) 317-323.
- [28] J.H. Carra, E.A. Anderson, P.L. Privalov, Thermodynamics of staphylococcal nuclease denaturation. I. The acid-denatured state, *Protein Sci.* 3 (1994) 944-951.
- [29] P. Sen, B. Ahmad, R.H. Khan, Formation of a molten globule like state in bovine serum albumin at alkaline pH, *Eur. Biophys. J.* 37 (2008) 1303-1308.
- [30] M.Y. Khan, S.K. Agarwal, S. Hangloo, Urea-induced structural transformations in bovine serum albumin, *J. Biochem.* 102 (1987) 313-317.

- [31] C.A. Royer, Revisiting volume changes in pressure-induced protein unfolding, *Biochim. Biophys. Acta.* 1595 (2002) 201-209.
- [32] I. Luque, S. Leavitt, E. Freire, The linkage between protein folding and functional cooperativity: two sides of the same coin?, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 31 (2002) 235-256.
- [33] N. Tanaka, H. Nishizawa, S. Kunugi, Structure of pressure-induced denatured state of human serum albumin: a comparison with the intermediate in urea-induced denaturation, *Biochim. Biophys. Acta.* 1338 (1997) 13-20.
- [34] B. Ahmad, M.K.A. Khan, S.K. Haq, R.H. Khan, Intermediate formation at lower urea concentration in B isomer of human serum albumin: a case study using domain specific ligands, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 314 (2004) 166-173.
- [35] A.C. Ferreon, D.W. Bolen, Thermodynamics of denaturant-induced unfolding of a protein that exhibits variable two-state denaturation, *Biochemistry* 43 (2004) 13357-13369.
- [36] H. Kokubo, J. Rösigen, D.W. Bolen, B.M. Pettitt, Molecular basis of the apparent near ideality of urea solutions, *Biophys. J.* 93 (2007) 3392-3407.
- [37] M.C. Stumpe, H. Grubmüller, Interaction of urea with amino acids: implications for urea-induced protein denaturation, *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 16126-16131.
- [38] T.E. Creighton, Toward a better understanding of protein folding pathways, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 85 (1988) 5082-5086.
- [39] B. Ahmad, Ankita, R.H. Khan, Urea induced unfolding of f isomer of human serum albumin: a case study using multiple probes, *Arch. Biochem. Biophys.* 437 (2005) 159-167.
- [40] D.A. Egan, T.M. Logan, H. Liang, E. Matayoshi, S.W. Fesik, T.F. Holzman, Equilibrium denaturation of recombinant human FK binding protein in urea, *Biochemistry* 32 (1993) 1920-1927.
- [41] C.N. Pace, Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves, *Methods Enzymol.* 131 (1986) 266-280.
- [42] C.N. Pace, D.V. Laurents, R.E. Erickson, Urea denaturation of barnase: pH dependence and characterization of the unfolded state, *Biochemistry* 31 (1992) 2728-2734.
- [43] M.H. Brumano, M.G. Oliveira, Urea-induced denaturation of beta-trypsin: an evidence for a molten globule state, *Protein Pept. Lett.* 11 (2004) 133-140.
- [44] T.A. Dar, L.R. Singh, A. Islam, F. Anjum, A.A. Moosavi-Movahedi, F Ahmad, Guanidinium chloride and urea denaturations of beta-lactoglobulin a at pH 2.0 and 25 °C: the equilibrium intermediate contains non-native structures (helix, tryptophan and hydrophobic patches), *Biophys. Chem.* 127 (2007) 140-148.
- [45] Y.J. Shiu, U.S. Jeng, Y.S. Huang, Y.H. Lai, H.F. Lu, C.T. Liang, I.J. Hsu, C.H. Su, C. Su, I. Chao, A.C. Su, S.H. Lin, Global and local structural changes of cytochrome c and lysozyme characterized by a multigroup unfolding process, *Biophys. J.* 94 (2008) 4828-4836.
- [46] A.R.H. Babbes, E.T. Powers, J.W. Kelly, Quantification of the thermodynamically linked quaternary and tertiary structural stabilities of transthyretin and its disease-associated variants: the relationship between stability and amyloidosis, *Biochemistry* 7 (2008) 6969-6984.

Figure captions

Fig. 1: Normalized fluorescence spectra of BSA at several urea concentrations and pressures, expressed in wavenumber. Excitation at 285 nm and emission at 300 - 450 nm. The BSA concentration was 0.5 mg/mL in 100 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, at 22 °C.

Fig. 2: (A) Effect of pressure and urea on the center of mass of fluorescence spectra of BSA. The data were obtained after at 10 min incubation at each pressure. The experiments were done in triplicate and the standard deviations were smaller than the symbols. The effect of urea on the center of mass at different pressures based on these data is shown in the inset. The corresponding degree of denaturation was calculated according to Eq. 2 (B) and expressed as $\ln K$ (C; Eq. 8). All other conditions were as in Fig. 1.

Fig. 3: Effect of urea concentration on the Gibbs free energy of denaturation of BSA at different pressures, based on the data of Fig. 2A (inset) and the relation $\Delta G_{[U]}^0 = -RT \ln K$.

Fig. 4: (A) Effect of pressure on BSA at a urea concentration of 4.5 M. The solution was pressurized from atmospheric pressure to 250 MPa in 1.5 min. (B) Influence of incubation time on the pressure-induced denaturation of BSA at a urea concentration of 4.5 M. All other conditions were as in Fig. 1. Open symbols indicate the values obtained upon returning to atmospheric pressure after each incubation.

Fig. 5: Effect of urea on the volume change of denaturation, based on the data of Fig. 2C and Eq. 6.

Fig. 6: Comparison of the experimental points (filled squares) with the theoretical curves for albumin denaturation in two populations with distinct apparent urea stoichiometric coefficients: one with 1.65 ($\ln K = -0.57$, for population with an occurrence of 15.6%) and 6.67 ($\ln K = -13.22$, for population with an occurrence of 84.4%) mol of urea/mol of BSA (open circles), and ten populations with a stoichiometric coefficient for urea of 140 mol of urea/mol of BSA (open triangles). The respective species distributions for each population according to the denaturation constant are shown in the upper and lower insets, respectively.

Fig. 7: Hypothetic logarithmic dependence function shown over a wide range (a) and (b) short range.

Fig. 8: Number of populations P necessary for a good fit to the experimental curve of BSA (Fig. 5B), based on the stoichiometric coefficient. The populations used were based on the relationship $\ln K_i = \ln K_0 + iZ = 0$ to $P - 1$, where Z corresponds to the increment in $\ln K$ for each population.

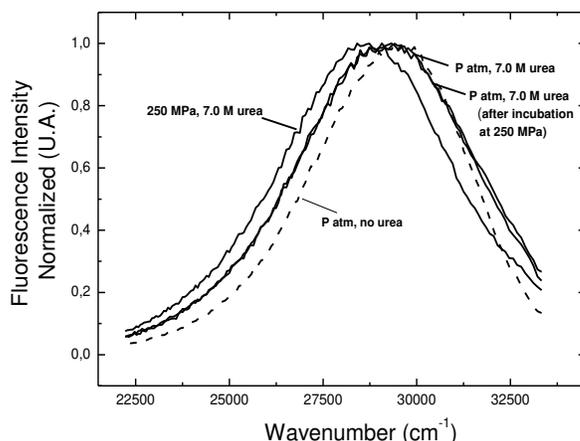


Fig. 1

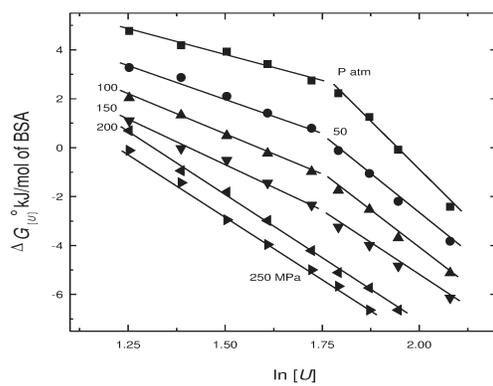
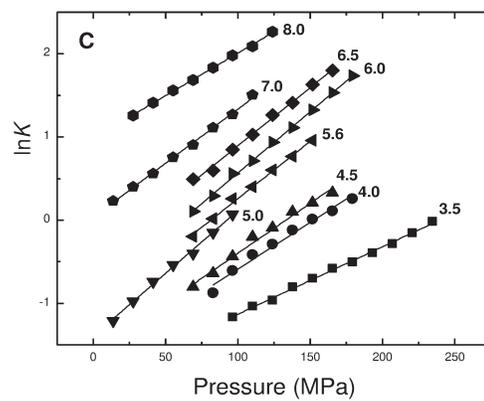
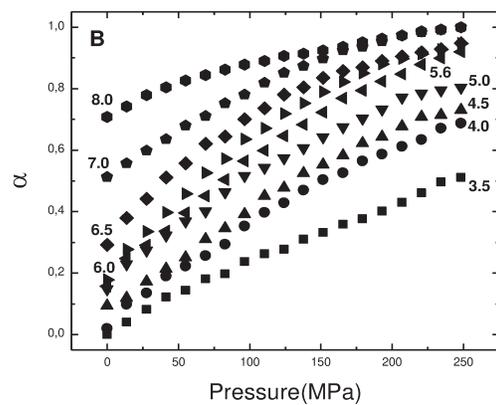
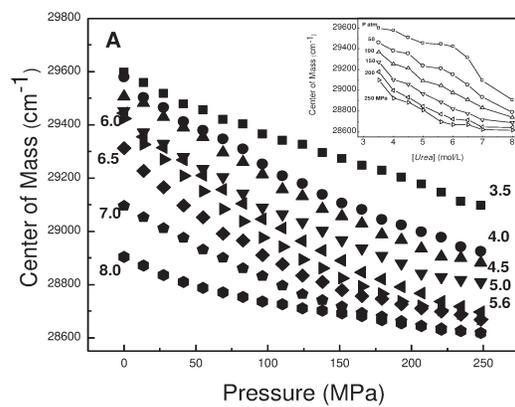


Fig. 2.

Fig. 3.

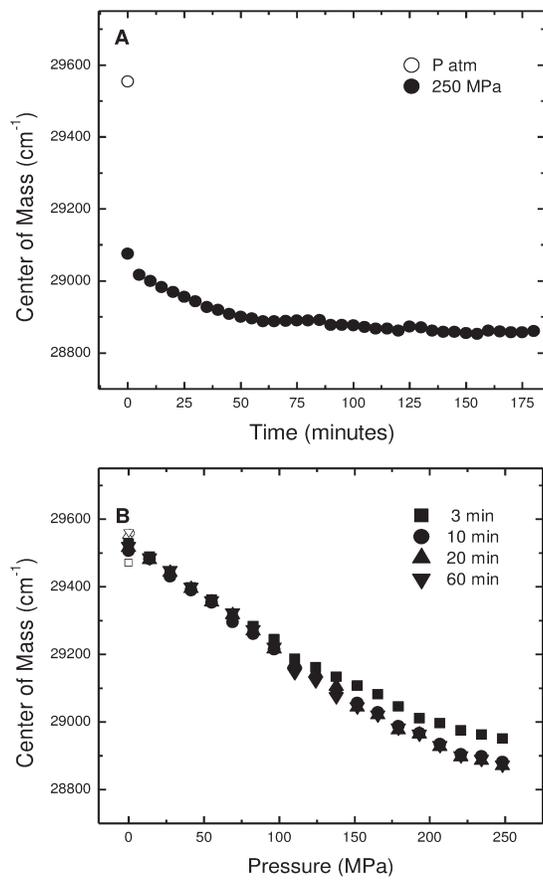


Fig. 4

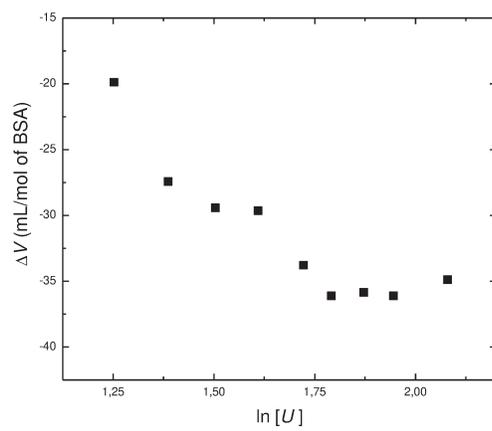


Fig. 5.

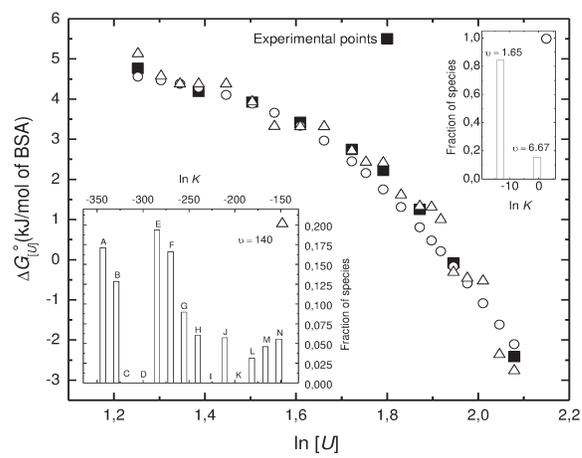


Fig. 6.

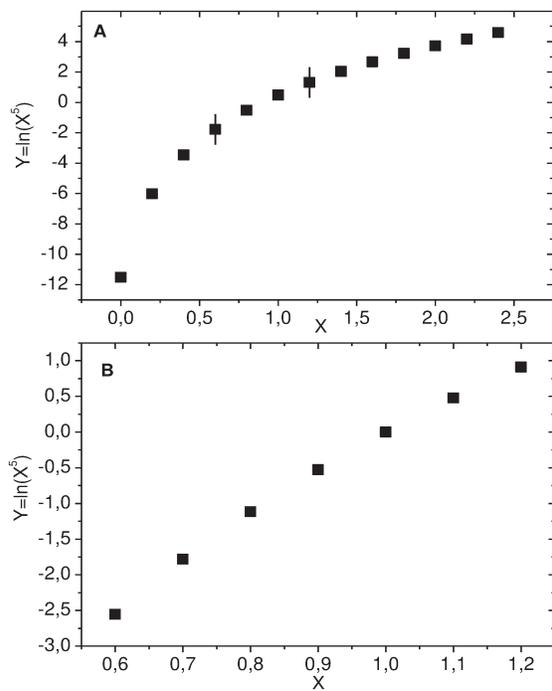


Fig. 7.

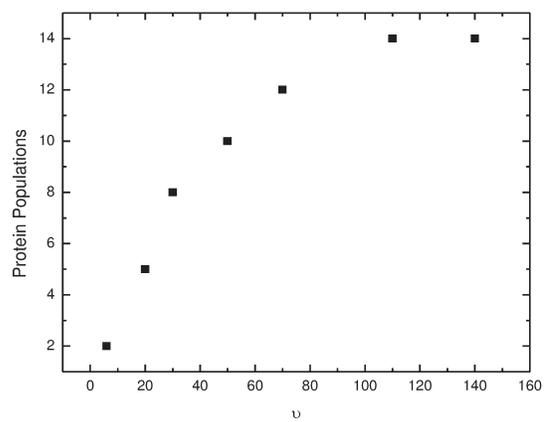


Fig. 8.