

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

EURIPEDES DE ALMEIDA RIBEIRO JÚNIOR

**ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DAS HÉLICES N- E C-TERMINAIS
NA ESTABILIDADE E NA VIA DE ENOVELAMENTO DE
MIOGLOBINA**

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 Henrique Inácio Ramos

Campinas, 2004.

Data da Defesa: 17/03/2004

Banca Examinadora

Titulares:

Prof. Dr. Carlos Henrique Inácio Ramos (Orientador)_____

Prof. Dr. Carlos Francisco Sampaio Bonafé_____

Prof. Dr. Francisco Benedito Teixeira Pessine_____

Prof. Dr. Marcelo Matos Santoro_____

Prof. Dr. Shaker Chuck Farah_____

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a Jesus Cristo por abrirem todas as portas para o início e fim desta pós-graduação que tornaram a concessão e a manutenção da minha bolsa de estudo da FAPESP em eventos totalmente viáveis. Agradeço também aos meus pais pelo apoio, carinho e orientação e acima de tudo por terem me apresentado a Deus.

Paralelamente agradeço: ao Dr. Carlos Henrique Inácio Ramos pela orientação para o desenvolvimento desta tese de doutorado e a oportunidade de desenvolver os experimentos no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS); ao LNLS/CNPq pela infra-estrutura de pesquisa; a CAPES/MCT que tornou acessível uma série de periódicos *on-line* (Portal Capes); ao Dr. Marc Jamin do *Laboratoire de Biophysique Moléculaire et Cellulaire*, CEA, Grenoble-França pela oportunidade e orientação para a condução de experimentos de cinética rápida de enovelamento de proteínas; ao Dr. Sérgio T. Ferreira da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) pela orientação para a condução de experimentos de tempo de vida de fluorescência; à Veruska Mazon Soares, à Sílvia Lucas Ferreira da Silva, à Luciana Camillo e ao pessoal do Laboratório de Purificação de Proteínas (LPP) pelo excelente apoio técnico. A todos amigos e colegas do Centro de Biologia Molecular Estrutural (CeBiME) do LNLS, em especial ao grupo de Biofísica Molecular (BFM), pelas discussões apimentadas e/ou agradáveis sobre ciência e a vida.

Agradeço todo suporte financeiro fornecido pela FAPESP, CNPq/MCT e *PEW Charitable Trusts* para a condução do projeto sobre via de enovelamento de mioglobina.

Agradeço ao meu filho Guilherme a quem dedico esta OBRA.

AQUELE que habita no esconderijo do Altíssimo, à sombra do Onipotente descansará.

Salmo 91:1

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS E TABELAS.	vii
SIGLAS.	x
RESUMO.	xii
ABSTRACT.	xv
1. INTRODUÇÃO.	1
1.1. Enovelamento de proteínas.	1
1.1.1. Os mecanismos de enovelamento.	2
1.1.2. Intermediários na via de enovelamento.	3
1.2. Mioglobina como modelo biológico para estudo de enovelamento de proteínas.	3
1.2.1. Mioglobina: função biológica, ligação e coordenação do grupo heme.	4
1.2.2. Holo e apomioglobina.	9
1.2.3. Apomioglobina e sua via de enovelamento.	9
1.3. O uso de deleção e de permutação nos estudos da estrutura, função e enovelamento de proteínas.	12
1.4. Espectroscopia no estudo de mioglobina.	14
1.4.1. Dicroísmo circular.	14
1.4.2. Fluorescência.	15
2. OBJETIVOS.	17
3. MATERIAL E MÉTODOS.	18
3.1. Construção, clonagem, expressão e purificação de mutantes de permutação e de deleção de hélices da mioglobina selvagem de espermacete (<i>Physeter catodon</i>).	18
3.1.1. Construção, clonagem, expressão e purificação do mutante de deleção da hélice H.	18
3.1.2. Construção e clonagem do mutante de deleção das hélices GH.	18
3.1.3. Construção e clonagem dos mutantes de permutação da hélice H e deleção da hélice G e de permutação das hélices A e AB.	18
3.1.4. Expressão e purificação dos mutantes de deleção das hélices GH, de permutação da hélice H e deleção da hélice G e de permutação das hélices A e AB.	21
3.2. Determinação da concentração, preparação da forma ligada ao grupo heme, espectroscopia de absorção, espectropolarimetria de dicroísmo circular e desenovelamento induzido por uréia e por pH.	22
3.3. Fluorescência estática.	22
3.4. Tempo de vida de fluorescência.	23
3.5. Cromatografia em gel filtração.	24
3.6. Desenovelamento térmico monitorado por CD.	25
3.7. Análise dos dados.	25
4. RESULTADOS.	29
4.1. Clonagem dos mutantes de deleção (Mb₁₋₁₂₃ e Mb₁₋₉₉), de permutação com deleção (Mb-HAB_F) e de permutações circulares (Mb-B_GHA e Mb-C_GHAB).	29
4.2. Expressão e purificação das proteínas mutantes.	29
4.2.1. Mb ₁₋₁₂₃ .	29
4.2.2. Mb ₁₋₉₉ .	29
4.2.3. Mb-HAB_F.	29
4.2.4. Mb-B_GHA e Mb-C_GHAB.	30
4.3. Caracterização espectroscópica dos mutantes de deleção das hélices GH (Mb₁₋₉₉) de permutação linear (Mb-HAB_F) em pH fisiológico.	30
4.3.1. Dicroísmo circular.	30
4.3.2. Absorbância.	32
4.3.3. Cromatografia em gel filtração.	32

4.4. Caracterização espectroscópica dos mutantes de permutação circular (Mb-B_GHA e Mb-C_GHAB) em pH fisiológico.	33
4.4.1. Dicroísmo circular.	33
4.4.2. Absorbância.	34
4.4.3. Cromatografia em gel filtração.	34
4.5. Caracterização espectroscópica da forma apo dos mutantes de permutação circular (ApoMb-B_GHA e ApoMb-C_GHAB) em diferentes pHs.	35
4.5.1. Dicroísmo circular.	35
4.5.2. Fluorescência estática dos triptofanos.	35
4.5.3. Tempo de vida de fluorescência dos triptofanos.	36
4.6. Desenovelamento em meio ácido de ApoMbWT, ApoMb-B_GHA e ApoMb-C_GHAB.	37
4.6.1. Dicroísmo circular.	37
4.6.2. Fluorescência estática dos triptofanos.	38
4.7. Desenovelamento induzido por uréia, das formas apo dos mutantes de permutação circular Mb-B_GHA e Mb-C_GHAB em pH 4, monitorado por CD e pela emissão de fluorescência dos triptofanos.	39
4.7.1. Fluorescência estática dos triptofanos.	39
4.7.2. Dicroísmo circular.	40
4.7.3. Estrutura secundária x terciária.	40
5. DISCUSSÃO.	65
5.1. Mutantes de deleção: Mb₁₋₉₉, Mb₁₋₁₂₃ e Mb-HAB_F.	65
5.1.1. Dicroísmo circular.	65
5.1.2. Emissão de fluorescência.	66
5.1.3. Coordenação de heme e cianoheme.	67
5.1.4. Deleção da hélice H (Mb ₁₋₁₂₃) comparada com as deleções das hélices GH (Mb ₁₋₉₉) e da hélice G com permutação da hélice H (Mb-HAB_F).	68
5.1.5. Análise geral das deleções.	69
5.2. Mutantes de permutação: Mb-C_GHAB e Mb-B_GHA.	71
5.2.1. Efeito geral.	71
5.2.2. Estabilidade dos estados apo e holo em pH fisiológico.	72
5.2.3. As permutações como modelo para o estudo do intermediário.	75
5.2.4. O desenovelamento em meio ácido.	76
5.2.5. O desenovelamento induzido por uréia.	82
5.2.6. Modelo para o enovelamento de apomioglobina.	83
6. CONCLUSÕES.	84
7. APÊNDICE.	85
7.1. Construção do vetor pT7-7a-2Mb.	85
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	87
9. ANEXOS.	98
9.1. Ribeiro-Júnior, E. A., Regis, W. C. B., Tasic, L. and Ramos, C. H. I. (2003). Fast purification of the Apo form and of a non-binding heme mutant of recombinant sperm whale myoglobin. <i>Protein Expres. Purif.</i> 28, 202-208.	98
9.2. Ribeiro-Júnior, E. A. and Ramos, C. H. I. (2004) Origin of the anomalous circular dichroism spectra of many apomyoglobin mutants. <i>Analytical Biochemistry</i> , no prelo.	106

LISTA DE FIGURAS E TABELAS.

	Pág.
Figura 1- O grupo prostético heme.....	4.
Figura 2- Estrutura da mioglobina selvagem de baleia (<i>Physeter catodon</i>).....	7/8.
Figura 3- Esquema da estrutura terciária de Mb destacando as hélices envolvidas na formação dos intermediários de enovelamento.....	17.
Figura 4- Construção do mutante com permutação da hélice H e deleção da hélice G de MbWT.....	20.
Figura 5- Exemplo de uma curva fase-modulação em função da frequência (MHz), utilizada para a determinação do tempo de vida de fluorescência, obtida com auxílio de um fluorômetro de fase e modulação com correlação cruzada e multi-frequência (ISS K2).....	24.
Figura 6- A) Representação esquemática da seqüência de hélices da mioglobina selvagem e dos mutantes de deleção e de permutação. B) Purificação das mioglobinas selvagem (MbWT), e mutantes de deleção da hélice H (Mb ₁₋₁₂₃) e das hélices GH (Mb ₁₋₉₉) confirmada por SDS-PAGE (gel de separação - 15%) corado com Coomassie blue R. C) Purificação das mioglobinas mutantes de permutação circular e mutante de permutação com deleção confirmada por SDS-PAGE (gel de separação - 15%) corado com Coomassie blue R.....	42/43.
Figura 7- Caracterização espectroscópica das formas apo e holo (CN ⁻) das mioglobinas selvagem, do mutante de deleção (Mb ₁₋₉₉) e da permutação linear com deleção (Mb-HAB_F).....	44/45.
Figura 8- Cromatograma em gel filtração das mioglobinas selvagem (MbWT), mutantes da permutação linear com deleção Mb-HAB_F e do mutante de deleção Mb ₁₋₉₉	46.

Figura 9- Caracterização espectroscópica das formas apo e holo (CN⁻) das mioglobinas selvagem e mutantes de permutação circular (Mb-C_GHAB e Mb-B_GHA).....	47/48.
Figura 10- Cromatograma em gel filtração das mioglobinas selvagem e mutantes de permutação circular.....	49.
Figura 11- Espectros de CD, entre 200 e 250 nm, das apomioglobinas selvagem (ApoMbWT) e mutantes de permutação circular ApoMb-C_GHAB e ApoMb-B_GHA.....	51.
Figura 12- Espectro de emissão de fluorescência estática das apomioglobinas selvagem e mutantes de permutação circular em diferentes pHs.....	52/53.
Figura 13- Efeito da variação de pH sobre as apomioglobinas selvagem (ApoMbWT) e mutantes de permutação circular monitorado pela $[\theta]_{222}$.....	54.
Figura 14- Efeito da variação de pH sobre o ambiente dos resíduos de triptofano dos mutantes de permutação circular.....	55/56.
Figura 15- Desenovelamento das mioglobinas selvagem e mutantes de permutação circular em pH 4,1 induzido por concentrações crescentes de uréia e monitorado pela intensidade de fluorescência em 330 nm.....	57/58.
Figura 16- Desenovelamento das mioglobinas selvagem e mutantes de permutação circular em pH 4,1 induzido por concentrações crescentes de uréia e monitorado por $[\theta]_{222}$.....	59.
Figura 17- Variação do centro de massa espectral e da $[\theta]_{222}$ em função da concentração de uréia.....	60/61.

Figura 18- Modelo proposto de estruturação dos mutantes de permutação circular de apomioglobina em diversos pHs, com especial referência à participação da hélice B (amarelo) no intermediário.....	81.
Figura 19- Construção do cDNA2Mb.....	86.
Tabela 1- Oligonucleotídeos para construção de mutantes.....	21.
Tabela 2- Parâmetros biofísicos das mioglobinas selvagem (WT) e mutantes de deleções e de permutação em pH fisiológico.....	50.
Tabela 3- Parâmetros biofísicos das apomioglobinas selvagem (MbWT) e mutantes de permutação Mb-B_GHA e Mb-C_GHAB em diferentes pHs.....	62.
Tabela 4- Tempo de vida de fluorescência dos dois triptofanos das apomioglobinas selvagem e mutantes de permutação em diferentes pH.....	63.
Tabela 5- Avaliação da estabilidade entre as formas Apo em pH 4,1 de mioglobina selvagem (estado intermediário em equilíbrio) e mutantes de permutação circular (Mb-C_GHAB e Mb-B_GHA) e entre as suas formas holo (cianoeme) em pH 7,0.....	64.

SIGLAS.

ϵ : Coeficiente de extinção molar;

λ : Comprimento de onda;

ΔG : Variação da energia livre de Gibbs;

ΔG_D^0 : Variação da energia livre de Gibbs de desenovelamento;

$\Delta G_D^{H_2O}$: Variação da energia livre de Gibbs de desenovelamento na ausência de desnaturante;

f_H : Porcentagem de α -hélice calculada pelo método de Chen *et al.* (1974);

(SG)₄: Quatro pares de serinas e glicinas ligadas em série que foram usadas na união das hélices permutadas;

[θ]: Elipticidade molar;

[U]: Concentração de uréia;

$\langle \lambda \rangle$: Centro de massa dos espectros de fluorescência;

ApoMb: Mioglobina sem o grupo prostético (heme);

Apo-mini-Mb: Forma apo da Mb de cavalo formadas pelos resíduos 32 ao 139;

CD: Dicroísmo circular;

cDNA2Mb: DNA sintético que codifica duas MbWT unidas em série;

Cm: Concentração média de desnaturante, onde 50% da população de proteínas está desnaturada;

CN⁻: Íon cianeto;

Da: unidade de massa equivalente a 1/12 da massa carbono-12 (1 Dalton);

DNA: ácido desoxirribonucléico;

DSC: Calorimetria diferencial de varredura;

Gnd-CI: Cloreto de guanidina;

HoloMb: Mioglobina ligada ao grupo heme (forma holo);

HPLC: Cromatografia líquida de alta performance;

I: Estado intermediário;

I_a: Estado intermediário de apomioglobina de baleia formado durante a via de enovelamento e que possui as α -hélices AGH formando um domínio estruturado;

I_b: Estado intermediário de apomioglobina de baleia formado após a incorporação da hélice B no domínio AGH do I_a;

IPTG: Isopropil-beta-D-tiogalactopiranosídeo;

FPLC: Cromatografia Líquida de rápida performance;

Mb₁₋₁₂₃: Deleção da hélice H de MbWT;

Mb₁₋₉₉: Deleção das hélices G-H de MbWT;

Mb-B_GHA: Permutação da hélice A da parte N- para a C- terminal de MbWT;

Mb-C_GHAB: Permutação das hélices AB da parte N- para a C- terminal de MbWT;

Mb-HAB_F: Permutação da hélice H da extremidade C-terminal para a N-terminal e deleção da hélice G de MbWT;

MbWT: Mioglobina selvagem;

N: Estado nativo;

PCR: Reação em cadeia da polimerase;

pH: $-\log [H^+]$;

RMN: Ressonância magnética nuclear;

TCA: Tricloroacetato de sódio (CCl₃COONa);

T_m: Temperatura de transição;

D: Estado desenovelado;

UV: Ultravioleta.

RESUMO.

A mioglobina é uma hemoproteína que tem a função de transportar e armazenar o oxigênio. Suas estruturas primária e secundária são compostas por 153 aminoácidos e oito α -hélices (nomeadas de A-H), respectivamente. Esta proteína tem sido usada como um bom modelo para estudos de estrutura, função, ligação de heme, estabilidade e enovelamento de proteínas. Em condições ligeiramente ácidas (pH em torno de 4), a apomioglobina se desenovela passando por uma forma intermediária que possui propriedades físicas entre o estado nativo (pH 7) e o estado desenovelado (pH 2). Este intermediário apresenta as hélices A, G e H protegidas como demonstrado por experimentos de troca de deutério.

No presente trabalho, foram realizados estudos com mutantes de deleção e de permutações circulares de hélices da mioglobina com a finalidade de aumentar o conhecimento sobre como a estrutura terciária de uma proteína é construída. Três classes de mutantes foram criadas: 1) deleção de hélices: 1.1) um mutante de deleção da hélice H (Mb₁₋₁₂₃) e 1.2) um mutante de deleção das hélices G e H (Mb₁₋₉₉); 2) permutações circulares: 2.1) um mutante de permutação da hélice A da extremidade N-terminal para a C-terminal (Mb-B_GHA) e 2.2) um mutante de permutação das hélices A e B da extremidade N-terminal para a C-terminal (Mb-C_GHAB) e 3) permutação com deleção: um mutante de deleção da hélice G com permutação da hélice H da extremidade C-terminal para N-terminal (Mb-HAB_F).

As proteínas mutantes foram purificadas diretamente na forma apo, embora estes mutantes possuam capacidade de se ligar ao grupo heme, com exceção do mutante Mb₁₋₁₂₃. Estes mutantes possuem valores mais baixos de elipticidade molar e tendência maior à agregação do que a proteína selvagem. Quando na forma holo, os dois mutantes circularmente permutados são compactos e têm estrutura e função semelhantes à holoMbWT. Este resultado difere do resultado observado para as variantes de deleção (Mb₁₋₉₉ e Mb-HAB_F) que não apresentaram restabelecimento da estrutura e nem supressão da tendência à agregação. Nossos resultados indicam que, embora a mioglobina possua um núcleo de ligação do grupo heme, as hélices A, B, G e H são necessárias para a correta arquitetura da proteína. Apesar da menor estabilidade dos mutantes de

permutação circulares em relação à proteína selvagem, as extremidades N- e C-terminais da mioglobina são necessárias para que a proteína alcance uma estrutura estável e funcional semelhante à selvagem.

As permutações estruturaram a forma intermediária mesmo em pH ao redor de 7, mostrando novamente que as extremidades N- e C- terminais de mioglobina são necessárias para que elas se estruturam como a selvagem. Acreditamos que um núcleo, que se mostrou insensível ao desenovelamento em meio ácido, foi formado nestes mutantes. Como estes mutantes diferem quanto à posição da hélice B, eles permitiram inferir sobre a participação da hélice B no intermediário de ApoMbWT. Duas formas de intermediários estão provavelmente presentes na via de enovelamento da mioglobina e suas maiores diferenças parecem estar na quantidade de estrutura formada pela hélice B. Nossos resultados estão de acordo com o modelo seqüencial de enovelamento para mioglobina, no qual a hélice B é incorporada após a formação do domínio AGH.

ABSTRACT.

Myoglobin functions as a protein for transporting and storing oxygen and is a soluble, globular heme-binding protein, comprising 153 amino acids arranged in eight helical segments (named A to H). This protein has been used as a good model to study structure, function, heme binding, stability, and folding pathway. Under mild acid conditions (pH 4), apomyoglobin unfolds through an intermediate form with physical properties intermediate between the native (neutral pH) and the unfolded (pH 2.0) states. This intermediate has helices A, G and H protected from hydrogen exchange.

Here we present studies of deleted and circularly permuted mutations of helical blocks of myoglobin to add to our understanding of how protein topology is built. Three classes of mutants were constructed: 1) helix deletion: 1.1) a mutant deleted of H helix, Mb₁₋₁₂₃, and 1.2) a mutant deleted of G and H helices, Mb₁₋₉₉; 2) circularly permutation: 2.1) Mb-B_GHA where B-helix is N-terminal and A helix is C-terminal, and 2.2) Mb-C_GHAB where C-helix is N-terminal and B helix is C-terminal; 3) permutation/deletion: a deleted circularly permutation where H-helix is N-terminal, the G helix is deleted, and the F helix is C-terminal, Mb-HAB_F.

The mutants were purified in the apo form, where although they have the ability to bind heme with an exception to Mb₁₋₁₂₃, they have lower ellipticity and a larger tendency to aggregate than the wild-type. When in the holo form, the two circularly permuted mutants are compact and have native-like function and conformation, different from the myoglobin variants of deletion (i.e. Mb₁₋₉₉ and Mb-HAB_F), where the heme binding does not seem to be native-like and do not suppresses their tendency to aggregate. Our results indicate that although myoglobin has a core that is able to bind heme, the A, G, H and B helices are needed for the correct structural architecture of the protein. And, since the circularly permutations are less stable than the wild-type, the N- and C-termini of myoglobin need to be native-like for the optimum structure-function relationship of this protein.

The apopermuteds resembled the intermediate form even at physiological pH, showing again that the N- and C-termini of myoglobin need to be native-like for

the optimum structure-function relationship of this protein. We believe that a nucleus, mostly independent of acid unfolding, was formed by these mutants and, since these permutants differ in the position of the B helix, they gave insights about the participation of the B helix in the intermediate. Two forms of intermediates are likely to be present in the folding pathway of apomyoglobin and their major difference seems to be in the amount of structure in the B helix. Our results agreed with a model of sequential folding for apomyoglobin where the B helix is added later in the AGH nucleus.

1. INTRODUÇÃO.

1. 1. Enovelamento de proteínas.

O enovelamento de proteínas constitui um evento pós-traducional importante para que a proteína possa assumir, se enovelada corretamente, sua conformação tridimensional estável para a execução de sua função biológica. No entanto, o conhecimento básico do mecanismo molecular responsável por este enovelamento ainda permanece como um dos maiores desafios para a biologia estrutural. Um método utilizado para tentar entender este processo é a engenharia de proteínas, que possibilita a troca, a deleção e a permutação de resíduos de aminoácidos numa determinada estrutura primária. Este método ainda permite estudar a relação entre estrutura e função de proteínas que é importante para determinar domínios funcionais e estruturais, bem como a sua relevância para a estabilidade das proteínas. Este método é justificado pela teoria de que toda a informação necessária para o enovelamento de uma proteína está contida na sua seqüência de aminoácidos (Anfisen, 1973). Portanto, o conhecimento adquirido com estes estudos pode ajudar a desvendar a complicada tarefa de como ocorre o processo de enovelamento nas proteínas para podermos produzir novas proteínas que sejam funcionais e mais estáveis para a utilização em vários processos biotecnológicos. Uma outra importância deste conhecimento é entender como ocorre o processo de enovelamento que resulta em um enovelamento incorreto da proteína e que está associado a diversas doenças degenerativas tais como mal de Alzheimer, encefalopatia espongiforme bovina (mal da vaca louca) entre outras. As várias questões que têm surgido quanto aos mecanismos e as vias que uma proteína utiliza para atingir sua conformação tridimensional têm sido objetos de diversos estudos, uma vez que este entendimento pode preencher o fosso de informação que existe entre o conhecimento dos genes e a estrutura tridimensional das proteínas que eles codificam (Para revisões veja: Kuwajima, 1989; Kim e Baldwin, 1990; Ptitsyn, 1991; Matthews, 1993; Ptitsyn, 1995; Jaenicke, 1999, Baldwin e Rose, 1999a e 1999b; Dinner *et al.* 2000; Rumbley *et al.* 2001; Daggett e Fersht, 2003; Ferguson e Fersht, 2003).

1.1.1. Os mecanismos de enovelamento.

O enovelamento de proteínas não pode ser um processo randômico, uma vez que este processo levaria um tempo infinitamente longo para uma proteína testar todas as conformações possíveis. Segundo Levinthal (1969), este tempo aumentaria exponencialmente com o aumento da cadeia de aminoácidos, o que torna o processo improvável dado à rapidez com que o enovelamento ocorre. Esta consideração sugere a existência de mecanismos específicos que possam simplificar a formação de estruturas protéicas enoveladas, estáveis e funcionais. A procura destes mecanismos tem levado à proposição de alguns modelos de enovelamento de proteínas, os quais serão apresentados neste tópico. Anfinsen (1973) mostrou que a RNase A na presença de 8 M uréia e β -mercaptoetanol desenovelava e perdia sua função biológica, mas que após a remoção destes agentes desnaturante e redutor, respectivamente, a proteína se reenovelava e recuperava sua atividade biológica. Este trabalho serviu de suporte para a teoria que diz que as informações necessárias para a proteína se enovelar corretamente se encontram na sua estrutura primária (Anfinsen, 1973).

A partir destes estudos a área de enovelamento de proteínas ganhou grande impulso e diversos modelos foram propostos e debatidos para se tentar explicar como as proteínas se enovelavam. Os principais modelos propostos para este mecanismo de enovelamento foram: nucleação (Wetlaufer, 1973); “Framework” (Ptitsyn e Rashin, 1975; Kim e Baldwin 1982; Kim e Baldwin, 1990); quebra-cabeça (Harrison e Durbin, 1985); difusão-colisão (Karplus e Weaver, 1976); colapso hidrofóbico (Schellman, 1955; Kauzmann, 1959; Baldwin, 1989) e nucleação-condensação (Itzhaki *et al.*, 1995; Fersht, 1995; Fersht, 1997). Alguns avanços nos estudos experimentais aliados aos teóricos, onde a mecânica estatística e os modelos de mínimos energéticos (o estado conformacional de uma proteína está relacionado à sua energia mínima de estruturação) têm ganhado credibilidade, têm levado à introdução de uma nova visão sobre o enovelamento de proteínas que propôs o modelo do funil energético (Bryngelson *et al.* 1987; Sali *et al.*, 1994; Onuchic *et al.*, 1995; Dill e Chan, 1997). Esta visão sugere que o enovelamento segue a partir de um espaço conformacional mais amplo onde uma

proteína individual pode seguir rotas diferentes e paralelas que são capazes de resultar na formação de uma mesma conformação nativa. Contudo, alguns modelos defendem o enovelamento seqüencial e com intermediários definidos como o modelo hierárquico (Baldwin e Rose, 1999a e 1999b).

1.1.2. Intermediários na via de enovelamento.

Ptitsyn (1991) sugeriu um mecanismo de enovelamento de proteínas que ocorreria em três etapas: 1) formação muito rápida, de forma geral na escala de tempo em micro a milisegundos, de uma estrutura secundária; 2) colapso desta estrutura em uma forma compacta e sem conformação terciária rígida e 3) formação de estrutura nativa compacta. A presença de intermediários seria uma solução ao Paradoxo de Levinthal, pois a formação de estruturas parcialmente enoveladas restringiria o espaço conformacional. Contudo, a compreensão deste processo requer um melhor conhecimento das vias envolvidas, pois em muitos casos a estrutura nativa de uma proteína pode ser determinada mais pela via de enovelamento do que pela conformação mais estável (Baldwin, 1989).

As estruturas intermediárias são também observadas durante o estudo da cinética de enovelamento de proteínas pequenas (Kim e Baldwin, 1990). O problema prático para se estudar intermediários presentes nesta via é que as reações de enovelamento para essas proteínas são altamente cooperativas, sendo que os intermediários formados só existem nesta forma por um curto período de tempo (Kim e Baldwin, 1990). Contudo, as α -lactalbuminas, as lisozimas e as apomioglobinas são alguns exemplos de proteínas que apresentam intermediários em equilíbrio (Kuwajima, 1989; Kim e Baldwin, 1990). Os estudos desses intermediários têm ajudado a responder questões relacionadas à rapidez e à eficiência do enovelamento de proteínas. Mais detalhes sobre a estrutura e formação de intermediários estão descritos no item 1.2.3 que trata da apomioglobina e sua via de enovelamento.

1.2. Mioglobina como modelo biológico para estudo de enovelamento de proteínas.

1.2.1. Mioglobina: função biológica, ligação e coordenação do grupo heme.

A mioglobina é uma hemoproteína abundante nos músculos de mamíferos e que possui importante função de armazenamento de oxigênio. *In vivo*, sua função está associada à ligação reversível do oxigênio podendo também ligar outras moléculas, tais como CO₂, NO e CO (Antonini e Brunori, 1971). A capacidade da mioglobina em ligar o oxigênio depende da presença do grupo prostético (heme). Este grupo não polipeptídico consiste de uma protoporfirina (parte orgânica) e um átomo de ferro central (parte inorgânica) que em solução dá a mioglobina uma cor marrom avermelhada (Stryer, 1988). A protoporfirina é constituída de quatro anéis pirrólicos que formam o anel tetrapirrólico. O átomo de ferro da hemina está coordenado a quatro átomos de nitrogênio no centro do anel protoporfirínico (Fig. 1). Este ferro pode formar mais duas ligações que estão localizadas uma em cada lado do plano do anel protoporfirínico. Estas posições são nomeadas de quinta e sexta posições de coordenação. Este átomo de ferro pode ser encontrado no estado oxidado - férrico (3+) - ou reduzido – ferroso (2+) e, dependendo do seu estado de oxidação ($\text{Fe}^{3+} + e^- \leftrightarrow \text{Fe}^{2+}$), o sítio da sexta coordenação pode ficar desocupado ou ligado ao O₂, CO, NO ou ao isocianeto, quando no estado Fe²⁺, ou ligado ao CN⁻, N₃⁻, F⁻, SCN⁻, NO₂⁻ ou ao NO quando no estado Fe³⁺ (Antonini e Brunori, 1971).

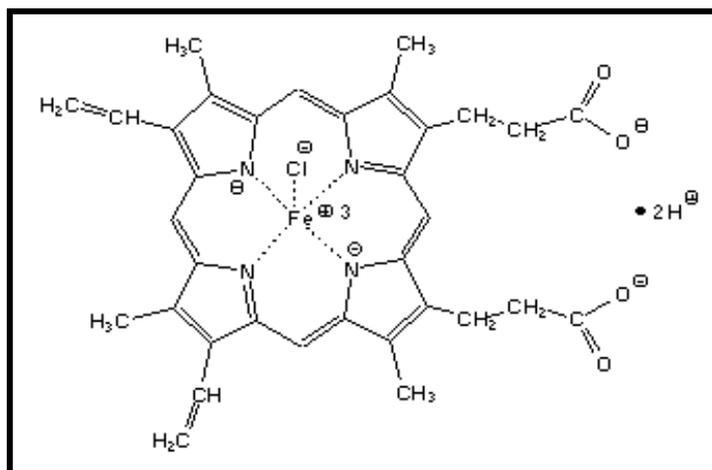


Figura 1 – **O grupo prostético heme.** O grupo heme é constituído de uma protoporfirina (parte orgânica) e um átomo de ferro central (parte inorgânica).

Quando ligado à molécula de mioglobina, o grupo heme se localiza em uma cavidade onde suas cadeias laterais, altamente polares devido ao propionato, estão na superfície da proteína e se encontram ionizados em pH fisiológico (Hargrove e Olson, 1996). O resto da estrutura do grupo heme é encontrado no interior da mioglobina, onde permanece cercado por resíduos apolares, com exceção de duas histidinas (Fig. 2B). O átomo de ferro está diretamente ligado, mas não covalentemente ligado, à His 93 (sétimo resíduo da hélice F – F7) conhecida como histidina proximal, a qual ocupa a quinta posição de coordenação. Este átomo de Fe está posicionado 0,3 Å fora do plano da porfirina na direção da His 93. O sítio de ligação ao oxigênio encontra-se no outro plano que está direcionado para a sexta posição de coordenação, onde se encontra a segunda histidina que está diretamente ligada ao ligante (Ex.: oxigênio), a His 64 (E7). Esta histidina é denominada de distal por não estar diretamente ligada ao Fe do grupo heme como ocorre com a histidina proximal. Estas interações causam mudanças conformacionais na apomioglobina, resultando em uma estrutura mais compacta com aumento de aproximadamente 20% no teor de α -hélice (Breslow et al. 1965), que está relacionado à estruturação da hélice F (Cocco e Lecomte, 1994; Eliezer e Wright, 1996). O aumento do teor de estrutura secundária do tipo α -hélice e os baixos valores das constantes de dissociação da ligação do grupo heme com a mioglobina (na ordem de 10^{-12} – 10^{-15} M) implicam num alto grau de especificidade deste processo de ligação (Hargrove *et al.*, 1996a). Os resíduos de mioglobina envolvidos na coordenação do grupo heme estão destacados na Figura 2B.

Normalmente, a coordenação do grupo heme à proteína produz uma intensa coloração marrom avermelhada na solução que está relacionada às transições eletrônicas envolvendo os orbitais moleculares da porfirina do grupo heme. Estas transições são influenciadas pelo tipo de ligação que as porfirinas fazem com as proteínas, pelo estado de oxidação do Fe que compõe o grupo heme, pela ligação axial do ferro à proteína e pela polaridade do meio que circunda o grupo heme (cavidade de ligação ao grupo heme) que é dependente do enovelamento da cadeia polipeptídica. Estes eventos são responsáveis pelas modificações no espectro de absorção das hemeproteínas, que é caracterizado

pela presença de duas bandas de absorção (Eaton e Hofrichter, 1981). Uma banda é delimitada pelo intervalo entre 390 e 450 nm e é denominada de banda de Soret ou banda B. A outra banda está no intervalo entre 500 e 600 nm e é denominada de banda visível ou banda Q. A banda Soret é tipicamente 5 a 10 vezes mais intensa que a banda que ocorrem na região espectral do visível. Estas características contribuem para que as bandas de absorção referentes à coordenação do grupo heme nas hemoproteínas constituam sondas importantes no monitoramento de mudanças conformacionais destas proteínas.

Figura 2 – **Estrutura da mioglobina selvagem de baleia (*Physeter catodon*).** **A) Estrutura secundária e terciária da holoMb.** As α -hélices que compõem a estrutura secundária da mioglobina estão nomeadas de A à H. O grupo heme está evidenciado pela cor amarela. Os resíduos destacados em vermelho e laranja mostram as histidinas 64 (distal) e 93 (proximal), respectivamente. Estes resíduos são responsáveis pela coordenação do grupo heme e constituem a quinta (His93) e a sexta (His64) posições de coordenação. O desenho foi obtido através da modelagem da estrutura de mioglobina extraída de um banco de dados de estrutura de proteínas (PDB, <http://www.rcsb.org/pdb>), código 5MBN, utilizando os recursos do programa *WebLab ViewerLite 3.7 (Molecular Simulations Inc)*. **B) Esquema da estrutura primária e secundária.** A estrutura primária da mioglobina está representada pelas letras códigos de cada aminoácido e os aminoácidos que formam as α -hélices estão sombreados pela cor cinza. As hélices são nomeadas de A - H. As histidinas distal e proximal estão marcadas em vermelho e laranja, respectivamente, e os demais resíduos que são importantes para a coordenação e a estabilidade da ligação do grupo heme estão destacados pela cor vinho (Hargrove *et al.*, 1996a).

1.2.2. Holo e apomioglobina.

A mioglobina (Mb) de baleia (*Physeter catodon*), é uma proteína globular de massa molecular de 17 kDa (153 aminoácidos), monomérica e que possui 8 α -hélices que são nomeadas de A - H (Takano, 1977) (Fig. 2B). Sua função, sua estrutura e sua via de enovelamento já foram extensamente estudadas (revisões recentes constam em Wright e Baldwin, 2000; Brunori, 2000; Wittenberg e Wittenberg, 2003). A habilidade de mioglobina ligar oxigênio depende da presença do grupo heme. Quando o grupo heme é retirado, a forma apo da mioglobina (ApoMb) ainda mantém a solubilidade, porém em concentrações mais baixas, e muitas das suas características estruturais. As principais diferenças são a perda da cor vermelha, menor elipticidade (-25.000 versus $-18.000 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$) (Breslow *et al.*, 1965), menor estabilidade (Griko *et al.*, 1988) e menor compactação (Nishii *et al.*, 1994). A apomioglobina (estado nativo) perde principalmente a estruturação da hélice F em relação à forma holo (Eliezer e Wright, 1996) e não possui características de 'molten globule' (Eliezer e Wright, 1996; Ribeiro e Ramos, nesta tese – item 9.2). Contudo, o seu desenovelamento, diferente da forma holo, não é do tipo dois estados (Ramos *et al.*, 1999).

1.2.3. Apomioglobina e sua via de enovelamento.

A ApoMb é considerada um ótimo modelo para o estudo de intermediários da via de enovelamento de proteínas (por exemplo: Hughson *et al.*, 1990; Kay e Baldwin, 1996 e Ramos *et al.*, 1999). Durante o desenovelamento induzido pela redução do pH, a ApoMb forma um intermediário em pH próximo de 4,2 com propriedades físicas tanto do estado enovelado (pH 7) quanto do desenovelado (pH 2) (Griko *et al.*, 1988). As principais características são: elipticidade molar de aproximadamente $-14.000 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$, perda global de estrutura secundária, mas com as hélices A, G e H (Hughson *et al.*, 1990) e provavelmente uma parte da B (Loh *et al.*, 1995; Eliezer *et al.*, 1998) mais estruturadas, triptofanos parcialmente expostos (Kirby e Steiner, 1970) e estrutura terciária menos compacta que a forma nativa (Eliezer *et al.*, 1995).

A caracterização mais detalhada desse intermediário foi feita por experimentos de troca de deutério (Hughson *et al.*, 1990; Jennings e Wright,

1993). Estes estudos mostram que o estado intermediário apresenta maior estruturação das hélices A, G e H em relação às demais hélices (Hughson *et al.*, 1990) e que esta estrutura está presente na via de enovelamento da mioglobina (Jennings e Wright, 1993). Estes resultados sugerem que a formação deste intermediário é uma etapa importante para que a ApoMb atinja seu estado nativo. A natureza da participação das hélices A, B, G e H na formação do intermediário em pH 4 foi estudada em diversos trabalhos utilizando mutagênese sítio-dirigida (Kay *et al.*, 1999; Luo e Baldwin, 2001; Sirangelo *et al.* 2002; e muitos outros). As observações destes estudos suportam a teoria de um enovelamento seqüencial com subsequente incorporação das hélices que ainda estão desordenadas resultando na formação de uma proteína com estrutura compacta e estável (Loh *et al.*, 1995).

Jennings e Wright (1993) mostraram que os últimos resíduos da hélice B também estão protegidos e sugerem que esta hélice está incorporada parcialmente ao domínio do intermediário durante o enovelamento. Outros trabalhos também sugerem a presença de dois intermediários na via de enovelamento desta proteína (Loh *et al.*, 1995; Kiefhaber e Baldwin, 1995; Jamin e Baldwin, 1996; Eliezer *et al.*, 1998; Nishimura *et al.*, 2003). O restante da hélice B é incorporado após a formação deste primeiro intermediário. A incorporação seqüencial da hélice B, no intermediário (pH 4), é apoiada por experiências de troca de deutério na presença de TCA 20 mM (Loh *et al.*, 1995). A adição de TCA aumenta a elipticidade e a estabilidade do intermediário que tem um fator mais elevado de proteção para as hélices de A, G e H e para a hélice B (Loh *et al.*, 1995). Um aumento dos valores da elipticidade e da estabilidade relativa do intermediário em pH 4 também é mostrado quando a hélice B é estabilizada pela mutação dos resíduos G23 e G25 por alaninas (Kiefhaber e Baldwin, 1995). Jamin e Baldwin (1998) identificaram duas formas de intermediários, I_a e I_b, que coexistiriam em pH 4 em um equilíbrio que depende do pH, da concentração de uréia e de ânions. A evidência para os dois intermediários vem da diferença entre os espectros de emissão de fluorescência da proteína entre pHs 3,4 e 4,2 e do aumento da sua fluorescência quando se usa uréia 1 M. A conclusão foi que I_a não teria a hélice B ainda formada e seria a única forma em pH 3,4. Em pH 4,2 a forma

dominante seria Ib, com a hélice B total ou parcialmente formada, que seria a primeira a se desenovelar em presença de 0 a 1M uréia, onde apenas Ia estaria presente. Eliezer *et al.* (1998) mostraram com mais detalhe a composição estrutural do intermediário através de experimentos de ressonância magnética nuclear. Este trabalho mostra que a hélice B está mais estruturada no intermediário em pH 4, sugerindo que o domínio de A[B]GH é o núcleo deste intermediário. Estes resultados foram confirmados por experimentos de simulação feitos por Onufriev *et al.* (2003). Nishimura *et al.* (2002 e 2003), estudando a troca de hidrogênio avaliada pela espectrometria de massa em mutantes de Mb mostraram proteções diferentes para os vários resíduos da hélice B, sugerindo que esta esteja parcialmente enovelada no intermediário. Em conjunto, estes resultados demonstram maior estruturação para a porção C-terminal da hélice B do que para a sua porção N-terminal.

1.3. O uso de deleção e de permutação nos estudos da estrutura, função e enovelamento de proteínas.

Na hierarquia da estrutura de proteínas, as estruturas pregueadas e as hélices são os blocos básicos responsáveis pela montagem da topologia de uma proteína (Chotia, 1984; Woolfson *et al.*, 1993). Para aprofundar este entendimento, estudos sobre proteínas mutantes de deleções em série e de permutações circulares permitem a identificação de regiões em uma proteína que podem estar envolvidas com sua topologia, sua via de enovelamento e a sua função.

As deleções em série são geralmente obtidas através de técnicas de engenharia genética (alguns exemplos podem ser vistos em Ramos, 1999 e Grandori *et al.*, 2000). Outra possibilidade é a digestão química ou enzimática de proteínas e a posterior purificação dos fragmentos que são eleitos como alvo do estudo (De Sanctis *et al.*, 1986). Com relação às permutações, estas proteínas podem ser obtidas através da união de suas extremidades N- e C- terminais (circularização da proteína) que posteriormente podem ser submetidas à clivagem seriada permitindo a criação de novas extremidades N-terminais e a identificação de elementos de enovelamento (Iwakura *et al.*, 2000). Ainda nas permutações, a união das unidades a serem permutadas pode ser feita pela ligação peptídica entre as extremidades N- e C- terminais, quando estas partes se encontram próximas na estrutura nativa selvagem, ou através de engenharia de proteína que permite a ligação em série de dois cDNAs de uma mesma proteína, em geral ligadas por 5 a 16 aminoácidos com propensão à formação de uma estrutura secundária mais flexível, como ocorre nas seqüências formadas por serinas e glicinas (Heinemann e Hahn, 1995).

De forma geral, a importância destes métodos para estudar proteínas pode ser identificada por um grande número de trabalhos que utilizam estas estratégias, por exemplo: funcionalidade de permutações circulares de inibidor de tripsina pancreática bovina (Goldemberg e Creighton, 1983); reações enzimáticas de mutantes de permutação da beta alfa barril (Luger *et al.*, 1989); estrutura e estabilidade de permutações da lisozima T4 (Zhang *et al.*, 1993); enovelamento de mutantes de deleção do inibidor da quimotripsina-2 (de Prat-Gay *et al.*, 1995); via

de enovelamento de mutantes circularmente permutados do domínio da α -spectrina SH3 (Viguera *et al.*, 1995); deleção em série para mapear regiões funcionais da subunidade do sistema inibitório da troponina (Ramos, 1999); e deleções e permutação de resíduos da dihidrofolato redutase para estudo de sua estrutura e estabilidade (Smith e Matthews, 2001). Entretanto, muito ainda tem de ser compreendido sobre o efeito destas mudanças na função e na estabilidade das proteínas. Portanto, a análise dos efeitos das deleções e das permutações em outras proteínas pode ajudar a adicionar dados para maior compreensão e para a elaboração de um modelo geral sobre a estrutura, a função e a via de enovelamento de proteínas. Neste contexto, a mioglobina constitui um dos melhores representantes da família das globinas para a execução deste tipo de estudo, uma vez que sua função, sua estrutura e sua via de enovelamento já foram extensamente estudadas.

A utilização de deleções de hélices em Mb sugere pequenos efeitos em sua função (De Sanctis *et al.*, 1994; De Sanctis *et al.* 1986; Grandori *et al.*, 2000). Estes estudos foram feitos com Mbs de coração de cavalo, que foram submetidas à digestão enzimática, que são formadas apenas pelos resíduos 32 ao 139 (De Sanctis *et al.*, 1994; De Sanctis *et al.* 1986), e com Mb recombinante da baleia formadas apenas pelos resíduos 29 ao 105 (Grandori *et al.*, 2000) e mostraram que estes núcleos mínimos são capazes de ligar o grupo heme. Entretanto, a forma apo de uma série de mutantes de deleção da extremidade C-terminal é mostrada na maior parte como uma estrutura desenovelada (Grandori *et al.*, 2000; Chow *et al.* 2003) e com grande tendência à formação de agregados (Chow *et al.*, 2003). Adicionalmente, a forma apo da Mb da musculatura do coração de cavalo formadas pelos resíduos 32 ao 139 (apo-mini-Mb) apresentou um intermediário parcialmente enovelado em pH 4,7, apesar da ausência da hélice A e de grande parte da hélice H que são hélices importantes para a estabilidade do intermediário da ApoMb (De Sanctis *et al.*, 1994). O grupo de Brunori interpretou estes resultados sugerindo que a aquisição de um estado enovelado de Apo-mini-Mb ocorreria através de uma via alternativa que pode ou não ser seguida pela ApoMbWT. Estes experimentos contradizem outras evidências experimentais que indicam que apenas as hélices A, G e H fariam parte de um intermediário

obrigatório da via de enovelamento da apomioglobina (Hughson *et al.*, 1990; Eliezer *et al.*, 1998; Kay *et al.*, 1999; Tcherkasskaya e Ptitsyn, 1999). Recentemente uma Mb, onde a hélice H é N-terminal e a hélice G é C-terminal, foi caracterizada, e os resultados mostram que esta permutéina atinge um estado enovelado e funcional com características similares ao estado nativo da Mb selvagem (Fishburn *et al.*, 2002).

1.4. Espectroscopia no estudo de mioglobina.

1.4.1. Dicroísmo circular.

O dicroísmo circular (CD) é um fenômeno que ocorre quando a luz circularmente polarizada interage com um cromóforo opticamente ativo (assimétrico) (para revisão: Kelly e Price, 1997). Nas proteínas, os cromóforos mais opticamente ativos são as ligações amídicas (sonda de estrutura secundária) e as estruturas aromáticas (sondas de estrutura terciária) que são melhor caracterizadas na região do ultravioleta distante (abaixo de 250 nm) e ultravioleta próximo (250-300 nm), respectivamente. Conseqüentemente, os espectros de CD podem ser usados na detecção de mudanças estruturais de proteínas, induzidas por agentes químicos e físicos, e no auxílio de cálculos da quantidade de estrutura secundária (para revisão: Kelly e Price, 1997). Adicionalmente, o dicroísmo circular também pode ser utilizado para a determinação de elementos de estruturas terciárias (Venyaminov e Vassilenko, 1994). Neste contexto, as proteínas têm sido divididas em cinco classes baseadas na sua estrutura secundária (Levitt e Chothia, 1976): 1) toda $-\alpha$ (principalmente α - hélices), 2) toda $-\beta$ (principalmente folhas $-\beta$ pregueadas), 3) $\alpha + \beta$ (regiões α e β separadas), 4) α/β (regiões com α e β misturadas) e 5) randômica (predominantemente desordenada). Manavalan e Johnson-Jr (1987) sugeriram que seria possível identificar uma classe estrutural de uma proteína através da inspeção visual de seu espectro de dicroísmo circular. Eles encontraram que as estruturas toda $-\alpha$ (principalmente α - hélices) mostram valores negativos pronunciados nos sinais de CD em 222 e em 208 nm e pronunciados valores positivos nos sinais entre 190 nm e 195 nm. Proteínas com toda a sua estrutura em α -hélices podem ser

distinguidas de proteínas contendo alguma estrutura β pela mudança de sinal do CD de negativo para positivo nos comprimentos de onda abaixo de 180 nm. As proteínas com estruturas $\alpha + \beta$ podem ser distinguidas das estruturas α/β pela razão relativa dos sinais em 222 e em 208 nm. Nos tipos $\alpha + \beta$ o sinal em 208 nm é maior do que o sinal em 222 nm, enquanto estas amplitudes relativas em α/β são inversas. Estes sinais característicos podem ser avaliados em programas computacionais já existentes que podem dar maior precisão na estimativa dessas classes de estruturas (Greenfield, 1996). Segundo a classificação das proteínas através da estrutura secundária, que foi proposta por Levitt e Chothia (1976), a mioglobina é uma proteína pertencente à classe 1, pois é formada principalmente por α -hélices. Desta forma, as mudanças estruturais que possam ocorrer nesta proteína, quando submetida a variações do meio (exemplo: variação de temperatura, de concentração de uréia ou de pH), podem ser facilmente monitoradas a partir da inspeção do espectro de CD, principalmente na região do ultravioleta distante, e do sinal dicróico em 222 nm (como exemplo desta aplicação veja anexo, item 9.2).

1.4.2. Fluorescência.

A emissão de fluorescência é um fenômeno físico que ocorre quando um elétron retorna de um estado excitado para o estado basal. Quando no estado excitado, alguma energia é sempre perdida por outros processos não radioativos tais como: energia vibracional e calor. Conseqüentemente, a energia da luz emitida é sempre menor que a energia da luz absorvida (luz de excitação) o que resulta em uma emissão de fluorescência do cromóforo em comprimentos de ondas maiores que o de sua absorção. As proteínas possuem três aminoácidos que podem contribuir para a fluorescência intrínseca, que são: triptofano (Trp), tirosina (Tyr) e fenilalanina (Phe). A emissão de fluorescência do Trp é muito sensível ao solvente, logo este resíduo é uma sonda muito útil no estudo de mudanças conformacionais nas proteínas. Os comprimentos de excitação usados para excitar estes resíduos estão no intervalo entre 260 e 295 nm. Para separar as contribuições de Tyr e Trp podem ser usados 260 nm para seleção do espectro de Tyr e 295 nm para espectro de Trp. Após a excitação, o Trp emite uma

fluorescência em comprimentos de ondas maiores que dá informações sobre o grau de exposição deste fluoróforo ao solvente. Geralmente, quanto maior o comprimento de onda de emissão maior é o grau de exposição deste fluoróforo. A contribuição da emissão de fluorescência é atribuída em maior escala ao Trp em relação a Tyr. Contudo, dependendo da proporção destes fluoróforos e da proximidade entre eles, podemos observar comportamentos diferenciados do espectro de emissão de fluorescência, tais como: supressão de fluorescência e deslocamento do máximo de emissão.

A mioglobina, que é um dos modelos biológicos no estudo de enovelamento de proteínas, possui na sua estrutura primária dois triptofanos que estão localizados na hélice A (Trp7 e Trp14) e que têm sido bastante utilizados como sondas de estrutura terciária (Veja revisão: Postnikova, 1999). Estes triptofanos se encontram voltados para o interior da proteína em pHs maiores que 5,0 e são muito sensíveis às variações do ambiente, tais como: concentração de agentes caotrópicos, pH e temperatura. Como exemplo desta sensibilidade podemos comentar o desenovelamento em meio ácido de ApoMb. Neste desenovelamento, à medida que o pH do meio varia de 5,0 para 4,0, a apomioglobina apresenta um aumento no valor da intensidade de emissão de fluorescência junto com um deslocamento, para o vermelho, do comprimento de onda máximo ($\lambda_{\text{máx}}$) de emissão de fluorescência. A partir do pH 4,0, os valores da intensidade de emissão de fluorescência diminuem à medida que os valores de pH diminuem, enquanto o $\lambda_{\text{máx}}$ de emissão de fluorescência se desloca para o vermelho (Kirby e Steiner, 1970; Irace *et al.*, 1981; Postnikova *et al.*, 1991). Estas variações que ocorrem nos valores de intensidade e de $\lambda_{\text{máx}}$ de emissão de fluorescência constituem uma ferramenta poderosa no estudo de desenovelamento e enovelamento de mioglobina e pode fornecer informações sobre a estabilidade (Ramos *et al.*, 1999), via de enovelamento (Jamin e Baldwin, 1996 e 1998) e estrutura terciária desta proteína (ver como exemplos: Kay e Baldwin, 1996; Postnikova, 1999).

2. OBJETIVOS.

Para compreender mais sobre o papel da disposição das hélices, que estão descritas como sendo importantes na formação dos intermediários (Fig. 3), na estrutura, função e na via de enovelamento da mioglobina (Mb) uma série de mutantes de deleção e de mutantes de permutação desta proteína foram preparados. Estes mutantes podem ser divididos em três classes distintas: i) mutantes com deleção das hélices H (Mb₁₋₁₂₃) e GH (Mb₁₋₉₉); ii) duas permutações circulares das extremidades N-terminais: a Mb-B_GHA (hélice B é N-terminal e a hélice A é C-terminal) e a Mb-C_GHAB (hélice C é N-terminal e a hélice B é C-terminal) e iii) uma permutação linear C-terminal, onde a hélice H é N-terminal, a hélice G foi deletada e a hélice F é a extremidade C-terminal (Mb-HAB_F). As características destes mutantes foram determinadas por métodos espectroscópicos e hidrodinâmicos e estão detalhadas nesta tese.

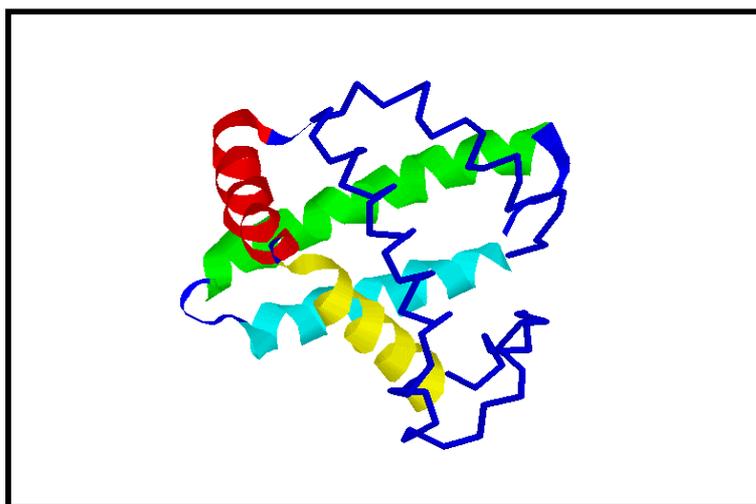


Figura 3 - **Esquema da estrutura terciária de Mb destacando as hélices envolvidas na formação dos intermediários de enovelamento.** As hélices AGH, que formariam o intermediário proposto por Hughson *et al.* (1990), mais a hélice B, que incorporado ao domínio AGH formaria um outro intermediário como proposto por Loh *et al.* (1995), estão evidenciadas pelas cores vermelha (A), amarela (B), ciano (G) e verde (H). As demais hélices (C, D, E e F), que estariam desestruturadas nos intermediários, estão marcadas em azul escuro.

3. MATERIAL E MÉTODOS.

3.1. Construção, clonagem, expressão e purificação de mutantes de permutação e de deleção de hélices da mioglobina selvagem de espermacete (*Physeter catodon*).

3.1.1. Construção, clonagem, expressão e purificação do mutante de deleção da hélice H.

Este item está descrito no manuscrito que se encontra no anexo (item 9.1): Ribeiro-Júnior, E. A., Regis, W. C. B., Tasic, L. and Ramos, C. H. I. (2003). **Fast purification of the Apo form and of a non-binding heme mutant of recombinant sperm whale myoglobin.** *Protein Expres. Purif.* **28**, 202-208.

3.1.2. Construção e clonagem do mutante de deleção das hélices GH.

Os métodos para a construção deste mutante foram os mesmos descritos para o mutante de deleção da hélice H (ver item 3.1.1). Para a deleção das hélices GH foram utilizados os oligonucleotídeos Pro100*GHdel (insere um códon para parada de transcrição (*) na posição da prolina 100 da MbWT – Tabela 1) para extensão no sentido 5'→3', juntamente com o oligonucleotídeo GHCTPCR (Tabela 1) para extensão da fita complementar (sentido 3'←5'). Esse oligonucleotídeo Pro100*GHdel também inseriu um sítio de restrição *SphI* no produto de PCR, enquanto que o oligonucleotídeo GHCTPCR manteve o sítio de restrição *XhoI*. Esta estratégia possibilitou a dupla digestão do produto de PCR e do vetor pT7-7MbWT com as enzimas de restrição (*SphI* e *XhoI*) para a clonagem conforme está descrito para a deleção da hélice H (Item 3.1.1).

3.1.3. Construção e clonagem dos mutantes de permutação da hélice H e deleção da hélice G e de permutação das hélices A e AB.

Os oligonucleotídeos utilizados nas construções dos mutantes de mioglobina estão documentados na Tabela 1. Para cada amplificação foi utilizado um par de oligonucleotídeos, um deles estendeu a fita no sentido 5'→3' e o outro

estendeu a fita no sentido complementar (3'←5'). O primeiro oligonucleotídeo contém um sítio para a enzima de restrição, *NdeI*, que serviu para a clonagem e mudança do sítio de iniciação da transcrição. O segundo oligonucleotídeo contém um sítio de restrição (*BamHI* ou *Sall*), que serviu para clonagem, e um códon de parada de transcrição. Esta estratégia está mostrada na Figura 4, onde a obtenção do cDNA da mioglobina mutante que possui permutação da hélice H, da parte C-terminal para a N-terminal, e não possui a hélice G foi usada como exemplo. Nesta construção, os oligonucleotídeos Gly124^{NdeI}Hperm e Pro100*GHperm (Tabela 1) se anelaram nas fitas molde 5'→3' e 3'←5', respectivamente. A fita molde utilizada neste processo de permutação foi feita a partir de dois cDNAs de mioglobina selvagem (*Physeter catodon*), que foram unidos em série por uma seqüência de nucleotídeos que codificam quatro pares de serinas e glicinas também em série – (SG)₄, com um códon de parada de transcrição localizado no segundo cDNA. Esta seqüência está clonada em um vetor de expressão pT7-7a (Amershan Life Science) e foi produzida por Ramos (esta construção é descrita pela primeira vez nesta tese de doutoramento - ver apêndice, item 7.1). O produto de amplificação que foi obtido pelo método de PCR apresentou um sítio para a enzima *NdeI* e o códon de iniciação de transcrição (Met) na posição do códon para Gly124 referente à primeira mioglobina e um códon de parada de transcrição na posição Pro100 referente à segunda mioglobina, além do sítio para a enzima *Sall* que está localizado após o códon da Pro100. Este produto de PCR foi digerido por estas duas enzimas de restrição (*NdeI* e *Sall*) para possibilitar a clonagem no vetor de expressão pT7-7a previamente digerido pelas mesmas enzimas de restrição. O novo cDNA (cDNA2Mb) codifica uma proteína que se inicia pelo códon de Met (atg), seguido do resíduo Ala125 (início da hélice H) e termina no resíduo Ile99 (último resíduo entre as hélices FG). Seguindo este tipo de estratégia, as combinações dos oligonucleotídeos Glu18^{NdeI}Aperm mais Ala19*Aperm e Lys34^{NdeI}ABperm mais Ser35*ABperm (Tabela 1) foram utilizadas nas construções das permutações Mb-B_GHA e Mb-C_GHAB, respectivamente.

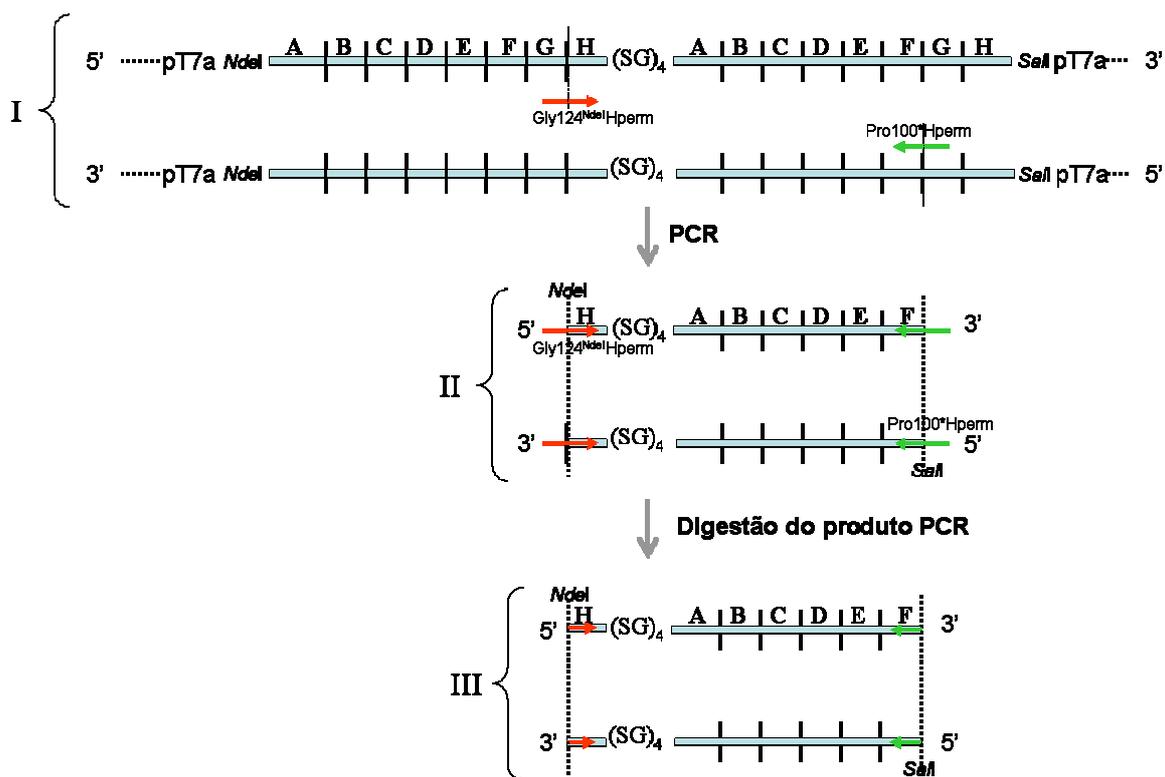


Figura 4 – **Construção do mutante com permutação da hélice H e deleção da hélice G de MbWT.** (I) Esquema das fitas molde 5'→3' e 3'←5' do cDNA das duas mioglobinas clonadas em pT7-7a. As letras A até H no topo dos esquemas I à III representam as hélices da mioglobina que são decodificadas a partir deste cDNA. (SG)₄ representa a junção entre os dois cDNAs de mioglobina composta dos códons que codificam quatro duplas de serinas e glicinas. As setas vermelhas (Gly124^{Ndel}Hperm) e verdes (P100*GHperm) representam os oligonucleotídeos para a realização do PCR (Tabela 1). (II) Esquema do produto de PCR que codifica a seqüência de uma mioglobina com a hélice H permutada da parte C-terminal para a N-terminal e que não possui a hélice G. (III) Produto de PCR digerido pelas enzimas de restrição *Ndel* e *SalI* para a clonagem em vetor de expressão. As linhas pontilhadas na posição vertical indicam a região de clivagem das enzimas de restrição.

Tabela 1 – Oligonucleotídeos para construção de mutantes.

Sigla ¹	Seqüência ²
Gly124*Hdel	5' accctgagc gtcgcact cagaagtcacctgg 3' (a)
Pro100*GHdel	5' tcgcatgctactaaacataagatt taa atcaaatacctg 3' (b)
Gly124 ^{Ndel} Hperm	5' caggtgaccat atg gctgacgctc 3'
Pro100*GHperm	5' aattccaggat ccgatt tagatcttatgt 3' (b)
Glu18 ^{Ndel} Aperm	5' gtttgggctaaacat atg gctgacgctcgt 3'
Ala19*Aperm	5' atgaccagggat ccc ttattcaacttagcc 3' (b)
Lys34 ^{Ndel} ABperm	5' ttgattcgactgcat atg tctcatccggaa 3'
Ser35*ABperm	5' cagag gatcc ggatg ttatt gaacagtc 3' (b)
GHCTPCR	5' gtccca attactcc atgcccc cagctg ttccggaa 3' (c)

¹As siglas dos oligonucleotídeos indicam as letras códigos e a posição do aminoácido que vai ser trocado, qual a principal mutação que vai ser inserida e a finalidade do oligonucleotídeo. Exemplos: Gly124*Hdel - mutação do códon referente a Gly124 da mioglobina selvagem por um códon de parada de transcrição (*) para deleção da hélice H (Hdel); Gly124^{Ndel}Hperm - mutação do códon referente a Gly124 da mioglobina selvagem por um sítio de *Ndel* e códon de iniciação de transcrição (^{Ndel}) para permutação da hélice H (Hperm).

²As seqüências em negrito representam os códons de iniciação (**atg**) e de parada de transcrição (**tga** ou **taa**), enquanto que as seqüências sublinhadas representam os sítios de restrição criados.

(a) este oligonucleotídeo insere um sítio de restrição para *SalI* (**gtcgcac**) para clonagem em vetor de expressão.

(b) Estes oligonucleotídeos inserem um sítio de restrição para *BamHI* (**ggatcc**) que serve para clonagem em vetor de expressão.

(c) GHCTPCR é usado na mutação de deleção das hélices GH. Este oligonucleotídeo inicia seu pareamento na posição N152 de Mbwt e vai até o 31º nucleotídeo no vetor pET3a ou pT7-7a, onde o cDNA de Mbwt está clonado. Este oligonucleotídeo mantém os dois códons de parada de transcrição da Mbwt (**attact**) e o sítio para enzima de restrição *KpnI* (**ccatgc**) e insere um sítio para *SalI* (**cagctg**). Estes dois sítios de enzima de restrição possibilitam a digestão do produto de PCR para a clonagem em vetor de expressão (pET3a ou pT7-7a).

3.1.4. Expressão e purificação dos mutantes de deleção das hélices GH, de permutação da hélice H e deleção da hélice G e de permutação das hélices A e AB.

As proteínas foram purificadas conforme descrito nas duas referências abaixo que estão inseridas nos anexos (itens 9.1 e 9.2).

Ribeiro-Júnior, E. A., Regis, W. C. B., Tasic, L. and Ramos, C. H. I. (2003). **Fast purification of the Apo form and of a non-binding heme mutant of recombinant sperm whale myoglobin.** *Protein Expres. Purif.* **28**, 202-208;

Ribeiro-Júnior, E. A. and Ramos, C. H. I. (2004) **Origin of the anomalous circular dichroism spectra of many apomyoglobin mutants.** *Analytical Biochemistry*, no prelo.

3.2. Determinação da concentração, preparação da forma ligada ao grupo heme, espectroscopia de absorção, espectropolarimetria de dicroísmo circular e desenovelamento induzido por uréia e por pH.

Estes métodos estão descritos nas duas referências abaixo que estão nos anexos (itens 9.1 e 9.2) e as informações adicionais para cada experimento estão contidas nas legendas das figuras.

Ribeiro-Júnior, E. A., Regis, W. C. B., Tasic, L. and Ramos, C. H. I. (2003). **Fast purification of the Apo form and of a non-binding heme mutant of recombinant sperm whale myoglobin.** *Protein Expres. Purif.* **28**, 202-208;

Ribeiro-Júnior, E. A. and Ramos, C. H. I. (2004) **Origin of the anomalous circular dichroism spectra of many apomyoglobin mutants.** *Analytical Biochemistry*, no prelo.

3.3. Fluorescência estática.

Os experimentos de fluorescência foram realizados utilizando um fluorímetro de fase-multifreqüência (ISS K2), cubetas de quartzo de 1 cm x 1 cm de caminho ótico e 1 a 2 μ M de proteínas. Os programas utilizados para registro e

análise dos dados foram o ISS (ISS) e o Origin[®] versão 6,1 (Microcal[™]). A temperatura da câmara de leitura foi mantida a 4 °C através de um controlador de temperatura digital Multi Temp III (Pharmacia Biotech). Os espectros de fluorescência foram obtidos utilizando o comprimento de onda (λ) de excitação de 280 nm, fendas de excitação e de emissão de 4 nm e de 16 nm, respectivamente. Os pontos para composição do espectro de emissão foram coletados a cada 1 nm dentro do intervalo de 300 a 450 nm com velocidade de varredura de 50 nm/min. Os dados foram analisados em função da intensidade de fluorescência em 330 nm e/ou cálculo do centro de massa espectral, $\langle \lambda \rangle$, definido pela equação abaixo. As informações adicionais de cada experimento estão descritas nas legendas das figuras.

$$\langle \lambda \rangle = \frac{\sum(\lambda_i \times F_i)}{\sum F_i} \text{ (Eq. 01),}$$

onde λ_i corresponde aos comprimentos de onda utilizados para a aquisição do espectro de fluorescência, F_i é a intensidade de fluorescência em λ_i e $\sum F_i$ é a somatória de F_i .

3.4. Tempo de vida de fluorescência.

As medidas do tempo de vida de fluorescência foram feitas no intervalo de 4-200 MHz utilizando um fluorômetro de modulação e fase com correlação cruzada e multi-freqüência (ISS K2). A excitação foi feita em 280 nm. A emissão foi observada usando um filtro óptico de 310 nm (Edmund Industrial Optics). O decaimento da intensidade de fluorescência (I) foi analisado segundo uma função multi-exponencial, que descreve o comportamento das curvas de fase e de modulação que estão em função da freqüência (MHz) [Fig. 5], para a determinação do tempo de vida de fluorescência (Lakowicz, 1999):

$$I(t, \lambda) = \sum_i^n \alpha_i(\lambda) e^{-t/\tau_i} \text{ (Eq. 02),}$$

onde α_i é a constante de decaimento, τ_i é o de tempo de vida a ser calculado e λ é o comprimento de onda de emissão. O termo i é o número de componentes da função exponencial que nesta tese se restringiu a dois termos. A contribuição relativa de cada componente de tempo de vida (f) do total da emissão foi calculada pelas equações:

$$f_1 = (\alpha_1 \tau_1) / [(\alpha_1 \tau_1) + (\alpha_2 \tau_2)] \text{ (Eq. 03), sendo}$$

$$f_1 + f_2 = 1 \text{ (Eq. 04)}$$

O tempo de vida médio (ns) representado pelo termo $\langle \tau \rangle$ foi calculado segundo a equação:

$$\langle \tau \rangle = \alpha_1 \tau_1 + \alpha_2 \tau_2 \text{ (Eq. 05)}$$

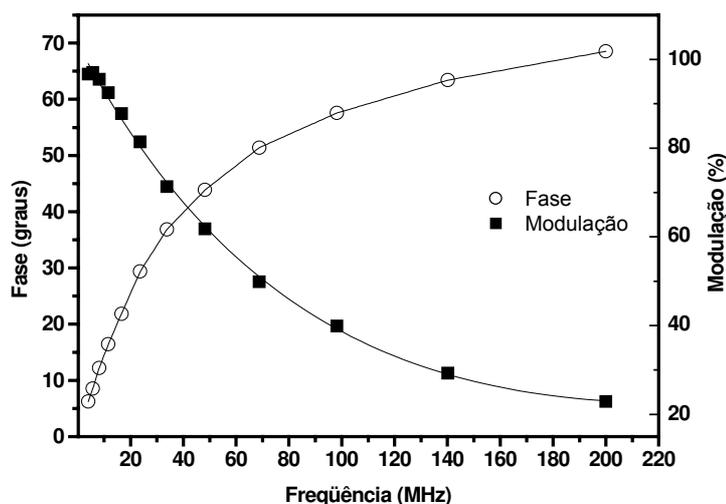


Figura 5 – Exemplo de uma curva fase-modulação em função da frequência (MHz), utilizada para a determinação do tempo de vida de fluorescência, obtida com auxílio de um fluorômetro de fase e modulação com correlação cruzada e multi-freqüência (ISS K2). As linhas representam os ajustes das curvas experimentais, fase e modulação, por uma função exponencial.

3.5. Cromatografia em gel filtração.

A cromatografia em gel filtração foi feita utilizando uma coluna Superdex 75 HR 10/30 (Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden) conectada a um sistema ÄKTA FPLC ou HPLC Purifier (Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden). O perfil cromatográfico foi monitorado utilizando os comprimentos de onda de 280 nm (absorção do Trp) e 423 nm (banda de Soret, monitoramento da forma holo de Mb). A coluna de gel filtração foi equilibrada com dois volumes de coluna do tampão apropriado e que está descrito na legenda da figura. As amostras de

proteína (0,5 a 1,5 mg/mL) foram aplicadas na coluna e a eluição foi mantida a uma taxa de 0,5 mL/min à temperatura ambiente. As massas moleculares aparentes das proteínas em estudo foram avaliadas utilizando como referência um padrão de massa molecular também aplicado na coluna sob as mesmas condições. As proteínas contidas no padrão de massa molecular foram as seguintes: lisozima de clara de ovo de galinha (14,29 kDa), RNase A I de pâncreas bovino (16,50 kDa), mioglobina de coração de cavalo (16,95 kDa) e BSA - albumina de soro bovino (67,00 kDa) como informados pelo fabricante (Sigma). Os reagentes utilizados nos experimentos são de grau analítico. Adicionalmente, a cromatografia em gel filtração foi utilizada para eliminar as frações agregadas que estão presentes nas preparações das formas holo das permutéínas.

3.6. Desenovelamento térmico monitorado por CD.

O desenovelamento térmico dos mutantes Mb-C_GHAB e Mb-B_GHA, ligados ao grupo cianoheme, foi monitorado pelo sinal de CD em 222 nm. Nestes experimentos, as proteínas foram diluídas para a concentração final de 2 μ M em tampão 10 mM fosfato de sódio pH 7,0. A variação de temperatura foi programada para ocorrer de 20°C para 90°C a uma taxa de 1°C/min. Esta variação foi feita através de um controlador de temperatura NESLAB RTE Series (NESLAB) acoplado a um sistema do tipo *Peltier*. As medidas de CD foram feitas utilizando um espectropolarímetro J-810 (JASCO) e cubetas de 0,1 cm de caminho ótico. Os valores da temperatura de transição (T_m) foram calculados a partir da 1ª derivada aplicada sobre as curvas de desenovelamento térmico obtidas nestes experimentos. Este tratamento matemático foi feito *on-line* utilizando o programa de análise de dados da JASCO. Embora os desenovelamentos térmicos para as mioglobinas selvagem e permutadas não sejam reversíveis, o que restringe uma análise termodinâmica, esses valores de T_m foram utilizados como um parâmetro inicial de comparação das estabilidades das formas holo destas mioglobinas.

3.7. Análise dos dados.

Os perfis de desenovelamento de proteínas, induzidos por uréia, foram monitoradas por dicroísmo circular (CD) e emissão de fluorescência dos Trps (FL)

e foram úteis para a aquisição de parâmetros termodinâmicos. Estes parâmetros foram utilizados para as comparações das estabilidades entre as proteínas, analisadas neste trabalho, e estão detalhados nesta seção. As análises destes dados foram feitas utilizando o programa Origin[®] versão 6,1 (Microcal[™]).

A utilização da variação da energia livre de Gibbs (ΔG), na ausência de desnaturante ($\Delta G_D^{H_2O}$), foi uma das alternativas para a comparação da estabilidade entre as proteínas. Esta variação foi calculada através do método de extrapolação linear utilizando os dados da pré e da pós-transição de desenovelamento das proteínas, nos casos em que estes desenovelamento são reversíveis e em dois estados (Santoro e Bolen, 1988). Para tanto, considerou que as transições N (estado nativo) - D (estado desnaturado) ou I (estado intermediário) - D (estado desnaturado) podem ser descritas como um processo do tipo tudo ou nada. Para simplificar o nosso raciocínio seguiremos apenas com a transição N-D que também se aplica para a transição I-D:

$$f_N + f_D = 1 \text{ (Eq. 06),}$$

sendo f_N e f_D as frações de proteínas nos estados nativo e desnaturado, respectivamente. A partir desta consideração utilizou-se a equação de Gibbs, que relaciona energia livre com a constante de equilíbrio:

$$\Delta G = -RT \ln K_{eq} \text{ (Eq. 07),}$$

onde ΔG é a variação de energia livre do processo, R é a constante universal dos gases perfeitos, T é a temperatura absoluta (Kelvin) e K_{eq} é a constante de equilíbrio. A constante de equilíbrio para o desenovelamento da proteína no estado nativo pode ser calculada pela seguinte relação:

$$K_{eq} = f_D / f_N \text{ (Eq. 08)}$$

Considerando a variável y como um sinal experimental, que foi observado pela sonda (no nosso caso: CD ou FL), utilizado para seguir o desenovelamento da proteína (variável com dependência linear):

$$(y_N f_N) + (y_D f_D) = y \text{ (Eq. 09)}$$

$$K_{eq} = f_D / f_N = (y_N - y) / (y - y_D) \text{ (Eq. 10)}$$

Aplicando-se na equação de Gibbs temos a variação da energia livre de desenovelamento em função de y para cada ponto dentro da zona de transição (ΔG_D^0):

$$\Delta G_D^0 = -RT \ln((y_N - y)/(y - y_D)) \text{ (Eq. 11)}$$

Tanto a pré-transição (N-estado nativo), quanto a pós-transição (D-estado desenovelado) podem ser descritas por equações de retas:

$$y_N = m_N[U] + y_N^0 \text{ (Eq. 12)}$$

$$y_D = m_D[U] + y_D^0 \text{ (Eq. 13)}$$

onde y_N e y_D são as variáveis da pré e pós-transição, respectivamente, que são fornecidas experimentalmente pelo sinal da sonda, em função da concentração de desnaturante utilizada ($[U]$). y_N^0 e y_D^0 são os valores obtidos pelo sinal da sonda quando a proteína está nos estados nativo e desnaturado, respectivamente e m_N e m_D representam as inclinações destas equações de reta.

Este raciocínio pode ser extrapolado para a zona de transição. Portanto, combinando as equações 10, 11, 12, 13 e 14 e utilizando-se a inclinação da reta, obtida em um gráfico de ΔG_D^0 (kcal/mol) versus concentração do desnaturante $[U]$ (Eq. 14), como valor de m temos que:

$$K_{eq} = (y_N - y)/(y - y_D) \text{ (Eq. 10)}$$

$$y_N = m_N[U] + y_N^0 \text{ (Eq. 12)}$$

$$y_D = m_D[U] + y_D^0 \text{ (Eq. 13)}$$

$$\Delta G_D^0 = \Delta G_D^{H2O} - m[U] \text{ (Eq. 14)}$$

A Eq. 11 combinada com a Eq. 14 temos:

$$-RT \ln((y_N - y)/(y - y_D)) = \Delta G_D^{H2O} - m[U] \text{ (Eq. 15), que combinada com as Eqs. 12}$$

e 13 temos a seguinte dedução:

$$\begin{aligned} & -RT \ln(((m_N[U] + y_N^0) - y)/(y - (m_D[U] + y_D^0))) = \Delta G_D^{H2O} - m[U] \\ & \exp(-((\Delta G_D^{H2O}/RT) - (m[U]/RT))) = (((m_N[U] + y_N^0) - y)/(y - (m_D[U] + y_D^0))) \\ & y \cdot \exp(-((\Delta G_D^{H2O} - m[U])/RT)) + y = ((m_N[U] + y_N^0) + (m_D[U] + y_D^0)) \cdot \exp(-(\Delta G_D^{H2O} - \\ & \quad m[U])/RT) \\ & y = [((m_N[U] + y_N^0) + (m_D[U] + y_D^0)) \exp(-(\Delta G_D^{H2O} - m[U])/RT)] / [1 + \exp(-(\Delta G_D^{H2O} - \\ & \quad m[U])/RT)] \text{ (Eq. 16),} \end{aligned}$$

onde $\Delta G_{H_2O}^D$ é a variação de energia na ausência de desnaturante, R é a constante universal dos gases e T é a temperatura na qual o experimento foi realizado.

A Eq. 16 foi utilizada para ajustar as curvas de enovelamento para definir os parâmetros de $\Delta G_{H_2O}^D$ (kcal/mol), de m (kcal/mol.M), constante considerada como um grau de exposição da proteína ao desnaturante (Tanford, 1968), e de C_m que é a concentração molar de desnaturante na metade da transição, onde a metade da população de proteínas está desenovelada.

4. RESULTADOS.

4.1. Clonagem dos mutantes de deleção (**Mb₁₋₁₂₃** e **Mb₁₋₉₉**), de permutação com deleção (**Mb-HAB_F**) e de permutações circulares (**Mb-B_GHA** e **Mb-C_GHAB**).

Os cDNAs dos mutantes Mb₁₋₁₂₃, Mb₁₋₉₉ e Mb-HAB_F foram clonados em vetores de expressão pT7-7a, enquanto que os cDNAs dos mutantes Mb-B_GHA e Mb-C_GHAB foram clonados em vetores de expressão pET3a. A clonagem correta e a exatidão das mutações foram confirmadas pelo seqüenciamento de DNA.

4.2. Expressão e purificação das proteínas mutantes.

4.2.1. **Mb₁₋₁₂₃**: Os resultados da expressão, da purificação e da caracterização deste mutante de deleção da hélice H (Fig. 6 A e B) estão descritos em:

Ribeiro-Júnior, E. A., Regis, W. C. B., Tasic, L. and Ramos, C. H. I. (2003) **Fast purification of the Apo form and a non-binding heme mutant of recombinant sperm whale myoglobin**. *Protein Express. Purif.* 28, 202-208 (anexo, item 9.1).

4.2.2. **Mb₁₋₉₉**: Este mutante corresponde a deleção das hélices G e H (Fig. 6 A) e foi expresso em grandes quantidades em BL21(DE3), tanto a 37°C quanto a 42°C, após 3 h da adição de IPTG para a concentração final de 0,4 mM. Esta indução não produziu uma cor marrom avermelhada no sedimento bacteriano como foi observado nas induções de MbWT a 37°C (ligação do grupo heme durante a expressão de mioglobina). Esta proteína mutante apresenta massa molecular de 11,3 kDa, é solúvel em água até a concentração final de 10 mg/mL e após a purificação apresenta grau de pureza superior a 95% (Fig. 6 B).

4.2.3. **Mb-HAB_F**: Este mutante de permutação linear com deleção (15,2 kDa) possui a hélice H na extremidade N-terminal (primeiro resíduo – Ala125) que está ligada ao restante das hélices (A até F – último resíduo Ile99) por quatro pares de serinas e glicinas (Fig. 6 A). Adicionalmente, este mutante não possui a hélice G na sua composição. Este mutante foi expresso em grandes quantidades em

BL21(DE3)pLysS, após 3 h de indução tanto a 37°C quanto a 42°C, na presença de IPTG 0,4 mM ou lactose 36 g/L. Esta indução não apresentou uma coloração marrom avermelhada no precipitado de bactéria como foi observado para as induções de MbWT. A máxima expressão alcançada a 42°C encontrou-se entre 5 e 16 horas de indução, como foi observado para MbWT, formando corpos de inclusão. Esta proteína foi purificada, via corpos de inclusão, com um grau de pureza superior a 95% (Fig. 6 C) e na forma apo. Esta apoproteína é solúvel em água até a concentração de 1,8 mg/L.

4.2.4. **Mb-B GHA e Mb-C GHAB**: O mutante Mb-B_GHA (19,7 kDa) possui a hélice A localizada na extremidade C-terminal (primeiro resíduo Ala19) que está ligada ao restante das hélices (B até H – último resíduo Glu18) de MbWT por quatro pares de serinas e glicinas (Fig. 6 A). O mutante Mb-C_GHAB (19,7 kDa) possui as hélices A e B como seqüências C-terminais (primeiro resíduo Ser35) que estão ligadas ao restante das hélices (C até H – último resíduo Lys34) de MbWT por quatro pares de serinas e glicinas (Fig. 6 A). Estas permutações N-terminais, Mb-B_GHA e Mb-C_GHAB, foram expressas em grandes quantidades em BL21(DE3)pLysS. A expressão atingiu seu máximo após 16 horas de indução sem distinção significativa entre as temperaturas (37°C ou 42°C) e os indutores (IPTG 0,4 mM ou lactose 36 g/L) empregados no processo. As expressões das permutações promoveram um acúmulo destas proteínas em corpos de inclusão que foram purificadas na forma apo, com grau de pureza superior a 95% (Fig. 6 C). Estas permutações são solúveis em água em concentrações de aproximadamente 5 mg/mL.

4.3. Caracterização espectroscópica dos mutantes de deleção das hélices GH (Mb₁₋₉₉) e de permutação linear (Mb-HAB_F) em pH fisiológico.

4.3.1. Dicroísmo circular.

A Figura 7 A mostra a caracterização da estrutura secundária das formas apo e holo (CN⁻) das mioglobinas selvagem (MbWT), mutante de deleção das hélices GH (Mb₁₋₉₉) e mutante de permutação linear com deleção da hélice G (Mb-

HAB_F) que foi inspecionada através dos espectros de dicroísmo circular (CD). Os espectros de CD foram adquiridos na região do ultravioleta distante. Os espectros de CD foram registrados como elipticidade molar residual ($[\theta]$) em função do comprimento de onda entre 200 e 260 nm. O espectro de CD de ApoMbWT apresenta mínimos de elipticidade em 208 nm e em 222 nm como esperado para uma proteína com estrutura secundária em que estruturas em α -hélices são predominantes (Fig. 7 A). O espectro de CD para ApoMb-HAB_F apresenta mínimos de elipticidade molar nas mesmas regiões que foram descritas para a ApoMbWT, enquanto o espectro de ApoMb₁₋₉₉ apresenta um mínimo em 206 nm e outro em 218 nm que neste caso é pouco proeminente (Fig. 7 A). As $[\theta]_{222}$ médias de ApoMbWT, de ApoMb₁₋₉₉ e de ApoMb-HAB_F foram de $-18.000 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$, $-5.500 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ e de $-8.900 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$, respectivamente (Tabela 2). As porcentagens de α - hélices (f_H) calculadas pelo método de Chen *et al.* (1974) para a ApoMbWT, para a ApoMb₁₋₉₉ e a ApoMb-HAB_F foram de 65%, de 30% e de 39%, respectivamente (Tabela 2). A ApoMb₁₋₉₉ apresenta reduções de 35% e de 54% nas estruturas primária e secundária, respectivamente, em relação aos valores destes parâmetros da ApoMbWT, enquanto que a ApoMb-HAB_F, também comparada à ApoMbWT, apresenta reduções de 10% e de 40% nas estruturas primária e secundária, respectivamente. A ligação do grupo heme promoveu um aumento na quantidade de estrutura secundária da MbWT em torno de 30% (Fig. 7 A e Tabela 2). A inspeção dos espectros de CD das proteínas mutantes mostra que as adições do grupo heme e do ligante cianeto (CN⁻) não foram suficientes para recuperar totalmente a perda de estrutura (Fig. 7 A). O espectro de ApoMb₁₋₉₉ na presença de cianohemina (CN⁻) apresenta várias alterações, tais como: deslocamento do $\lambda_{\text{mín}}$ de 206 nm para 208 nm, formação de $\lambda_{\text{mín}}$ mais proeminente em 222 nm e aumento da porcentagem de α - hélice, calculada pelo método de Chen *et al.* (1974), de 30% (ApoMb₁₋₉₉) para 37% (cianoMb₁₋₉₉). A ApoMb-HAB_F apresenta uma $[\theta]_{222}$ de $-8.900 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ que se tornou mais negativa ($-12.000 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$) após a adição do grupo heme (Tabela 2), sendo que a f_H , que foi calculada segundo método de Chen *et al.* (1974), aumentou de 39% na forma apo para 48% na forma holo (Fig. 7 A). Na

proteína selvagem, estes valores de f_H foram de 65% ($[\theta]_{222} -18.000 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$) para a forma apo e de 85% ($[\theta]_{222} -25.000 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$) para a forma holo (Tabela 2).

4.3.2. Absorbância.

A coordenação do grupo heme nas Mbs selvagem e mutantes foi monitorada pelo espectro de absorção na banda de Soret (Fig. 7 B). A ApoMbWT ligou heme como verificado pelo deslocamento do $\lambda_{\text{máx}}$ de absorção da hemina livre de $395 \pm 0,5 \text{ nm}$ para $\lambda_{\text{máx}}$ de $408 \pm 0,5 \text{ nm}$ (Tabela 2). Este pico máximo de absorção em 408 nm se deslocou para 422 nm após a adição do ligante CN^- (Fig. 7 B). A coordenação do grupo heme em ApoMb₁₋₉₉ deslocou o $\lambda_{\text{máx}}$ de absorção de $395 \pm 0,5 \text{ nm}$ (heme livre – Fig. 7 B) para $414 \pm 0,5 \text{ nm}$ (holoMb₁₋₉₉) (Tabela 2). A adição de CN^- na solução de holoMb₁₋₉₉ não promoveu o deslocamento do $\lambda_{\text{máx}}$ de absorção para um comprimento de onda similar ao documentado para a MbWT (Fig. 7 B). Adicionalmente, a solubilidade de holoMb₁₋₉₉ foi dependente da concentração de proteína utilizada, sendo que ela foi comprometida quando se trabalhou com concentrações superiores a $20 \mu\text{M}$ de proteína, pois uma grande quantidade de proteína precipitou. A holoMb-HAB_F apresenta um pico máximo de absorção em $415,5 \pm 0,5 \text{ nm}$. A adição do ligante CN^- promoveu um deslocamento do comprimento de onda de absorção máxima de $415,5 \pm 0,5 \text{ nm}$ para $417,5 \pm 0,5 \text{ nm}$ (Fig 7 B).

4.3.3. Cromatografia em gel filtração.

As massas moleculares aparentes de Mb₁₋₉₉ e de Mb-HAB_F nas formas apo e holo (CN^-) foram estimadas através da cromatografia de gel filtração em tampão 50 mM fosfato de sódio pH $7,0$ contendo 150 mM NaCl (Fig. 8). Os resultados foram avaliados em termos de valores de pico máximo de volume de eluição que foram convertidos em valores de massa molecular aparente. Para ApoMb₁₋₉₉, a massa molecular aparente que foi calculada a partir destes experimentos foi de aproximadamente de $67,0 \text{ kDa}$ (Fig. 8). Este valor de massa molecular aparente e o perfil global do volume de eluição desta proteína não se

modificaram mesmo após a reação com o grupo cianoheme (CN⁻) [Fig. 8]. A forma apo de Mb-HAB_F apresentou um cromatograma, onde o pico máximo corresponde ao de uma proteína com massa molecular aparente de aproximadamente 27 kDa (Fig. 8). Após a adição do grupamento cianoheme (CN⁻), estas amostras de proteínas passaram a apresentar dois picos de volume de eluição. As massas moleculares aparentes que foram calculadas a partir destes dois picos foram de 41 kDa e de 19 kDa (Fig. 8).

A tendência à agregação também pode ser constatada na forma apo da mioglobina selvagem que apresenta dois picos máximos de eluição que convertidos em valores de massa molecular aparente resultam em aproximadamente 17 kDa (forma monomérica) e 35 kDa (forma dimérica) [Fig. 8]. Essa massa molecular aparente da fração monomérica corresponde à estimada pela seqüência primária da proteína (Fig. 8). Em contrapartida a holoMbWT apresenta um perfil de eluição com um pico máximo de eluição que se refere a uma proteína de massa molecular aparente de 16 kDa (Fig. 8).

4.4. Caracterização espectroscópica dos mutantes de permutação circular (Mb-B_GHA e Mb-C_GHAB) em pH fisiológico.

4.4.1. Dicroísmo circular.

Os mutantes de permutação circular, Mb-B_GHA e Mb-C_GHAB, apresentam espectros de CD, na região do ultravioleta distante, de uma proteína que tem sua estrutura secundária formada por α -hélices (elipticidade com mínimos em 208 nm e em 222 nm) [Fig. 9 A]. As adições do grupo heme mais cianeto (CN⁻) promoveram um aumento nos valores de $[\theta]_{222}$ de -12.400 deg.cm².dmol⁻¹ (f_H = 48%) para -23.600 deg.cm².dmol⁻¹ (f_H = 82%) para a Mb-C_GHAB e de -11.700 deg.cm².dmol⁻¹ (f_H = 46%) para -24.800 deg.cm².dmol⁻¹ (f_H = 84%) para a Mb-B_GHA, enquanto que para MbWT os valores destes parâmetros de estrutura secundária aumentaram de -18.000 deg.cm².dmol⁻¹ (f_H = 65%) para -25.000 deg.cm².dmol⁻¹ (f_H = 85%). A ligação do grupo heme nas apoproteínas mutantes

foi capaz de restabelecer a estruturação secundária destas permutéínas ($[\theta]_{222}$ e f_H , Tabela 2) para uma estruturação semelhante à observada para a holoMbWT.

4.4.2. Absorbância.

A ligação e a coordenação do grupo heme mais ligante (CN^-) nos mutantes de permutação circular foram monitoradas através dos espectros de absorção na banda de Soret (Fig. 9 B). A reação entre o grupo heme e ApoMbWT promoveu um deslocamento da absorção máxima de 394 nm (Heme livre, Fig. 9 B) para 409 nm (espectro não apresentado) que após a adição do ligante cianeto (CN^-) se deslocou para 422 nm (Fig. 9 B). O pico de absorção máxima em 422 nm foi aproximadamente 3 vezes mais intenso que a absorção em 280 nm (triptofano). Houve, também, modificações em mais duas bandas de absorção. A banda gama com um pico em 360 nm, que é mais definido que no espectro do heme livre, e a banda na região Q (500-600 nm) com picos de absorção que variaram entre os comprimentos de onda em 534 e 540 nm. Estas características foram comuns entre as mioglobinas selvagem e mutantes de permutação circular (Fig. 9 B).

4.4.3. Cromatografia em gel filtração.

As massas moleculares de Mb-C_GHAB e de Mb-B_GHA (formas apo e holo) foram avaliadas através da cromatografia de gel filtração em tampão 50 mM fosfato de sódio pH 7,0 contendo 150 mM NaCl (Fig. 10). Nestas condições, as amostras da forma apo de Mb-C_GHAB apresentaram perfis de volume de eluição com um pico máximo de eluição referente a uma proteína com massa molecular aparente de aproximadamente de 67 kDa (Fig. 10). Este valor de massa molecular aparente é aproximadamente 3 vezes maior que a de Mb-C_GHAB que foi calculada pela composição de aminoácidos (19,7 kDa). Para as amostras de Mb-B_GHA (forma apo), os perfis de eluição não apresentaram sinal detectável de A_{280} (perfil não apresentado na Figura 10) provavelmente devido à interação da proteína com a resina da coluna de gel filtração, mesmo com a presença de NaCl 150 mM, ou à formação de agregados com massas moleculares superiores a ponto de impedir a entrada destas moléculas na coluna. Contudo, quando as formas holo destas permutéínas são avaliadas, os cromatogramas mostram

valores de volume de pico máximo de eluição que coincidem com o volume de eluição de MbWT na forma holo (Fig. 10).

4.5. Caracterização espectroscópica da forma apo dos mutantes de permutação circular (ApoMb-B_GHA e ApoMb-C_GHAB) em diferentes pHs.

4.5.1. Dicroísmo circular.

Os espectros de CD das formas apo dos mutantes de permutação circular, ApoMb-C_GHAB e ApoMb-B_GHA, em condições fisiológicas e da ApoMbWT em condições fisiológicas e em pH 4,1 (formação do intermediário) são apresentados juntos para efeito de comparação (Fig. 11). As elipticidades molares em 222 nm ($[\theta]_{222}$) em média foram de $-12.400 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ para ApoMb-C_GHAB e de $-11.700 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ para ApoMb-B_GHA que foram valores menores do que o valor apresentado para a ApoMbWT em pH 4, $-14.000 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ (Fig. 11). A redução dos valores de pH de 6,5 para 4,1 só não alterou significativamente a elipticidade molar do mutante de permutação das hélices AB (ver adiante). Estes valores de $[\theta]_{222}$ juntamente com as porcentagens de α -hélices, calculadas pelo método de Chen *et al* (1974), estão mostradas na Tabela 3 para as principais faixas de pH (pH 7,0; 4,2; 3,4 e 2,0).

4.5.2. Fluorescência estática dos triptofanos.

Os espectros de emissão de fluorescência de ApoMbWT, ApoMb-C_GHAB e ApoMb-B_GHA em função do pH estão mostrados na Fig. 12. A inspeção destes espectros mostra que os comprimentos de onda de emissão máxima de fluorescência das permutações em pH 7,0 coincidem com o comprimento de onda de emissão máxima de fluorescência da ApoMbWT em pH 4,1 (Fig. 12 A e Tabela 3 - ver também os valores de centro de massa espectral). Adicionalmente, os valores das intensidades de emissão de fluorescência máxima destes mutantes são aproximadamente 10% menores que a intensidade de emissão máxima de fluorescência do intermediário da proteína selvagem (pH 4) e são 20% maiores que a intensidade de emissão de fluorescência da proteína selvagem em pH 7 (Fig. 12 A). Estes valores de intensidade de emissão de fluorescência diminuíram

cerca de 30% para ApoMb-B_GHA e cerca de 50% para ApoMb-C_GHAB, em relação ao valor de intensidade de emissão máxima da proteína selvagem em pH 4,1, quando os pHs das amostras foram alterados de 7 para 4,1 (Fig. 12 B). Estas mudanças de valores de intensidade de emissão de fluorescência ocorreram conjuntamente com um ligeiro deslocamento dos comprimentos de onda máximo de emissão de fluorescência e dos centros de massa espectral (Tabela 3). Estes experimentos demonstraram que os triptofanos nos mutantes de permutação circular em pHs 7 e 4,1 se encontram em um ambiente mais parecido ao dos triptofanos da ApoMbWT em pH 4,1 do que em pH 7.

4.5.3. Tempo de vida de fluorescência dos triptofanos.

Os tempos de vida de fluorescência de ApoMbWT e mutantes de permutação circular, ApoMb-C_GHAB e ApoMb-B_GHA, foram medidos para a obtenção de mais informações sobre o ambiente dos resíduos de triptofano (Trp) nos diferentes pH (Tabela 4). Nestes experimentos, os Trp de ApoMb-C_GHAB e ApoMb-B_GHA, em pHs 7 e 4, apresentaram componentes de tempo de vida longo (τ_1 e f_1) e curto (τ_2 e f_2) semelhantes aos apresentados pelos Trp da ApoMbWT quando em pH 4 (Tabela 4). Esta similaridade foi melhor evidenciada quando se observou os valores de tempo de vida de fluorescência médio, onde τ_1 , f_1 e τ_2 , f_2 foram avaliados em conjunto. As diferenças de tempo de vida médio foram significativas quando a comparação foi feita entre as proteínas mutantes e proteína selvagem em pH 7 ou em pH 2. As curvas de decaimento do tempo de vida de fluorescência foram melhor ajustadas por uma função bi-exponencial seguindo uma distribuição discreta, onde foram encontrados valores de $\chi^2 \leq 10$. A aplicação de uma função mono exponencial gerou valores de χ^2 pelo menos 10 vezes maiores do que os encontrados anteriormente, mesmo quando se utilizou uma distribuição estatística diferente da discreta, como a distribuição Lorentziana por exemplo. O emprego de uma função tri-exponencial não reduziu significativamente os valores de χ^2 e ainda gerou um terceiro componente de tempo de vida (τ_3 e f_3) com valores de τ_3 inferiores a 0,5 ns. Os valores de $\chi^2 \leq 10$ foram considerados apropriados uma vez que os valores de tempo de vida de

fluorescência observados para ApoMbWT estavam em acordo com os dados da literatura para esta proteína (Tcherkasskaya *et al.*, 2000a). Neste caso, os altos valores de χ^2 , que foram encontrados nos nossos experimentos, pode ter uma explicação baseada na baixa quantidade de frequências (12 frequências diferentes dentro do intervalo de 4-200 MHz) que foram utilizadas para se fazer os ajustes das curvas de fase-modulação em função da frequência (como exemplo Fig. 5 em Material e Métodos).

4.6. Desenovelamento em meio ácido de ApoMbWT, ApoMb-B_GHA e ApoMb-C_GHAB.

As curvas de monitoramento do desenovelamento em meio ácido obtidas por CD₂₂₂ e pela emissão de fluorescência do Trp estão mostradas nas Figuras 13 e 14, respectivamente.

4.6.1. Dicroísmo circular.

A curva de desenovelamento em meio ácido de ApoMbWT, monitorada por CD₂₂₂, apresenta um comportamento do tipo três estados que possui uma região de pré-transição entre os pH 6,4 e 5,6, onde os valores de $[\theta]_{222}$ permanecem praticamente estáveis, que é seguida por uma região de transição entre os pHs 5,4 e 4,15, onde o valor da $[\theta]_{222}$ reduz à medida que o valor de pH reduz até pH 4,15. Em torno deste pH ocorre uma estabilização nos valores de $[\theta]_{222}$ com a formação do intermediário, e a partir de pH 3,7 uma nova região de transição é observada, onde o valor de $[\theta]_{222}$ reduz à medida que o valor de pH reduz até pH 2,4 (Fig. 13). A ApoMb-C_GHAB é praticamente insensível ao desenovelamento em meio ácido (Fig. 13), mas a adição de um agente caotrópico como a guanidina-HCl, na concentração de 6 M (pH 6), foi capaz de promover o desenovelamento total desta proteína ($[\theta]_{222}$, Tabela 3). A ApoMb-B_GHA foi insensível ao desenovelamento em meio ácido até o pH 3,5, sendo então desenovelada com um perfil semelhante ao da proteína selvagem (Fig. 13). O tratamento destas amostras com NaCl 30 mM mudou o perfil do desenovelamento desta proteína tornando-a semelhante à ApoMb-C_GHAB na ausência ou na presença de 30 mM NaCl (Fig. 13).

A variação de pH de 6,7 para 2,4 promoveu uma redução nos valores de $[\theta]_{222}$ de $-20.000 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ para $-7.000 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ para a ApoMbWT de $-12.000 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ para $-9.000 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ para ApoMb-C_GHAB e de $-10.000 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ para $-6.000 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ para ApoMb-B_GHA (Fig. 13).

4.6.2. *Fluorescência estática dos triptofanos.*

O efeito da variação de pH sob o ambiente dos triptofanos das duas permutéínas (Fig. 14 A), que foi avaliado pela modificação na intensidade de emissão de fluorescência em 330 nm, pode ser dividido em três partes de acordo com: (1) entre os pHs 7 e 5, ocorre redução na intensidade de emissão de fluorescência com a redução nos valores de pH; (2) entre os pHs 5 e 4, ocorre uma estabilização da intensidade de fluorescência e (3) entre os pHs 4 e 2, ocorre um aumento na intensidade de fluorescência (Fig. 14 A). A diferença entre as permutéínas, nestes experimentos, está na magnitude da intensidade de fluorescência observada. A ApoMb-C_GHAB apresenta uma maior supressão na intensidade de emissão de fluorescência do que ApoMb-B_GHA quando o pH vai de 7 para 4 (Fig. 14 A). Na ApoMbWT, a intensidade de fluorescência descreve um comportamento quase que inverso ao observado para as permutéínas (Fig. 14 A, gráfico inserido). A ApoMbWT apresenta uma estabilização na intensidade de emissão de fluorescência entre os pHs 7 e 5, entre os pHs 5 e 4 ocorre um aumento significativo na intensidade de emissão de fluorescência que se estabiliza em pH 4 e que é seguido por um decréscimo nesta intensidade, para valores próximos aos encontrado entre os pHs 7 e 5, à medida que os valores de pH diminuem (pH 4 para 2).

A emissão de fluorescência dos triptofanos, quando foi avaliada pelas mudanças ocorridas no centro de massa espectral (Fig. 14 B), mostrou que ApoMb-B_GHA apresenta uma curva de desenovelamento bem mais cooperativa do que a de ApoMb-C_GHAB. O desenovelamento de ApoMb-B_GHA apresentou uma região de pré-transição, onde os valores de centro de massa espectral se mostraram estáveis frente à variação de pH de 7 para 5. Esta pré-transição foi seguida por uma região de transição entre os pHs 5 e 3, onde os valores de centro de massa espectral aumentaram (deslocamento para comprimentos de onda

maiores) à medida que o valor de pH diminui (desenovelamento cooperativo), e por uma região de pós-transição que mostra uma estabilização nos valores de centro de massa espectral. Para a ApoMb-C_GHAB, a curva de desenovelamento apresentou uma região de pré-transição entre os pHs 7 e 5, seguida de uma região de transição até pH 2,4 e pós-transição após este valor de pH. Na região de transição aparentemente uma espécie foi estabilizada em pH próximo de 3,5.

4.7. Desenovelamento induzido por uréia, das formas apo dos mutantes de permutação circular Mb-B_GHA e Mb-C_GHAB em pH 4, monitorado por CD e pela emissão de fluorescência dos triptofanos.

4.7.1. Fluorescência estática dos triptofanos.

A fluorescência dos triptofanos de ApoMb-C_GHAB em pH 4, monitorada em 330 nm (Fig. 15 A), mostra um aumento na sua intensidade quando a concentração de uréia aumenta de 0 para 1,5 M e a partir desta concentração o valor da intensidade de emissão fluorescência sofre um decréscimo à medida que a concentração de uréia aumenta até 4 M, quando a proteína está praticamente desenovelada (Fig. 15 A). Na ApoMb-B_GHA, a intensidade de emissão de fluorescência na ausência de uréia apresenta valor similar à da ApoMb-C_GHAB em uréia 1,5 M. No entanto, essa intensidade praticamente não muda entre as concentrações de 0 a 1,1 M. A partir desta concentração de uréia ocorre um decréscimo mais abrupto nesta intensidade à medida que a concentração de uréia aumenta até 4 M que é quando a proteína está desenovelada (Fig. 15 A). Nas mesmas condições, a ApoMbWT apresentou um perfil de desenovelamento diferente do observado para as permutações (Fig. 15 A e B). A intensidade de fluorescência de ApoMbWT decresce progressivamente quando a concentração de uréia vai de 0 para 2 M, quando a proteína está desenovelada (Fig. 15 B). Uma maior estabilização da ApoMbWT em pH 4 ocorre após a adição de NaCl 30 mM, onde a intensidade de fluorescência aumenta quando a concentração de uréia vai de 0 para 0,5 M. A partir deste valor ocorre um decréscimo nesta intensidade de

emissão de fluorescência até 3 M de uréia, quando a proteína selvagem está desenovelada.

4.7.2. Dicroísmo circular.

O desenovelamento de ApoMb-C_GHAB monitorado por CD (Fig. 16) apresenta uma curva que possui uma região de pré-transição entre 0 e 1 M de uréia, onde não ocorre variação no valor da $[\theta]_{222}$, que é seguida por uma região de transição entre 1 e 3,5 M de uréia e finalmente uma região pós-transicional de desenovelamento que inicia a partir 3,5 de uréia. A curva de desenovelamento de ApoMb-B_GHA mostra que esta proteína desenovela progressivamente à medida que a concentração de uréia aumenta de 0 para 3,5 M e a partir desta concentração de uréia ocorre a estabilização dos valores de $[\theta]_{222}$. Na proteína selvagem também é possível observar apenas a transição de desenovelamento que ocorre progressivamente à medida que concentração de uréia aumenta de 0 para 2 M, quando a proteína se encontra desenovelada.

4.7.3. Estrutura secundária x terciária.

A cooperatividade entre as mudanças das estruturas secundária e terciária das permutéínas foi monitorada através da sobreposição dos dados de $[\theta]_{222}$ e de centro de massa dos espectros de fluorescência do triptofano, respectivamente, em função de concentrações crescentes de uréia em pH 4 (Fig. 17). Estas análises mostraram que as curvas de desenovelamento monitorado pelas sondas de estruturas secundária e terciária de ApoMb-B_GHA não se sobrepõem (Fig. 17 A). Nesta comparação é possível observar que os valores de $[\theta]_{222}$ sofrem redução a partir de uréia 0,025 M, enquanto os valores de centro de massa dos espectros de fluorescência sofrem deslocamento para comprimentos de ondas maiores (exposição dos triptofanos) somente a partir de uréia 1 M. Isto mostra que a estrutura secundária de ApoMb-B_GHA sofre modificações antes das modificações da estrutura terciária. Em contrapartida, as curvas de desenovelamento monitorado pelas sondas de estruturas secundária e terciária de ApoMb-C_GHAB possuem ótima sobreposição (Fig. 17 B). Estas curvas foram

analisadas pelo método de Santoro e Bolen (1988) para obtenção dos dados termodinâmicos deste desenovelamento (Tabela 5). A Tabela 5 resume alguns parâmetros termodinâmicos das mioglobinas selvagem e mutantes de permutação circular, que foram obtidos através dos tratamentos matemáticos das curvas de desenovelamento induzido por uréia (formas apo em pH 4,0 – estado intermediário de ApoMbWT), monitoradas por CD e FL, e das curvas de desenovelamento térmico destas proteínas no estado nativo (forma cianoheme) pH 7,0, monitoradas por CD. De forma geral, a comparação dos valores de C_m mostra que em pH 4 ApoMb-C_GHAB é mais estável que ApoMb-B_GHA que por sua vez é mais estável que ApoMbWT (tanto na ausência quanto na presença de 30 mM de NaCl). Esta situação se inverte quando as formas cianoheme (pH 7,0) são avaliadas [veja T_m (°C), Tabela 5].

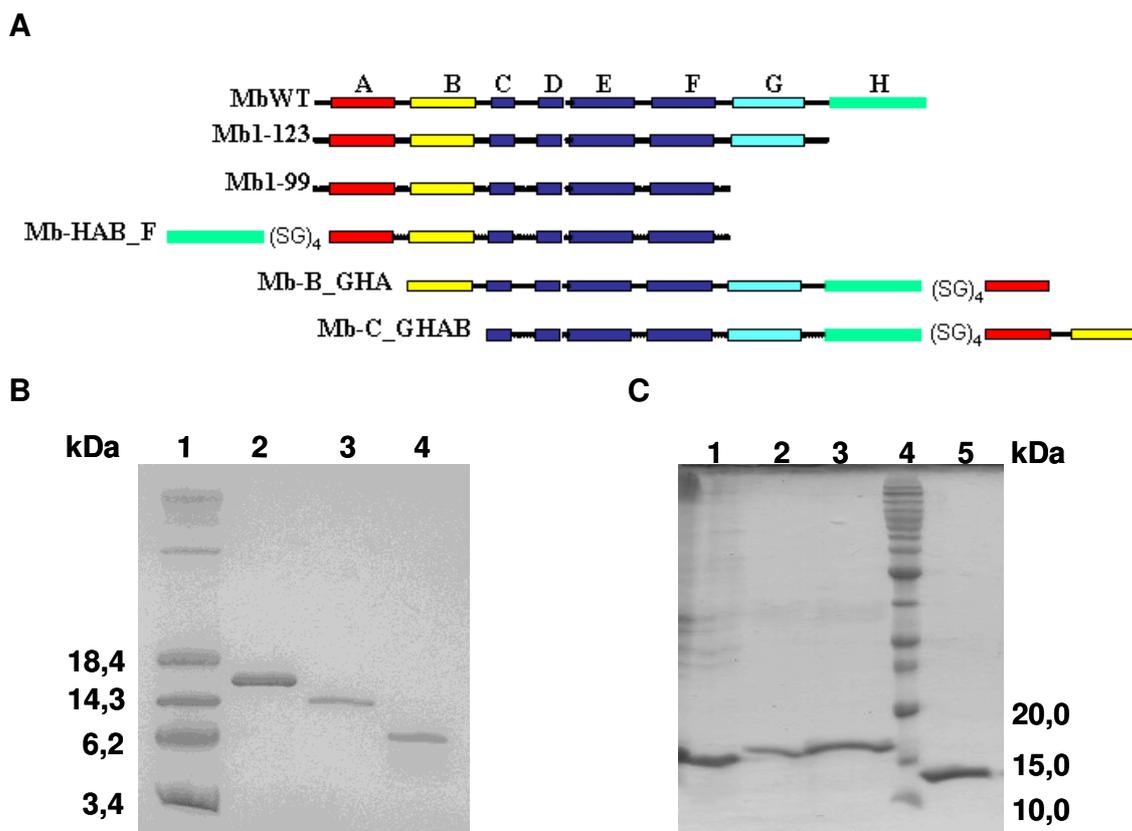
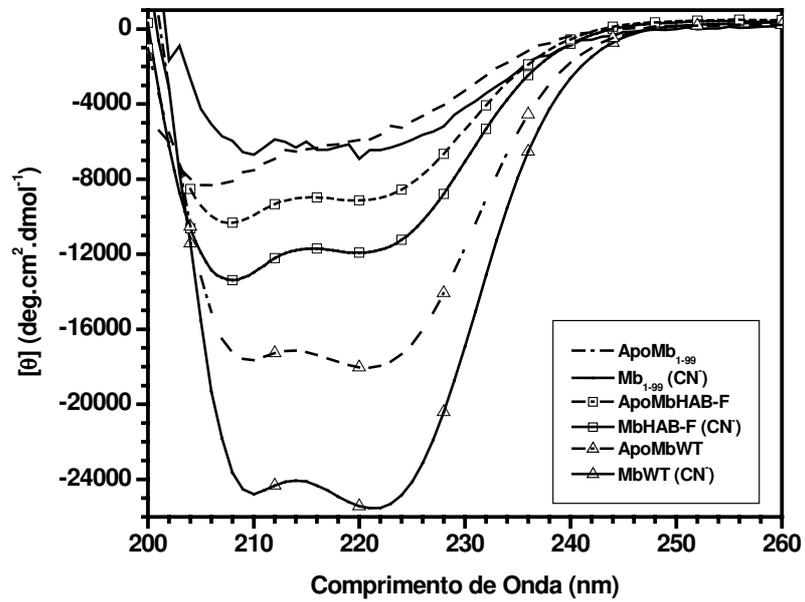


Figura 6 – **A)** Representação esquemática da seqüência de hélices da mioglobina selvagem e dos mutantes de deleção e de permutação. MbWT, mioglobina selvagem. Mb₁₋₁₂₃ e Mb₁₋₉₉, mutantes de deleção das hélices H e GH, respectivamente. Mb-HAB_F, mutante de permutação da hélice H para a extremidade N-terminal com deleção da hélice G. Mb-B_GHA e Mb-C_GHAB mutantes de permutação das hélices A e AB, respectivamente, para a extremidade C-terminal. As hélices são representadas por retângulos e estão nomeadas de A até H (Takano, 1977) sendo que as hélices A, B, G e H que estão envolvidas na formação dos intermediários da via de enovelamento de ApoMb estão destacadas pelas cores vermelha, amarela, ciano e verde, respectivamente. Os resíduos que conectam as hélices estão representados por traços. (SG)₄ representa quatro pares de serinas e glicinas em série que conectam a hélice H à hélice A nas permutações. **B)** Purificação das mioglobinas selvagem (MbWT), e mutantes de deleção da hélice H (Mb₁₋₁₂₃) e das hélices GH (Mb₁₋₉₉) confirmada por SDS-PAGE (gel de separação - 15%) corado com Coomassie blue R. Perfil 1, amostra de padrão de massa molecular (GIBCO) com algumas das massa

moleculares especificadas à esquerda em kDa. Perfil 2, amostra de ApoMbWT (17 kDa - 153 resíduos). Perfil 3, amostra de ApoMb₁₋₁₂₃ (14,1 kDa - 123 resíduos). Perfil 4, ApoMb₁₋₉₉ (11,3 kDa - 99 resíduos). **C) Purificação das mioglobinas mutantes de permutação circular e mutante de permutação com deleção confirmada por SDS-PAGE (gel de separação - 15%) corado com Coomassie blue R.** Perfil 1, amostra de ApoMbWT (17 kDa - 153 resíduos). Perfil 2, amostra de ApoMb-C_GHAB (19,7 kDa - 162 resíduos). Perfil 3, amostra de ApoMb-B_GHA (19,7 kDa - 162 resíduos). Perfil 4, amostra do padrão de massa molecular (Invitrogen) com algumas das massas moleculares especificadas à direita (kDa). Perfil 5, amostra de ApoMb-HAB_F (15,2 kDa – 138 resíduos).

A



B

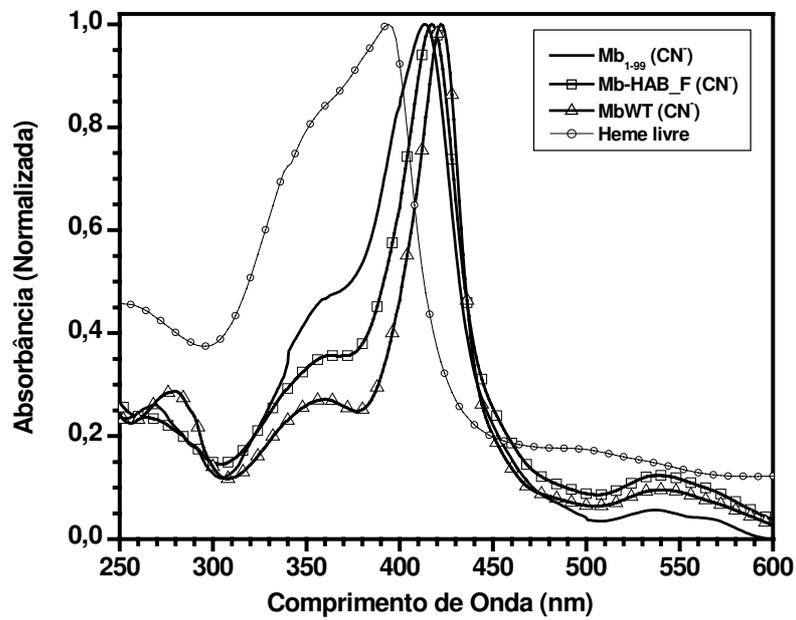


Figura 7 - **Caracterização espectroscópica das formas apo e holo (CN⁻) das mioglobinas selvagem, do mutante de deleção (Mb₁₋₉₉) e de permutação linear com deleção (Mb-HAB_F).** As proteínas foram diluídas para a concentração final de 2 μM em tampão 10 mM fosfato de sódio pH 7,0 e os espectros adquiridos a 20 °C. Os espectros da forma apo estão representados pelas linhas pontilhadas, enquanto os da forma holo (CN⁻) pelas linhas contínuas. As linhas sem símbolos representam o mutante de deleção das hélices GH (Mb₁₋₉₉). As linhas com retângulos abertos representam as amostras da permutação da hélice H para a extremidade N-terminal sem a hélice G (Mb-HAB_F), enquanto que as linhas com triângulos abertos representam as amostras de mioglobina selvagem (MbWT). A linha contínua com círculos abertos representa o espectro do grupo heme sem a adição de proteína. **A) Espectro de dicroísmo circular entre 200-260 nm.** A comparação dos espectros mostra a perda de estrutura secundária das formas apo e holo das proteínas mutantes em relação a estas mesmas formas da proteína selvagem. **B) Espectro de absorção entre 250 e 600 nm.** A figura mostra os espectros de absorção das formas holo (CN⁻) apresentando as regiões do triptofano (260-295 nm) e da banda de Soret (390-450 nm) e da banda Q (500 a 600 nm). Os espectros evidenciam a ligação e a coordenação do grupo heme às proteínas devido à intensa absorção nas bandas de Soret e Q. Estes espectros foram normalizados para efeitos de comparação e mostram que os espectros das proteínas com deleção não são semelhantes ao da proteína selvagem.

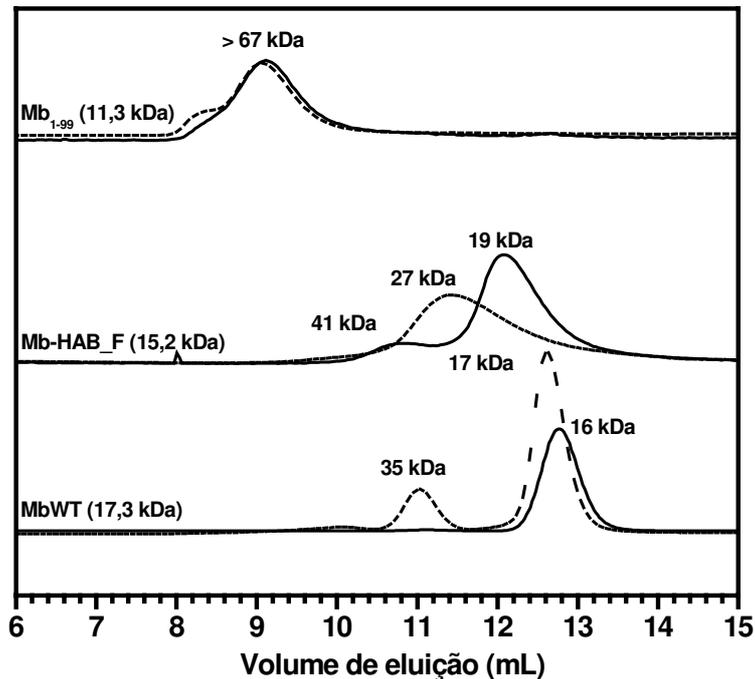
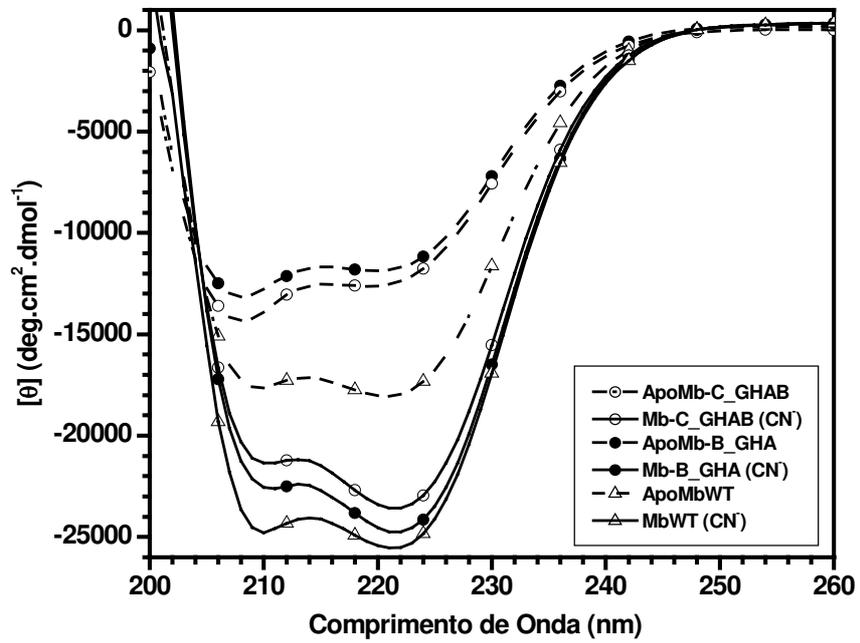


Figura 8 - Cromatograma em gel filtração das mioglobinas selvagem (MbWT), mutantes da permutação linear com deleção, Mb-HAB_F, e do mutante de deleção Mb₁₋₉₉. As proteínas foram diluídas para a concentração final de 0,5 mg/mL em tampão 50 mM fosfato de sódio pH 7,0 contendo 150 mM NaCl. As análises foram realizadas à temperatura 20°C utilizando um HPLC *purifier* (Pharmacia) e uma coluna superdex 75 HR 10/30 (Pharmacia) equilibrada com o mesmo tampão de diluição das amostras de proteína. Os perfis de eluição das amostras na forma holo (linha contínua) foram monitorados medindo A_{280} e A_{423} para observar a região dos triptofanos e da ligação do grupo heme (banda de Soret), respectivamente. Apenas os dados de A_{423} foram utilizados para a construção do gráfico (linha contínua). Os perfis cromatográficos das amostras na forma apo estão representados pelas linhas tracejadas. As massas moleculares previstas pela composição de aminoácidos estão mostradas entre parênteses enquanto que as massas aparentes, determinadas neste experimento, foram calculadas utilizando os valores dos picos de volume de eluição das amostras em referência aos picos de volume de eluição do padrão de massa molecular que está descrito em Material e Métodos.

A



B

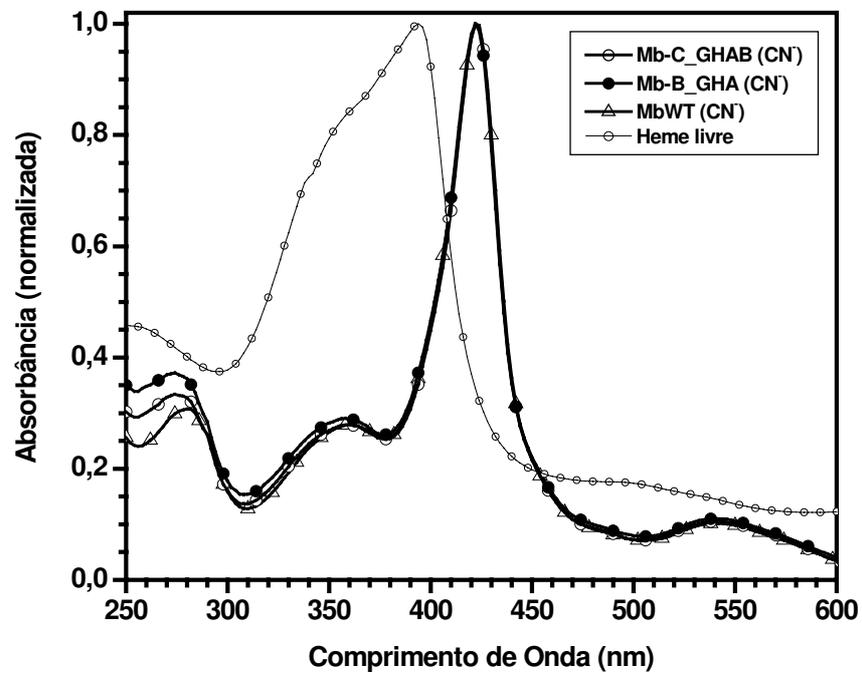


Figura 9 - **Caracterização espectroscópicas das formas apo e holo (CN⁻) das mioglobinas selvagem e mutantes de permutação circular (Mb-C_GHAB e Mb-B_GHA).** As amostras de proteínas foram diluídas para a concentração final de 2 μ M em tampão 10 mM fosfato de sódio pH 7,0. Os espectros das formas apo e holo (CN⁻) foram adquiridos a 20 °C e estão representados pelas linhas pontilhadas e contínuas, respectivamente. As linhas com círculos abertos representam as amostras da permutação das hélices AB (Mb-C_GHAB). As linhas com círculos cheios representam as amostras da permutação da hélice A (Mb-B_GHA), enquanto que as linhas com triângulos abertos representam as amostras de mioglobina selvagem (MbWT). A linha contínua com círculos abertos representa o espectro do grupo heme sem a adição de proteína. **A) Espectro de dicroísmo circular entre 200-260 nm.** A comparação dos espectros mostra a perda de estrutura secundária das apoproteínas mutantes em relação a apoproteína selvagem que, após a adição do grupo heme, são capazes de recuperar estrutura secundária para uma estrutura semelhante à da proteína selvagem. **B) Espectro de absorção entre 250 e 600 nm.** O experimento mostra apenas os espectros de absorção das formas holo (CN⁻) apresentando as regiões do triptofano (260-295 nm) e da banda de Soret (390-450 nm) e da banda Q (500-600 nm). Os espectros evidenciam a ligação e a coordenação do grupo heme às proteínas dado à intensa absorção nas bandas de Soret e Q. Os espectros foram normalizados para efeitos de comparação e mostram que as mioglobinas (selvagem e mutantes) apresentam as mesmas características de ligação e de coordenação do grupo heme. O espectro do grupo heme livre de proteína está representado pela linha tracejada.

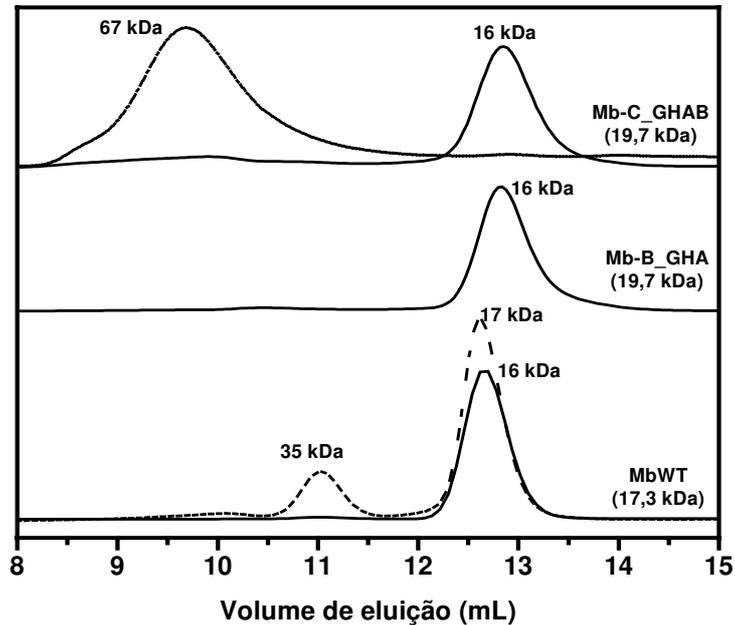


Figura 10 - **Cromatograma em gel filtração das mioglobinas selvagem e mutantes de permutação circular.** As amostras de proteínas foram diluídas para a concentração final de 0,5 mg/mL em tampão 50 mM fosfato de sódio pH 7,0 contendo NaCl 150 mM. As corridas cromatográficas foram realizadas à temperatura 20°C utilizando um HPLC *purifier* (Pharmacia) e uma coluna superdex 75 HR 10/30 (Pharmacia) equilibrada com o mesmo tampão de diluição das amostras de proteína. Os perfis de eluição das formas holo (linhas contínuas) foram monitorados utilizando A_{280} e A_{423} para observar a região dos triptofanos e da ligação do grupo heme (banda de Soret), respectivamente. Apenas os dados de A_{423} foram utilizados para a construção do gráfico. Os perfis cromatográficos da amostra na forma apo estão representados pelas linhas tracejadas e foram monitorados utilizando A_{280} . As massas moleculares aparentes, determinadas neste experimento, foram calculadas utilizando os valores de eluição das amostras em referência aos de eluição do padrão de massa molecular que está descrito em Material e Métodos. As massas moleculares esperadas estão mostradas entre parênteses.

Tabela 2- Parâmetros biofísicos das mioglobinas selvagem (WT) e mutantes de deleções e de permutação em pH fisiológico.

Proteína	$[\theta]_{222}$ (deg.cm ² .dmol ⁻¹)	f_H (%) ^a	$\langle \lambda \rangle^b$ (nm)	A_{Soret} $\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	$A_{\text{Soret}/280}$	δ -Banda (nm)	Banda Q (nm)
ApoMbWT	-18.000	65	338	- ^c	-	-	-
MbWT (H ₂ O)	NR ^d	85	-	408	5,0	NR	NR
MbWT (CN ⁻)	-25.000	85	-	422	3,2	358	540
ApoMb ₁₋₁₂₃	-2.800	20	345	-	-	-	-
Mb ₁₋₁₂₃ (H ₂ O)	Não liga heme	-	-	-	-	-	-
Mb ₁₋₁₂₃ (CN ⁻)	Não liga heme	-	-	-	-	-	-
ApoMb ₁₋₉₉	-5.500	30	343	-	-	-	-
Mb ₁₋₉₉ (H ₂ O)	-6.600	37	NR	415	3,8	NR	NR
Mb ₁₋₉₉ (CN ⁻)	-6.600	37	NR	415	3,8	360	538 e 570
ApoMb-HAB_F	-8.900	39	344	-	-	-	-
Mb-HAB_F (H ₂ O)	-12.000	48	-	416	4,3	359	538
Mb-HAB_F (CN ⁻)	-12.000	48	-	417	4,8	359	538
ApoMb-B_GHA	-11.700	46	344	-	-	-	-
Mb-B_GHA (H ₂ O)	NR	NR	-	409	5	NR	NR
Mb-B_GHA (CN ⁻)	-24.800	84	-	422	3,1	358	540
ApoMb-C_GHAB	-12.400	48	344	-	-	-	-
Mb-C_GHAB (H ₂ O)	NR	NR	-	409,5	5,0	NR	NR
Mb-C_GHAB (CN ⁻)	-23.600	82	-	422	3,2	358	540

Os dados desta tabela são representados pelos valores médios de 3 a 5 experimentos independentes. Os valores dos desvios padrão não ultrapassam 5% dos valores apresentados pelas médias. ^aPorcentagem de α -hélice foi calculada de acordo com a seguinte equação (Chen *et al.*, 1974): $[\theta]_{222} = (f_H - iK/N)[\theta]_{\text{ref}}$. Nesta equação $[\theta]_{222}$ é a elipticidade molar (deg.cm².dmol⁻¹) em 222 nm da amostra da proteína analisada; f_H é a porcentagem em α -hélice; i é o número de hélices da proteína analisada; K é a constante em 222 nm que foi fixada em 2,57; N é o número de aminoácidos da proteína e $[\theta]_{\text{ref}}$ é a elipticidade molar considerando 100 % (valor de referência) de estrutura em α -hélice de um polipeptídeo composto por alaninas, que foi determinada experimentalmente, como sendo igual -34.686 deg.cm².dmol⁻¹. Para efeito de comparação, Mb₁₋₁₂₃ perdeu 20% e Mb₁₋₉₉ perdeu 35% da estrutura primária. ^bCentro de massa do espectro de fluorescência calculado conforme descrito em Material e Métodos (Eq. 01). ^cParâmetro que não pode ser determinado experimentalmente. ^dParâmetro experimental não realizado.

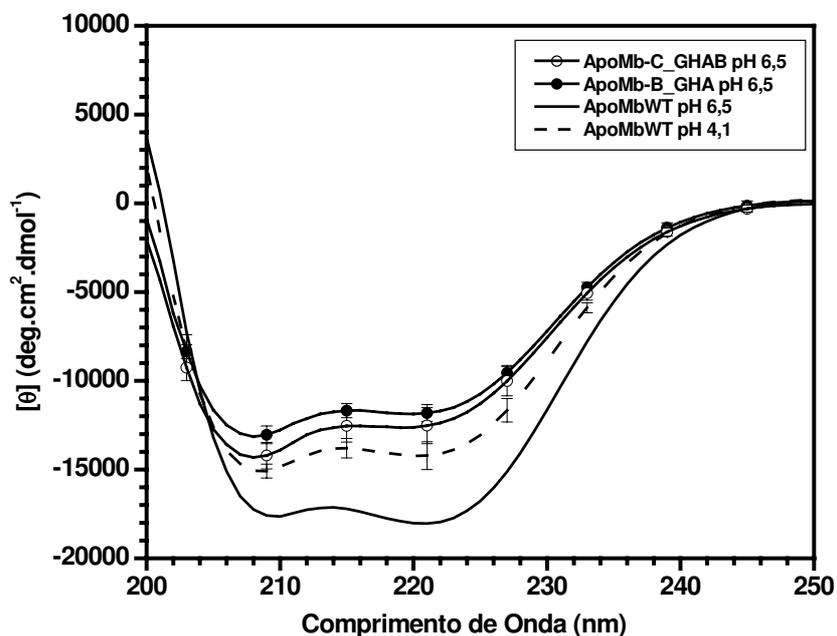
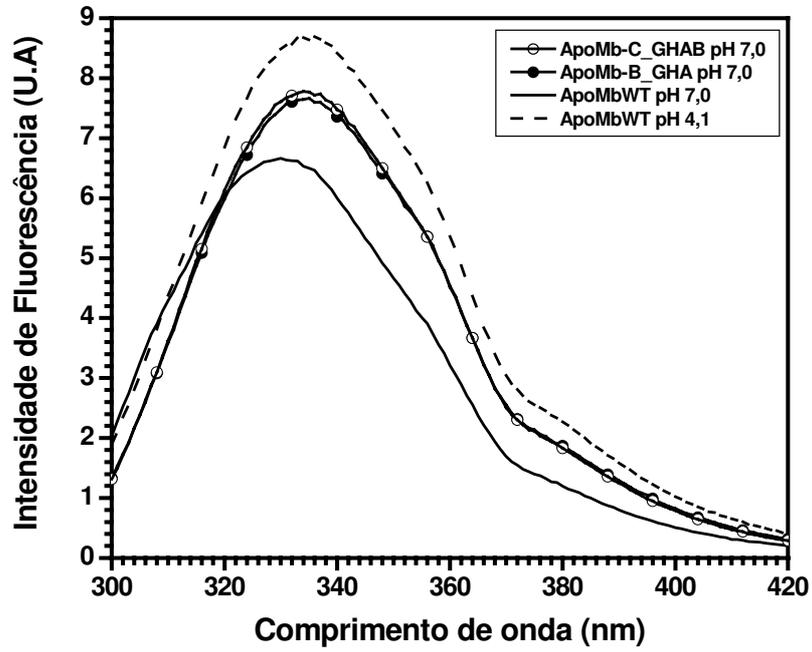


Figura 11 - **Espectros de CD, entre 200 e 250 nm, das apomioglobinas selvagem (ApoMbWT) e mutantes de permutação circular ApoMb-C_GHAB e ApoMb-B_GHA.** As proteínas foram diluídas para a concentração final de 2 μ M em tampão 2 mM acetato de sódio (pHs 4,1 ou 6,5) a 4 °C. A comparação dos espectros mostra que as permutações circulares apresentam perfis de estrutura secundária global em pH fisiológico mais parecido com o perfil apresentado por ApoMbWT em pH 4,1 do que em pH 6,5.

A



B

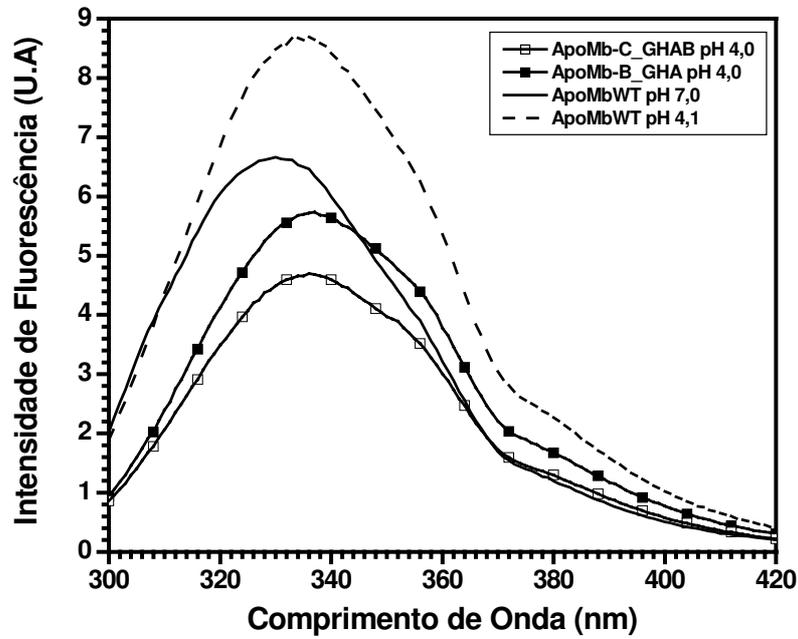


Figura 12 - **Espectros de emissão de fluorescência estática das apomioglobinas selvagem e mutantes de permutação circular em diferentes pHs.** As proteínas foram diluídas para a concentração final de 5 μ M em tampão 10 mM acetato de sódio (pHs 4,1 ou 7,0) a 4 °C. As medidas de emissão de fluorescência foram realizadas utilizando a mesma padronização do fluorímetro e no mesmo dia. **A) Espectros adquiridos em pH 7,0 e 4,1 para ApoMbWT e em pH 7,0 para os mutantes de permutação.** Os dois mutantes de permutação apresentam os mesmos valores de intensidade de fluorescência e de comprimento de onda de emissão máxima, quando comparados entre si. As intensidades destes espectros estão entre os valores de intensidade observados para ApoMbWT em pH 7,0 e em pH 4,1. Os comprimentos de onda de emissão máxima dos mutantes de permutação são iguais ao da ApoMbWT em pH 4,0. **B) Espectros adquiridos em pH 7,0 e 4,1 para ApoMbWT e em pH 4,0 para os mutantes de permutação.** Os dois mutantes de permutação apresentam valores diferentes de intensidade de emissão de fluorescência, mas mesmo comprimento de onda de emissão máxima, quando comparadas entre si. Adicionalmente, estes mutantes apresentam mesmo comprimento de onda de emissão máxima que as amostras de ApoMbWT em pH 4,1, mas os valores de intensidade de fluorescência estão abaixo dos valores observados para os pHs 7,0 e 4,1 de ApoMbWT.

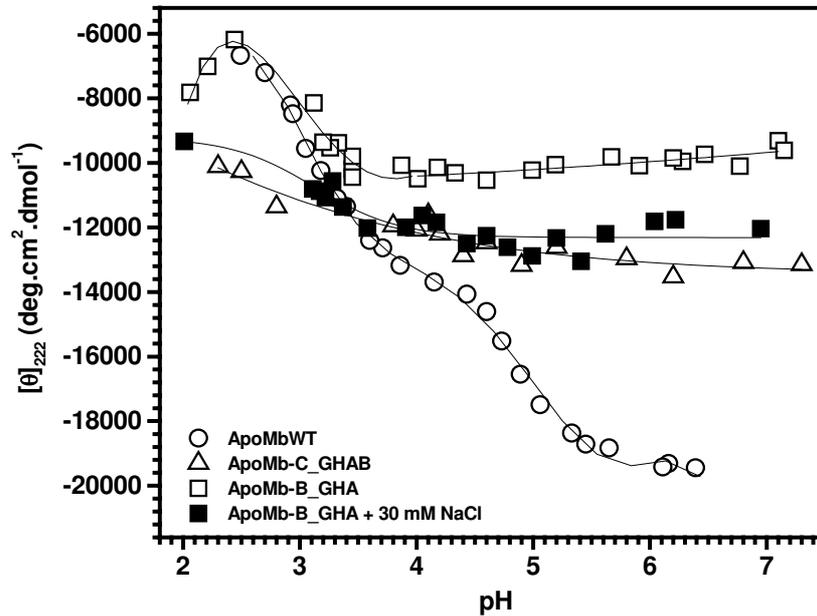
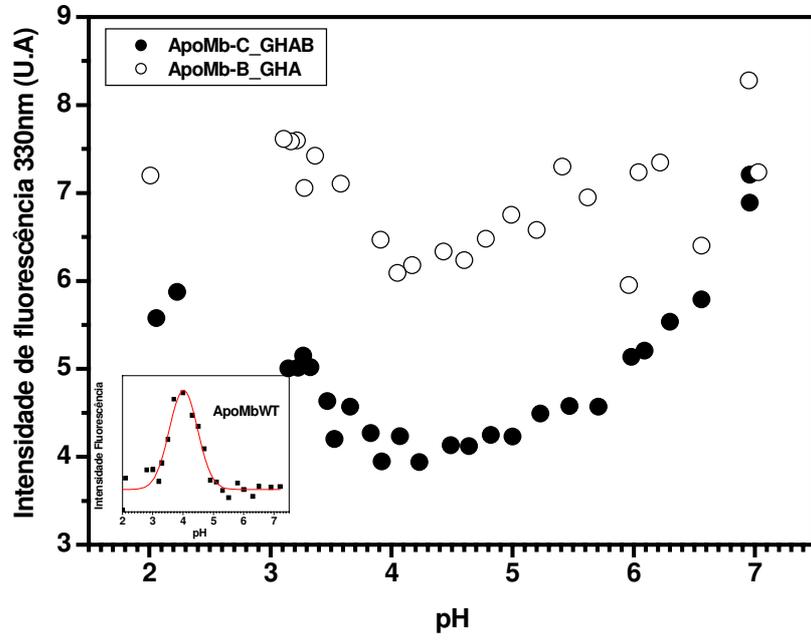


Figura 13- Efeito da variação de pH sobre as apomioglobinas selvagem (ApoMbWT) e mutantes de permutação circular monitorado pela $[\theta]_{222}$. As amostras de proteína foram diluídas para a concentração final de $2 \mu\text{M}$ em tampão 2 mM acetato de sódio (diversos pHs) e mantidas em equilíbrio durante 30 min a 4°C (mesma temperatura das medidas espectroscópicas). As linhas servem apenas para guiar os olhos do leitor. O experimento mostra que ApoMb-C_GHAB é resistente ao desenovelamento em meio ácido e que esta característica é incorporada à ApoMb-B_GHA após a adição de 30 mM NaCl.

A



B

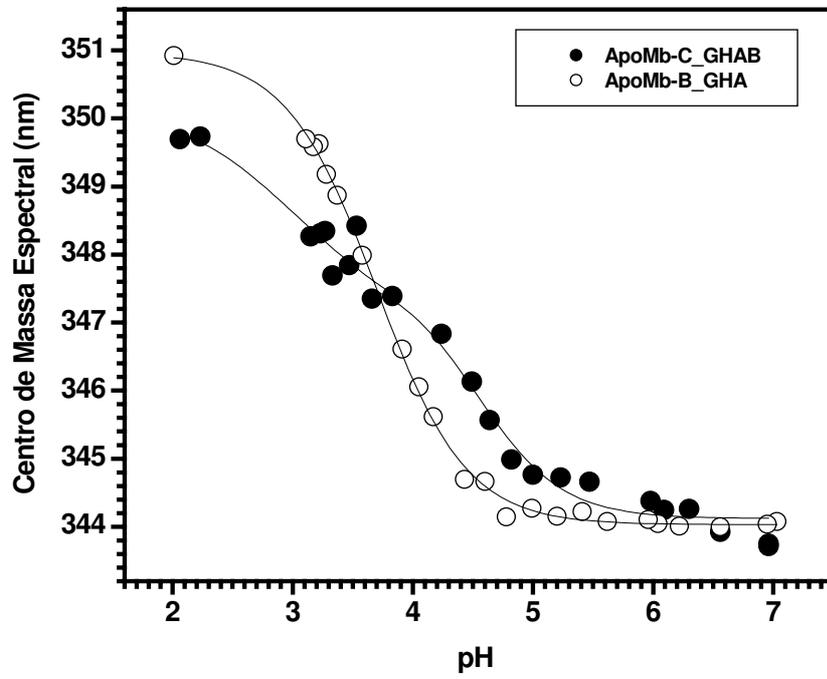
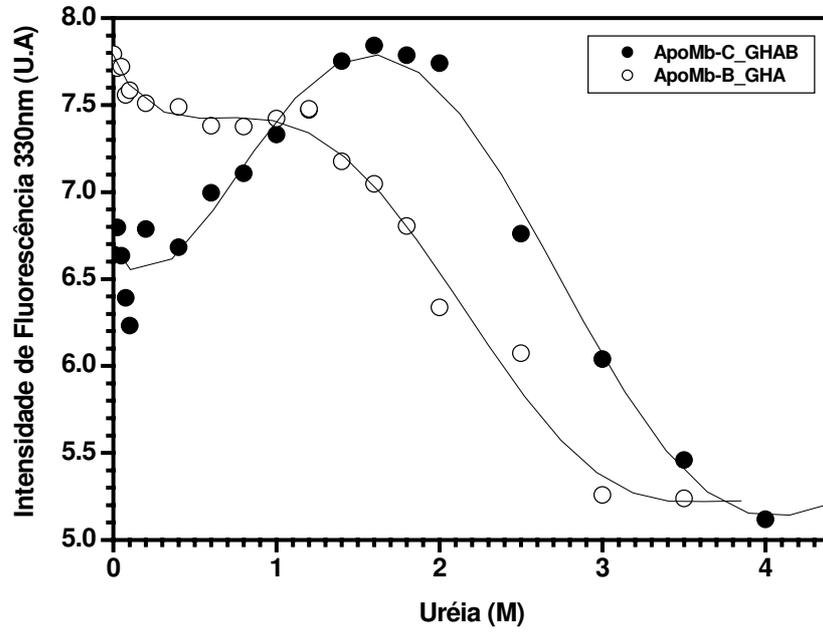


Figura 14 – **Efeito da variação de pH sobre o ambiente dos resíduos de triptofano dos mutantes de permutação circular.** As amostras de proteína foram diluídas para a concentração final de 1 μ M em tampão 2 mM acetato de sódio (diversos pHs) e mantidas em equilíbrio durante 30 min a 4 °C (mesma temperatura das medidas espectroscópicas). As linhas servem apenas para guiar os olhos do leitor. **A) Emissão de fluorescência do triptofano avaliada pela intensidade máxima em 330 nm.** O gráfico inserido nesta figura mostra a variação da intensidade fluorescência dos resíduos de triptofanos de apomioglobina selvagem em função do pH. O resultado mostra que a ApoMb-C_GHAB apresenta uma maior supressão na intensidade de emissão de fluorescência do que ApoMb-B_GHA quando o valor de pH vai de 7 para 4. As permutéínas apresentam um perfil de desenovelamento em meio ácido quase que inverso ao da proteína selvagem **B) Emissão de fluorescência do triptofano avaliada pelo centro de massa espectral.** A variação do centro de massa espectral de ApoMb-B_GHA em função do pH é bem mais cooperativo do que à de ApoMb-C_GHAB que parece apresentar pelo menos um intermediário em pH próximo de 3,5.

A



B

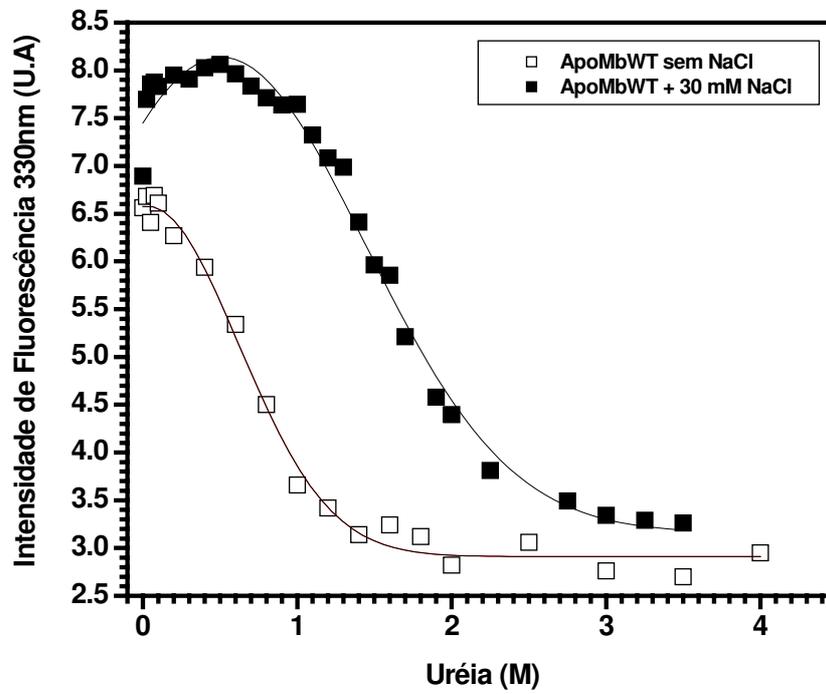


Figura 15- **Desenovelamento das mioglobinas selvagem e mutantes de permutação circular em pH 4,1 induzido por uréia e monitorado pela intensidade de fluorescência em 330 nm.** A proteína foi diluída para a concentração final de 2 μ M em tampão 2 mM acetato de sódio pH 4,1 (contendo concentrações crescentes de uréia). O tempo de equilíbrio para se realizar as medidas espectroscópicas foi de 50 min a 4 °C (mesma temperatura das medidas espectroscópicas). As medidas de fluorescência das duas amostras dos mutantes de permutação foram feitas utilizando a mesma padronização do fluorímetro, enquanto que as medidas das amostras da proteína selvagem foram adquiridas em dias diferentes. As linhas servem apenas para guiar os olhos do leitor. **A) Intensidade de emissão de fluorescência em 330 nm de ApoMb-C_GHAB e ApoMb-B_GHA.** ApoMb-C_GHAB apresenta um aumento da intensidade de emissão de fluorescência à medida que a concentração de uréia aumenta de 0 para 1,5 M, enquanto que este efeito não é observado para ApoMb-B_GHA. **B) Intensidade de emissão de fluorescência em 330 nm de ApoMbWT.** A adição de 30 mM NaCl provoca um aumento na estabilidade da proteína selvagem e promove uma modificação no padrão de desenovelamento, onde é possível observar um aumento progressivo da intensidade de emissão de fluorescência à medida que a concentração de uréia aumenta de 0 para 0,5 M.

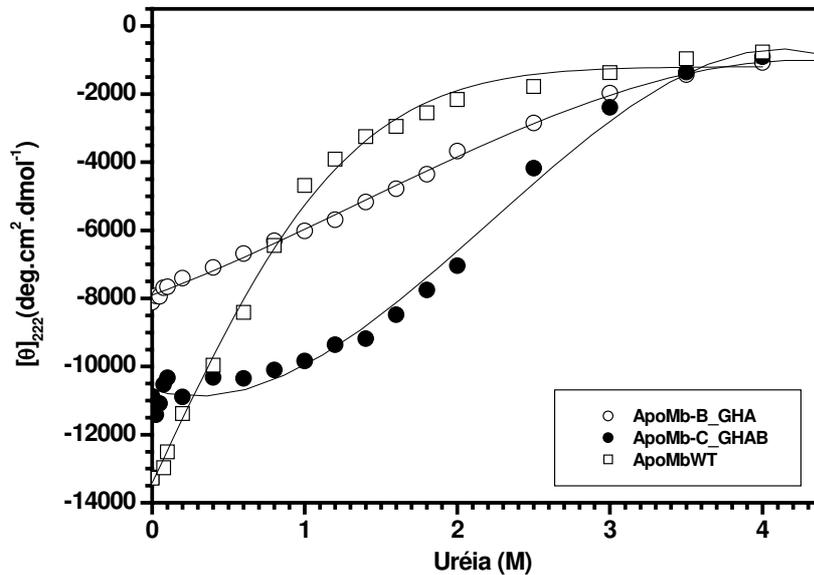
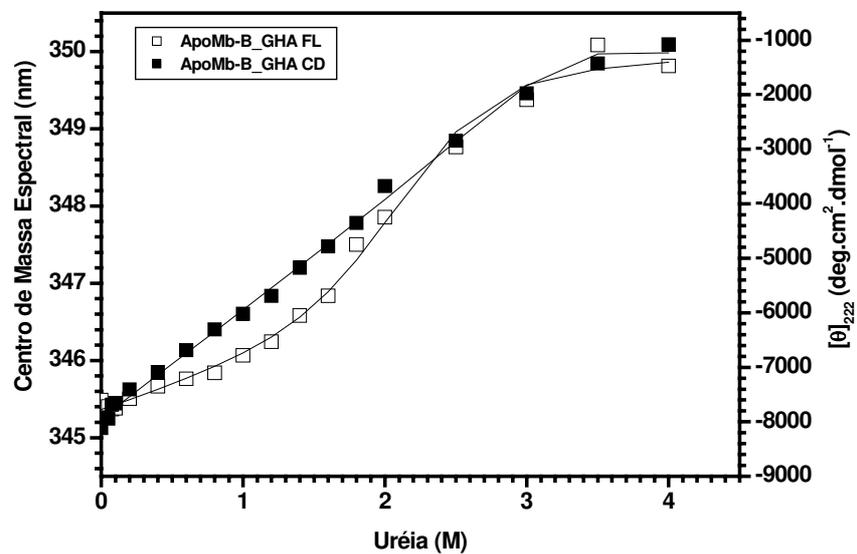


Figura 16- **Desenovelamento das mioglobinas selvagem e mutantes de permutação circular em pH 4,1 induzido por uréia e monitorado por $[\theta]_{222}$.** A proteína foi diluída para a concentração final de 2 μ M em tampão 2 mM acetato de sódio pH 4,1 (contendo concentrações crescentes de uréia). O tempo de equilíbrio anterior às medidas espectroscópicas foi de 50 min a 4 °C (mesma temperatura das medidas espectroscópicas). As linhas traçadas sobre as curvas servem apenas para guiar os olhos do leitor.

A



B

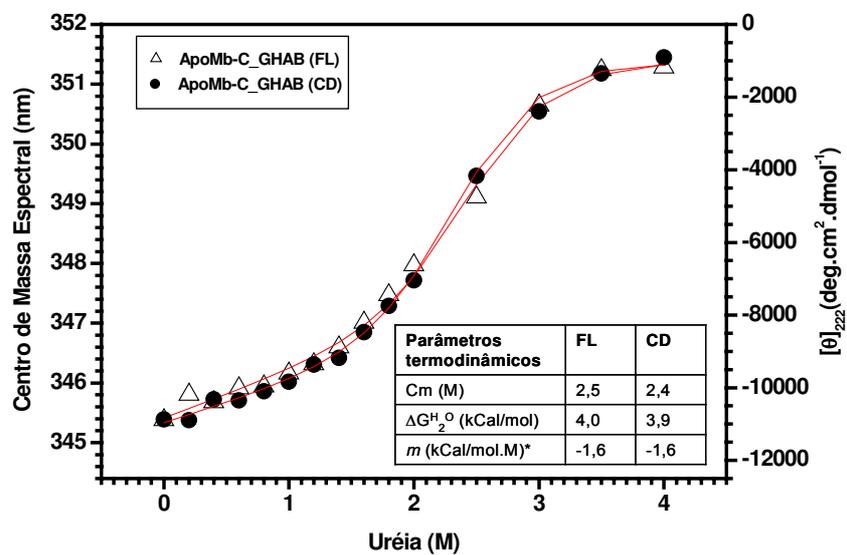


Figura 17. **Varição do centro de massa espectral e da $[\theta]_{222}$ em função da concentração de uréia.** As condições experimentais estão descritas na legenda da figura anterior. **A) ApoMb-B_GHA.** As curvas de desenovelamento monitoradas pela variação do centro de massa espectral e dicroísmo circular não se sobrepõem completamente. As linhas pretas sobre as curvas servem apenas para guiar os olhos. **B) ApoMb-C_GHAB.** As curvas de desenovelamento monitoradas pela variação do centro de massa espectral e dicroísmo circular se sobrepõem completamente. A linha vermelha mostra o ajuste de curva feito através da equação de Santoro e Bolen (1988). A tabela inserida nesta figura mostra os valores de alguns parâmetros, para avaliação da estabilidade da proteína, que foram extraídos a partir deste ajuste.

Tabela 3 – Parâmetros biofísicos das apomioglobinas selvagem (MbWT) e mutantes de permutação Mb-B_GHA e Mb-C_GHAB em diferentes pHs.

Amostras e valores de pH (2-4 mM acetato de sódio)	CD ₂₂₂ (deg.cm ² .dmol ⁻¹)	f _H (%) ^a	FL _{λmax} (nm) ^b	<λ> (nm) ^c
WT pH 7,0	-18.000	65	328	338
WT pH 4,2	-14.100	54	334	345
WT pH 3,4	-10.550	44	338	347
WT pH 2,0	-4.950	28	343	352
WT pH 7,0 6M Gnd-Cl	-500	3,0	351	356
C-GHAB pH 7,0	-12.400	48	333	344
C-GHAB pH 4,2	-11.500	46	335	347
C-GHAB pH 3,4	-11.000	44	338	348
C-GHAB pH 2,0	-10.200	42	340	349
C-GHAB pH 7,0 6M Gnd-Cl	-250	1,0	349	356
B-GHA pH 7,0	-11.700	46	335	344
B-GHA pH 4,2	-9.400	40	337	346
B-GHA pH 3,4	-9.570	40	338	348
B-GHA pH 2,0	-7.800	35	342	350
B-GHA pH 7,0 6M Gnd-Cl	-300	1,5	349	356

Os dados mostrados nesta tabela representam os valores médios de três a cinco experimentos independentes. Os valores dos desvios padrão não ultrapassam 5% e 0,5% dos valores médios dos experimentos de CD₂₂₂ e de emissão de fluorescência dos triptofanos, respectivamente. ^aPorcentagem de α-hélice calculada pelo método de Chen *et al.* (1974) conforme equação descrita na Tabela 2. ^bComprimento de onda de máxima intensidade de fluorescência. ^cCentro de massa do espectro de emissão de fluorescência calculado conforme descrito em Material e Métodos (Eq. 01).

Tabela 4 – Tempo de vida de fluorescência dos dois triptofanos das apomioglobinas selvagem e mutantes de permutação em diferentes pH.

Tratamento	τ_1 (ns)	f_1 (ns)	τ_2 (ns)	f_2 (ns)	χ^2	$\langle \tau \rangle$ (ns)
ApoMbWT pH 7,0	4,17	0,49	1,39	0,51	6,96	2,04±0,22
ApoMbWT pH 4,0	5,53	0,66	1,57	0,34	8,81	2,95±0,10
ApoMbWT pH 2,0	3,81	0,56	1,40	0,44	9,53	2,12±0,07
ApoMb-C_GHAB pH 7,0	5,51	0,68	2,08	0,32	9,27	3,52±0,08
ApoMb-C_GHAB pH 4,0	5,61	0,72	1,44	0,28	9,53	3,24±0,25
ApoMb-C_GHAB pH 2,0	6,70	0,75	1,87	0,25	8,56	4,05±0,02
ApoMb-B_GHA pH 7,0	5,56	0,63	1,96	0,37	9,29	3,07±0,20
ApoMb-B_GHA pH 4,0	5,18	0,72	1,41	0,28	10,0	2,75±0,22
ApoMb-B_GHA pH 2,0	6,24	0,70	1,85	0,30	7,02	3,46±0,18

τ_1 e f_1 referem-se aos componentes de tempo de vida longo (τ =tempo e f =fração de contribuição de τ), enquanto τ_2 e f_2 referem-se aos componentes de tempo de vida curto que foram extraídos a partir da função bi-exponencial (Eq. 02) utilizada para a análise do decaimento de emissão de fluorescência (Material e Métodos); $\langle \tau \rangle$ é o tempo de vida médio calculado conforme descrito em Material e Métodos (Eq. 05) e χ^2 é o parâmetro estatístico que descreve a concordância entre o dado observado e o ajuste da curva experimental mostrada na Figura 5, qui-quadrado. Os valores dos componentes de tempo de vida (τ e f , onde $f_1 + f_2 = 1$) de decaimento de emissão de fluorescência representam os valores obtidos por um grupo de pelo menos 3 repetições.

Tabela 5 – Avaliação da estabilidade entre as formas Apo em pH 4,1 de mioglobina selvagem (estado intermediário em equilíbrio) e mutantes de permutação circular (Mb-C_GHAB e Mb-B_GHA) e entre as suas formas holo (cianoeme) em pH 7,0.

Amostras e condições experimentais#	Cm* (M) [FL/CD]	$\Delta G_D^{H_2O}$ (kcal/mol) [FL/CD]	<i>m</i> (kcal/mol.M) [FL/CD]	Tm** (°C) [CD]
ApoMbWT pH 4,1 (4°C)	0,8/0,8	1,2/1,2	-1,6/-1,6	NR
ApoMbWT pH 4,1 + 30 mM NaCl (4°C)	1,5/1,4	2,4/2,3	-1,6/-1,6	NR
ApoMb-C_GHAB pH 4,1 (4°C)	2,5/2,4	4,0/3,9	-1,6/-1,6	NR
ApoMb-B_GHA pH 4,1 (4°C)	1,9/1,7	NA/NA	NA/NA	NR
MbWT (CN ⁻) pH 7,0	NR	NR	NR	86
Mb-C_GHAB (CN ⁻) pH 7,0	NR	NR	NR	44
Mb-B_GHA (CN ⁻) pH 7,0	NR	NR	NR	65

#Para os pHs 4,1 e 7,0 as amostras foram diluídas em tampão 2 mM acetato de sódio e em tampão 10 mM fosfato de sódio, respectivamente. O monitoramento da estabilidade das proteínas mencionadas acima foi realizado pelas sondas de dicroísmo circular (CD) e de emissão de fluorescência dos triptofanos (FL).

*Cm, $\Delta G_D^{H_2O}$ e *m* foram obtidos a partir do ajuste das curvas de desenovelamento induzido por uréia de acordo com a equação desenvolvida por Santoro e Bolen (1988) [Eq. 16]. Para este ajuste, o valor de *m* foi fixado em -1,6 kcal/mol.M para evitar que as diferenças aparentes desta constante, entre as proteínas aqui analisadas, possam ocasionar incertezas na determinação da $\Delta G_D^{H_2O}$ (Luo *et al.*, 1997; Serrano *et al.* 1992). A exceção é feita para ApoMb-B_GHA que não apresentou cooperatividade entre as curvas de desenovelamento que foram monitorados por CD e FL. Neste caso, o valor de Cm é a mediana da curva de desenovelamento cujo valor nominal é representado em concentração molar de uréia.

**Tm é a temperatura do estado de transição obtida a partir da 1ª derivada aplicada sobre a curva de desenovelamento térmico monitorada por CD₂₂₂. Apesar dos desenovelamentos térmicos das mioglobinas estudadas aqui não serem reversíveis, o parâmetro Tm foi utilizado para a comparação das estabilidades entre as proteínas na forma nativa. Para MbWT, o valor de Tm foi obtido a partir do desenovelamento térmico monitorado pela calorimetria (DSC). NA significa análise experimental não aplicável e NR experimento não realizado.

5. DISCUSSÃO.

Uma das estratégias para estudar a via de enovelamento, a estabilidade e como ocorre a formação da estrutura nativa de proteínas é a engenharia de proteínas, que permite a criação de proteínas com modificações em sua estrutura primária. Esta estratégia foi adotada no desenvolvimento deste trabalho, onde foram criados mutantes de deleção das hélices C-terminais H (Mb₁₋₁₂₃) e GH (Mb₁₋₉₉), de permutação da hélice C-terminal (H) com deleção da hélice G (Mb-HAB_F) e de permutação das hélices N-terminais A (Mb-B_GHA) e AB (Mb-C_GHAB) para tentar entender melhor como ocorre o enovelamento da mioglobina selvagem. Para este estudo, estes mutantes foram caracterizados quanto à estrutura secundária e terciária através das técnicas de dicroísmo circular e emissão de fluorescência dos triptofanos, quanto à hidrodinâmica através da cromatografia em gel filtração e quanto à estabilidade através do monitoramento do desenovelamento químico em equilíbrio. De forma geral, as mudanças ocorridas nos valores de $[\theta]_{222}$ (sinal de CD mais negativo significa aumento de estrutura secundária) e de centro de massa espectral (valor maior significa triptofanos mais expostos e portanto, perda de estrutura terciária) serão abordados como perda ou aumento das estruturas secundárias e terciárias, respectivamente.

5.1. Mutantes de deleção: Mb₁₋₉₉, Mb₁₋₁₂₃ e Mb-HAB_F.

Os dados referentes ao mutante Mb₁₋₁₂₃ estão discutidos no manuscrito em anexo (item 9.1), mas estão repetidos aqui para auxiliar na discussão.

5.1.1. Dicroísmo circular.

O espectro de CD de apomioglobina selvagem em pH fisiológico apresenta mínimos característicos em 208 e em 222 nm (ver revisão de Venyaminov e Yang, 1996). Esta característica do espectro de CD na região do UV distante é pertencente à classe de proteínas que possuem sua estrutura secundária predominantemente formada por α -hélices (ver revisão de Kelly e Price, 1997).

O espectro de CD de ApoMb selvagem foi utilizado nas comparações com os espectros das proteínas mutantes. Neste tipo de comparação, as unidades de

medidas de CD são padronizadas em elipticidade molar ($[\theta]$), a qual leva em consideração o número de resíduos de aminoácidos da proteína que está sendo analisada e a concentração de proteína utilizada nos ensaios (ver como exemplo: Ribeiro e Ramos, nesta tese – item 9.2). A $[\theta]$ constitui uma forma de normalização dos espectros, o que permite comparação direta entre espectros de proteínas com diferentes massas moleculares. As comparações dos espectros de CD mostraram que ApoMb₁₋₉₉ em pH 6,5 apresenta λ mínimo em 206 nm ao invés de 208 nm e que tanto este quanto o λ mínimo em 222 nm são menos intensos do que o esperado se a perda de estrutura fosse local. Ou seja, a deleção afeta a estrutura de outras regiões de ApoMb. ApoMb₁₋₁₂₃, apesar de possuir λ mínimo em 208 nm, mostrou λ mínimo em 222 nm pouco proeminente. Adicionalmente, a perda global de sinal de CD para estas proteínas mutantes foi significativa, tendo os mutantes no máximo 1/3 da quantidade de α -hélice do que a proteína selvagem. Além disso, o programa usado para a predição de estrutura secundária mostrou a presença de estrutura em folhas-beta, que não estão presentes na Mb selvagem (dado não apresentado), e que pode ser uma característica de proteínas que estejam agregando. O mesmo tipo de comportamento foi verificado para o mutante de permutação com deleção, ApoMb-HAB_F (menos de 50% da estrutura secundária de ApoMbWT).

5.1.2. Emissão de fluorescência.

A medida de intensidade de fluorescência do triptofano foi utilizada como sonda da estruturação em torno da hélice A que é onde se encontram os dois triptofanos da mioglobina (Kendrew, 1962). Estes resíduos se encontram voltados para o interior da proteína em pHs maiores que 5,0 e possuem espectros característicos. À medida que a proteína vai sendo desenovelada, há um aumento na intensidade de emissão de fluorescência e um concomitante deslocamento do centro de massa espectral. Os resíduos de triptofano se encontram quase que completamente expostos ao solvente em condições desnaturantes (pH 2). Os dados de emissão de fluorescência para as proteínas mutantes mostram que os resíduos de Trp estão parcialmente expostos ao solvente mesmo em pH 7,0, o

que é compatível com os dados de CD, pois mostra que há perda tanto de estrutura secundária quanto de estrutura terciária. Além disso, as hélices A, G e H são bem empacotadas umas contra as outras na proteína selvagem e as deleções muito provavelmente estão desestabilizando o empacotamento em torno da hélice A levando à exposição dos Trps.

5.1.3. Coordenação de heme e cianoheme.

A ApoMb₁₋₉₉ foi capaz de ligar heme e cianoheme, enquanto ApoMb₁₋₁₂₃ não. Este comportamento diferenciado entre estas proteínas ainda não está esclarecido, mas certamente tem relação com a menor porcentagem de α -hélice apresentada pelo mutante ApoMb₁₋₁₂₃. Mesmo assim, a ligação do grupo heme em ApoMb₁₋₉₉ não é como na proteína selvagem, pois esta ligação promove o deslocamento do pico máximo de absorção do heme de 395 nm para 414 nm, enquanto que em holoMbWT este deslocamento ocorre para 408 nm. A resposta pode estar em uma coordenação parcial do grupo heme. Em pH fisiológico, o grupo heme parece ser capaz de continuar coordenado em MbWT mesmo em condições desnaturantes (Ramos *et al.*, 1999).

A ApoMb₁₋₁₂₃ possui uma deleção menor e um maior número de resíduos que participam da coordenação e/ou estabilidade de ligação do heme do que a ApoMb₁₋₉₉ (Ver Fig. 2B para detalhamento dos resíduos que participam deste processo de ligação e coordenação do grupo heme). Entretanto, essa proteína apresenta menor estruturação secundária ($f_H = 23\%$) do que ApoMb₁₋₉₉ ($f_H = 32\%$) e ainda não liga heme. Isto poderia ocorrer devido a um efeito deletério na estruturação da hélice G, no mutante Mb₁₋₁₂₃, que necessitaria da hélice H para adquirir maior estabilidade e estrutura (maior % de α -hélice). A deleção da hélice H exporia uma grande quantidade de resíduos hidrofóbicos da hélice G favorecendo a formação de estruturas não nativas, como exemplo: estruturas agregadas. Contrariamente, se a hélice G estiver estruturada, esta hélice poderia interagir com a hélice E através de interações hidrofóbicas e/ou eletrostáticas que permitiria a aproximação da hélice F e a conseqüente formação de uma cavidade para a coordenação do grupo heme. As hélices E e F possuem na sua estrutura primária resíduos de histidina (His64(E) e His93(F)) que são importantes na

coordenação do grupo heme (Hargrove *et al.*, 1996a). Conseqüentemente, a deleção da hélice H causaria uma menor estruturação deste conjunto de hélices e desfavoreceria a ligação do grupo heme. Mais uma vez, a análise do comportamento do mutante de permutação com deleção, ApoMb-HAB_F, que pode ser um mutante que simula a condição em que o mutante ApoMb₁₋₉₉ é colocado na presença do peptídeo referente à hélice H de MbWT, mostra que a perda de estrutura foi a provável causa para a perda da função da proteína. Este mutante se liga ao grupo heme, enquanto que o mutante de deleção da hélice H não.

5.1.4. Deleção da hélice H (Mb₁₋₁₂₃) comparada com as deleções das hélices GH (Mb₁₋₉₉) e da hélice G com permutação da hélice H (Mb-HAB F).

A deleção das hélices C-terminais da mioglobina é responsável pela redução da estabilidade e da capacidade de ligação do grupo heme das proteínas Mb₁₋₁₂₃, Mb₁₋₉₉ e Mb-HAB_F. A primeira evidência desta afirmação foi fornecida pelos experimentos de expressão, onde os mutantes Mb₁₋₉₉, Mb₁₋₁₂₃ e Mb-HAB_F foram expressos e acumulados em estruturas chamadas de corpos de inclusão. Ao contrário de MbWT, que é acumulada em corpos de inclusão quando é expressa a 42 °C, a expressão dos mutantes em corpos de inclusão foi independente da temperatura (37 °C e 42 °C). Nossos dados também mostram que a deleção das hélices C-terminais causam perda de estrutura secundária e terciária. Parte desta fonte de desestabilização desaparece com a deleção da hélice G. Experimentos com peptídeos representando as hélices G, H e GH mostram que, isoladamente, G tem menor propensão a formar uma estrutura estável e também contribui para a desestabilização do peptídeo GH, apesar deste peptídeo ser capaz de formar uma estrutura em forma de grampo (ver Waltho *et al.*, 1993 e discussão mais detalhada abaixo). Esta hipótese é reforçada quando analisamos o mutante de permutação com deleção, ApoMb-HAB_F, que perdeu a hélice G. Neste mutante, apesar da hélice H não ter contribuído na estruturação da hélice A, uma vez que os triptofanos também se apresentaram parcialmente expostos, a hélice H parece ter contribuído positivamente para o aumento da estruturação secundária e na redução da tendência à agregação.

5.1.5. Análise geral das deleções.

O mutante Mb₁₋₉₉ mostrou redução da estruturação secundária, em comparação com a MbWT, e uma alta tendência à agregação, uma característica também verificada para Mb₁₋₁₂₃. Este comportamento parece ser característico dos mutantes de deleção das hélices C-terminais como foi também mostrado por Chow *et al.* (2003) através da utilização de mutantes de deleção das hélices H (Mb₁₋₁₁₉), FGH (Mb₁₋₇₇) e CDEFGH (Mb₁₋₃₆). Chow *et al.* (2003) sugerem que, durante a tradução da proteína, o enovelamento da Mb selvagem depende do comprimento das cadeias de aminoácidos. Estes mutantes são descritos por Chow *et al.* (2003) como sendo altamente passíveis de agregação, além de possuírem alta porcentagem de estruturas β -pregueadas, principalmente Mb₁₋₃₆ e Mb₁₋₇₇, que é um resultado semelhante ao encontrado por nós com os mutantes de deleção das hélices H (Mb₁₋₁₂₃) e GH (Mb₁₋₉₉).

Os estudos da propensão à formação de estruturas secundárias, avaliados pelos espectros de CD e RNM, com os peptídeos de ApoMb (Waltho *et al.*, 1993) mostraram que a hélice H, isoladamente, pode formar uma alta quantidade de α -hélice. No entanto, esta hélice é muito mais estável quando associada à ApoMb e ainda possui uma porcentagem significativa de estrutura secundária (α -hélice) mesmo em condições de pH 2 (Eliezer *et al.*, 1998) e é provavelmente a primeira hélice a se estruturar durante o enovelamento de Mb, como foi mostrado pela simulação molecular realizada por Onufriev *et al.* (2003). Entretanto, o peptídeo correspondente à hélice G, analisado isoladamente, tem uma alta tendência à formação de conformação do tipo α -hélice, mas apresenta baixa estrutura deste tipo quando solubilizado em água (Waltho *et al.*, 1993). Nossa explicação é que este peptídeo só se estrutura na mioglobina se a hélice H estiver associada e que na ausência desta hélice, a hélice G seria a causadora de uma maior instabilidade da estrutura de Mb. Entretanto, Eliezer e Wright (1996) e Lecomte *et al.* (1999), estudando a estrutura de ApoMb por RNM mostraram que o início da hélice G apresentava flutuações conformacionais que possivelmente são aumentadas quando a estruturação da hélice H é reduzida. Este aumento de flutuação conformacional poderia ser estendido à toda hélice G, causando uma desestabilização que poderia ser transferida à proteína inteira. Em favor dessa

hipótese está a baixa capacidade de ligação ao grupo heme que foi mostrada pelo mutante Mb₁₋₁₂₃ em comparação com as Mbs com deleções maiores tais como os fragmentos: Mb₃₂₋₁₀₅ de cavalo (De Sanctis *et al.*, 1986; De Sanctis *et al.*, 1988), Mb₂₉₋₁₀₅ de baleia (Grandori *et al.*, 2000), Mb₁₋₉₉ e Mb-HAB_F (este trabalho). O trabalho de Chow *et al.* (2003), utilizando Mb₁₋₇₇ (deleção das hélices FGH), que não apresenta dados de ligação do grupo heme, mostra que esta proteína tem uma $[\theta]_{222}$ em torno de $-6.000 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ e que é muito similar à $[\theta]_{222}$ de Mb₁₋₉₉. Esta similaridade possivelmente ocorre porque a hélice F se encontra desestruturada na ApoMbWT (Eliezer e Wright, 1996) e também na Mb₁₋₉₉.

A menor afinidade de Mb₁₋₉₉ para se ligar ao grupo heme pode ser causada pela ausência dos resíduos Phe138, Ile107, Leu104 e Tyr103 de MbWT que fazem contatos indiretos com o grupo heme (Hargrove *et al.*, 1996b). O mutante de deleção (Mb₂₉₋₁₀₅) descrito por Grandori *et al.* (2000) não tem os resíduos Ile107 e Phe138, também é expresso e acumulado na forma de corpos de inclusão e aparentemente possui baixa afinidade pelo grupo heme. Os mutantes de deleção analisados em nosso trabalho indicam também que as formas apo não apresentam estado nativo semelhante à proteína selvagem, em acordo com os resultados com outros mutantes de deleção C-terminal (Chow *et al.*, 2003; Grandori *et al.*, 2000). Contrário à proteína selvagem, nossos mutantes de deleção, Mb₁₋₉₉, e de permutação linear, Mb-HAB_F, têm conteúdos em α -hélices reduzidos, resíduos de triptofano parcialmente expostos e tendência à formação de agregados, porém em menor escala que a tendência observada para os mutantes de deleção descritos por Chow *et al.* (2003), Mb₁₋₃₆, Mb₁₋₇₇ e Mb₁₋₁₁₉. De qualquer modo, nossos resultados estão de acordo com a hipótese sobre a necessidade de um núcleo central para a ligação do grupo heme nas globinas (De Sanctis *et al.*, 1986; De Sanctis *et al.* 1988; Craik *et al.* 1980 e Grandori *et al.*, 2000). Este núcleo central, que corresponde as hélices CDEF das globinas, é codificado pelo exon 2 das globinas, enquanto as seqüências correspondentes às hélices AB e GH são codificadas pelos exons 1 e 3, respectivamente (Konkel *et al.*, 1978 e 1979; Nishioka e Leder, 1979).

Embora a ligação do grupo heme tenha causado um aumento dos valores de elipticidade molar nos mutantes de deleção, especialmente para Mb-HAB_F,

este efeito não foi suficiente para as proteínas se igualarem à estruturação relativa de ApoMbWT, conforme foi observado para as permutações circulares (veja discussão abaixo). As formas holo dos mutantes de deleção não apresentam um pico máximo de absorção na região de Soret em 409 nm, mas têm um máximo em aproximadamente 415 nm, como foi observado para o fragmento Mb₂₉₋₁₀₅, descrito por Grandori *et al* (2000), que apresenta um espectro de CD na região do UV-distante que é similar ao formato do espectro de MbWT no estado nativo porém duas vezes menos intenso (Grandori *et al.*, 2000). Com este trabalho, Grandori *et al.* (2000) sugerem que a Mb se enovela por uma rota alternativa que é independente das hélices AGH, mas depende do cofactor heme (veja discussão abaixo). Entre as formas holo dos mutantes de deleção estudados aqui, apenas a Mb-HAB_F apresentou um pico de absorção na banda Q (538 nm), considerado por Craik *et al.* (1980) como sendo uma característica da coordenação específica do grupo heme nas globinas, enquanto a Mb₁₋₉₉ apresentou dois picos nesta banda (538 e 570 nm). A coordenação não específica do grupo heme pode ser característica de algumas proteínas como ocorre na albumina de soro bovino (BSA) e em alguns mutantes de hemoglobina (Bunn e Jandl, 1968; Craik *et al.*, 1980; Hargrove *et al.*, 1996b) que não apresentam pico de absorção na banda A após a ligação do grupo heme.

5.2. Mutantes de permutação: Mb-C_GHAB e Mb-B_GHA.

5.2.1. Efeito geral.

O enovelamento de uma proteína depende da sua estrutura primária e ocorre mesmo *in vitro* (Anfisen, 1973). Neste contexto, o estudo desenvolvido com permutadas é importante, pois estas proteínas possuem a mesma informação que a proteína selvagem, porém disposta de outra forma. Além disso, as permutações em proteínas são importantes para se estudar a possível participação de determinadas hélices no enovelamento, função e estabilidade da proteína. Uma proteína circularmente permutada pode ser visualizada como um polímero que tem suas extremidades N- e C- terminais ligadas e que pode ser clivado em locais

diferentes para a criação de novas extremidades N- e C- terminais (Goldemberg e Creighton, 1983). Muitas permutações são estáveis e funcionais, ou seja, independem da posição correta das extremidades N-terminais para um enovelamento apropriado (Heinemann e Hahn 1995).

A estratégia de permutação foi utilizada nesta tese, onde a engenharia genética possibilitou a criação de um cDNA (cDNA2Mb) composto por dois cDNAs de MbWT unidos em série por uma seqüência de nucleotídeos que codifica quatro pares de serinas e glicinas também em série (SG)₄. Este cDNA2Mb pode ser usado para a construção de uma diversidade de permutações de Mb. Criamos especificamente duas Mbs circularmente permutadas a fim de estudar o efeito da união em série das hélices GHA e GHAB, que são hélices envolvidas na formação dos estados intermediários da via de enovelamento de Mb (Hughson *et al.*, 1990; Loh *et al.*, 1995; Jamin e Baldwin 1996). As permutações Mb-B_GHA e Mb-C_GHAB tiveram altos níveis de expressão e foram purificadas diretamente na forma apo. Como descrito para os mutantes de deleção (ver acima), as formas apo das permutações têm características de uma proteína parcialmente desenovelada, são expressas diretamente na forma apo e são acumuladas em corpos de inclusão independentemente da temperatura utilizada, têm baixa porcentagem de estrutura do tipo α -hélice em relação à proteína selvagem, seus resíduos de triptofano estão parcialmente expostos e apresentam alta tendência à agregação (ver abaixo). Estes resultados indicam menor estabilidade para estes mutantes do que a observada para a mioglobina selvagem.

5.2.2. Estabilidade dos estados apo e holo em pH fisiológico.

A diferença de valores de elipticidade molar em 222 nm é uma propriedade biofísica que distingue a forma apo da holo de Mb (Breslow *et al.*, 1965). Na mioglobina selvagem a perda de elipticidade quando a proteína não está ligada ao grupo heme é de aproximadamente 20% (Breslow *et al.*, 1965). No caso das permutações apresentadas aqui, esta perda é da ordem de 50%. Na forma apo, tanto as características de CD quanto as características da fluorescência intrínseca das permutações Mb-C_GHAB e Mb-B_GHA se assemelham àquelas do intermediário de MbWT (Barrick e Baldwin, 1993a e 1993b). Nossa conclusão é

que o deslocamento da hélice A para perto das hélices G e H causa a formação de um centro bem estruturado (domínio) nesta região, mas que não está fisicamente conectado à região formada pelas hélices B-F (ou C-F, no caso de C_GHAB) o que dificultaria o enovelamento desta região (Fig. 18). Há conexão física com a hélice F, mas esta se encontra desestruturada mesmo na proteína selvagem na ausência do grupo heme (ver Introdução). A Figura 18 mostra esquematicamente como seria a estrutura destas permutéínas na ausência do grupo heme. Na proteína selvagem a formação do intermediário contendo as hélices AGH obriga a aproximação dos resíduos da região B-F auxiliando no posterior enovelamento da mesma. Nas permutações isto não aconteceria e as regiões CDEF e BCDEF tenderiam a ficar desenoveladas na ausência do grupo heme. O enovelamento destas proteínas será melhor discutido abaixo.

Porém, na presença do grupo heme, estas proteínas ganham características similares à da proteína selvagem. O completo enovelamento de MbWT envolve a ligação do grupo heme na His93, localizado na hélice F, e a coordenação deste cofator no núcleo das proteínas. Esta coordenação estabiliza as estruturas secundária e terciária com a participação da hélice F para dar forma à estrutura característica da Mb (Eliezer e Wright, 1996; Lecomte *et al.*, 1999). As formas holo das permutéínas foram similares em vários aspectos à forma holo de MbWT. As proteínas têm elipticidades molar similares, picos idênticos nos espectros de absorção entre os comprimentos de onda 250 e 650 nm e são compactas, como mostrado pelas experiências em gel filtração, mostrando que as permutéínas têm estruturas nativas similares à da proteína selvagem. Outra Mb circularmente permutada da hélice H da extremidade C-terminal para a N-terminal, que foi estudada por Fishburn *et al.* (2002), pode ligar o grupo heme e possui uma estrutura terciária similar à holoMbWT que foi avaliada por estudos de RMN bidimensional. A oxidação do grupo heme na mioglobina mostra pico máximo de absorção em torno de 409 nm, que é característico da ligação não covalente entre o grupo heme e as duas histidinas (93 e 64), como mostrado para a proteína selvagem (Antonini e Brunori, 1971) é também observada para as permutações.

As análises dos cromatogramas de gel filtração de Mb-C_GHAB e Mb-B_GHA foram feitas para nos dar maiores informações sobre a estrutura terciária

global destas proteínas em comparação com a MbWT. Nestes experimentos, a ApoMb-C_GHAB em pH 7,0 apresentou uma massa molecular pelo menos 3 vezes maior que a massa molecular predita pela sua seqüência primária, enquanto que a ApoMb-B_GHA não foi detectada no cromatograma. Esta não detecção pode ser um efeito de interação de ApoMb-B_GHA com a resina de gel filtração ou porque esta proteína forma agregados grandes o suficiente a ponto de impedir a entrada de uma determinada concentração de proteína que possa ser detectável na coluna de gel filtração. No caso de ApoMb-C_GHAB, o experimento sugere que esta proteína encontra-se associada de forma trimérica ou que possui uma tendência à formação de agregados inespecíficos, quando se encontra em concentrações mais elevadas de proteína e em pH neutro. Esta tendência à agregação já foi demonstrada para ApoMbWT de músculo de cavalo e de baleia em pH em torno de 7,0, quando estas proteínas se encontram em concentrações superiores a 0,2 mg/mL, sendo maior ainda quando a proteína está em pH 4 (Tcherkasskaya e Ptitsyn, 1999b; Jamin e Baldwin, 1998).

Grandori *et al.* (2000) sugeriu que a Mb se enovela por uma rota alternativa que é independente das hélices AGH, mas dependente do cofactor heme. Nossos resultados sugerem que essa hipótese pode ser verdadeira, pois o grupo heme enovela tanto os mutantes de deleção (enovelamento parcial) quanto as permutações, que aparentemente não possuem a região B-F bem estruturada. Contudo, mais experimentos serão necessários para verificar se esta afirmação é verdadeira para o enovelamento. Porém, é provável que a formação do intermediário AGH seja necessária para manter a proteína solúvel durante o enovelamento, pois os mutantes de deleção são muito instáveis e precipitam, e somente na presença das hélices AGH e que ocorre a correta coordenação do grupo heme. Chiba *et al.* (1994) sugerem, através de experimentos de cinética de enovelamento, que durante o enovelamento de apomioglobina na presença do grupo heme esta proteína forma um intermediário que poderia apresentar uma estrutura similar ao intermediário ácido (veja Introdução), que seria necessário para a ligação do grupo heme à proteína. Talvez esta seja a razão principal que leva as permutações circulares, que no estado nativo se assemelham ao intermediário ácido de ApoMbWT, a se enovelarem na presença do grupo heme

numa estrutura similar à proteína selvagem e os mutantes de deleção não. Apesar destas formas permutantes possuírem tantas características da proteína selvagem, esses tipos de globinas não foram ainda encontrados na natureza. Muito provavelmente este fato deve-se à baixa solubilidade e estabilidade das formas holo destas permutações. A permutação da hélice H, que foi feita por Fishburn *et al.* (2002), também é menos estável do que a proteína selvagem. Proteínas com baixa estabilidade e solubilidade podem precipitar nas células causando danos terríveis à mesma e levando a várias doenças (para uma revisão recente veja Dobson, 2003).

5.2.3. As permutações como modelo para o estudo do intermediário.

As formas apo das permutações, mesmo em pH 7, possuem características similares ao intermediário de ApoMbWT que é estabilizado em pH 4,2 (ver discussão acima). A caracterização espectroscópica por CD de ApoMb-C_GHAB e de ApoMb-B_GHA mostrou que estas permutações em pH 7 e em pH 4 apresentam estrutura secundária com um conteúdo aproximado de 50 % de α -hélice, semelhante à porcentagem observada para o intermediário (I) de ApoMbWT (55 %). O conteúdo de hélice de ApoMbWT aumenta em aproximadamente 30% quando a proteína passa do estado I para N, ou seja de pH 4 para pH 7.

Em geral, a emissão de fluorescência intrínseca de uma proteína é dominada pela contribuição dos resíduos de triptofano e esta propriedade tem sido largamente empregada para detectar mudanças conformacionais em globinas submetidas às variações de pH do meio (Kirby e Steiner, 1970). A apomioglobina contém dois resíduos de triptofano, W7 e W14 localizadas na hélice A. O conjunto de dados que foi obtido com os experimentos de fluorescência estática mostrou que as permutações em pH 7,0 e em pH 4 apresentam estruturas no microambiente do triptofano muito semelhante ao do ambiente dos Trps de ApoMbWT em pH 4 (estado intermediário).

As análises dos espectros de emissão de fluorescência estática e de dicroísmo circular apresentadas deram uma informação média do estado conformacional que cada proteína assume em solução. Contudo, na maioria das

vezes, se faz necessário a obtenção de informações mais detalhadas sobre as espécies conformacionais existentes neste ambiente. Estas informações podem ser obtidas através da análise do tempo de vida de fluorescência. Os dados de tempo de vida de fluorescência de ApoMbWT que foram obtidos por nós estão bem próximos aos descritos na literatura (Tcherkasskaya *et al.*, 2000a). As permutações em pH 7 e 4 apresentam valores de tempo de vida de fluorescência semelhantes aos obtidos para ApoMbWT em pH 4. Esta observação é verdadeira para todos os termos das componentes do tempo de vida (τ_i e f_i , sendo i o número da componente). Estes dados são mais um indício sobre as semelhanças estruturais entre as permutações no estado nativo e o estado intermediário de ApoMbWT. Embora, as permutações tenham mostrado diferenças significativas nas intensidades de fluorescência entre os pHs 7 e 4 é importante considerar que o tempo de vida e $\lambda_{\text{máx}}$ de fluorescência são semelhantes. Estas últimas observações nos sugerem que as espécies que estão presentes nas permutações em pH 7 e em pH 4 são muito semelhantes, mas que possivelmente possuem um rearranjo no microambiente do triptofano.

Em conjunto, estes dados mostraram que as apopermuteínas podem ser bons modelos do intermediário de mioglobina (Veja modelos de estruturação propostos para estas permutações, Fig. 18). Como as permutações diferem na posição da hélice B e o envolvimento da mesma no intermediário não foi ainda completamente compreendido, resolvemos estudar a estabilidade destas proteínas para tentar ganhar mais conhecimento sobre esta questão.

5.2.4. O desenovelamento em meio ácido.

O perfil de desenovelamento em meio ácido de ApoMbWT que foi monitorado por dicroísmo circular (região do UV distante) diferencia-se muito do observado para os mutantes de permutação. No pH fisiológico, ApoMb-C_GHAB e ApoMb-B_GHA apresentam uma $[\theta]_{222}$ de -12.400 e -11.000 $\text{deg.cm}^2\text{.dmol}^{-1}$, respectivamente, que não se altera significativamente com a redução do pH para 4. A redução de $[\theta]_{222}$ torna-se significativa apenas em pHs menores (pH 2,4), mas que ainda são condições em que ApoMb-C_GHAB apresenta altos valores de $[\theta]_{222}$ (-10.000 $\text{deg.cm}^2\text{.dmol}^{-1}$) e de f_H (40%) e que são bem superiores aos

aproximados $-6.000 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ e $f_H = 25 \%$ encontradas para mioglobina selvagem em pH 2 (Barrick and Baldwin, 1993a) e ApoMb-B_GHA em pH 2,4. A estrutura secundária de ApoMb-C_GHAB é totalmente perdida com a adição de Gnd-Cl 6 M em pH 6,5. O perfil de desenovelamento em meio ácido de ApoMbWT monitorado por CD mostra uma perda progressiva da $[\theta]_{222}$ do estado nativo (pH7) para o estado intermediário (pH 4), onde ocorre uma estabilização em torno deste pH (Barrick e Baldwin, 1993a). Após este ponto ocorre uma nova transição do estado intermediário (pH 4) para o estado desenovelado (pH 2) com perda progressiva de $[\theta]_{222}$ (Barrick e Baldwin, 1993a). Este comportamento de desenovelamento em três estados foi examinado por vários estudos experimentais e teóricos (Hughson *et al.*, 1990, Loh *et al.*, 1995, Jamin *et al.*, 1999, Jamin *et al.*, 2001 e referências contidas nestes artigos). Estes estudos têm sugerido que a transição entre os estados nativo (pH 7) e intermediário (pH 4) é causada em grande parte pela protonação das histidinas que estão empacotadas no interior da estrutura de ApoMbWT e estão formando ligações de hidrogênio entre si e que possuem um alterado valor de pKa (Geierstanger *et al.*, 1998, Jamin *et al.*, 2001). Já a descrição do desenovelamento em meio ácido do estado intermediário para o desenovelado ainda é pouco entendida (Kay e Baldwin, 1998). No entanto, este desenovelamento pode ocorrer por um efeito de repulsão de cargas e possivelmente é mais estabilizada pelas interações hidrofóbicas (Kay e Baldwin, 1998; Jamin *et al.*, 1999, Kay *et al.*, 1999 e Ramos *et al.*, 1999).

O desenovelamento em meio ácido de ApoMbWT no estado nativo (N - pH 6-7) para estado intermediário (I - pH 4) mostra que a proteína apresenta um aumento na intensidade de emissão de fluorescência e deslocamento do $\lambda_{\text{máx}}$ de emissão de fluorescência para o vermelho de aproximadamente 5 nm (Irace *et al.*, 1981 e Sirangelo *et al.*, 2000). A partir de pH 4 (I) para pH 2 (estado desenovelado-D), a intensidade de emissão de fluorescência diminui e ocorre um novo deslocamento do $\lambda_{\text{máx}}$ de emissão de ~ 5 nm para o vermelho (Irace *et al.*, 1981; Kirby e Steiner, 1970 e Sirangelo *et al.*, 2000). ApoMb-C_GHAB e ApoMb-B_GHA apresentam valores semelhantes de $\lambda_{\text{máx}}$ de emissão de fluorescência em pH 7 e 4, mas com uma intensidade de emissão de fluorescência em pH 7 maior do que

em pH 4. Este $\lambda_{\text{máx}}$ de emissão é semelhante ao apresentado por ApoMbWT em pH 4, mas com intensidade menor. Isto sugere que o ambiente dos resíduos de triptofano destas permutéínas é semelhante ao de ApoMbWT no estado intermediário (modelo proposto na Fig. 18). Especulamos que as diferenças entre as intensidades de emissão de fluorescência possam estar num suposto aumento do nível de empacotamento das hélices GHAB de ApoMb-C_GHAB, o que possivelmente promoveria a aproximação de resíduos de aminoácidos carregados mudando o microambiente dos triptofanos em relação à proteína selvagem (Fig. 18). Por exemplo, a aproximação das hélices B e A pode causar uma supressão de fluorescência por transferência de carga como ocorre em ApoMbWT em pH 6 (Irace *et al.*, 1981; Postnikova *et al.*, 1991; Sirangelo *et al.*, 2000; Tcherkasskaya e Ptitsyn., 1999a; Tcherkasskaya *et al.*, 2000b). Entre os pHs 4 e 2, as permutéínas apresentam um aumento na intensidade da emissão de fluorescência com concomitante deslocamento de $\lambda_{\text{máx}}$ para o vermelho. Este processo pode estar associado a uma maior flexibilidade (desestruturação) do microambiente em torno dos triptofanos. Este efeito pode ter promovido o afastamento de resíduos de lisina ou histidina nestas condições extremas de pH, revertendo o processo de supressão de fluorescência causado por estes resíduos que estavam carregados nas permutéínas em pH 4.

O perfil de enovelamento da ApoMbWT monitorado pela emissão de fluorescência é conhecido por passar por pelo menos dois intermediários (I_a e I_b) que podem ser detectados em experimentos de cinética e de equilíbrio (Jamin e Baldwin, 1998 e Jamin *et al.*, 1999). Esta técnica foi utilizada para monitorar as mudanças conformacionais das permutéínas em relação à ApoMbWT em função do desenovelamento em meio ácido em equilíbrio. A acidificação das amostras de permutéínas de pH 7 para 5 mostra um decréscimo na intensidade de fluorescência na ordem de 50 a 60% sem que haja deslocamento de pico máximo de emissão de fluorescência ou centro de massa espectral. Um das explicações para este comportamento poderia estar num rearranjo gradativo das estruturas das permutéínas, que ocorreria nesta faixa de pH. A variação de pH 7 para 5 poderia provocar a protonação de histidinas, que estando próximas aos resíduos de triptofano, funcionariam como resíduos aceptores de cargas oriundas do

triptofano no estado excitado (doador). Este processo promoveria uma supressão na emissão de fluorescência por transferência de carga (Lakovicz, 1983). A lisina seria outro resíduo carregado que é conhecido como potencial supressor da fluorescência do triptofanos (Chen e Barkley, 1998). Este tipo de supressão de fluorescência tem sido observado em ApoMbWT que possui uma intensidade de fluorescência do estado nativo (pH 7) menor do que a intensidade de fluorescência apresentada pelo estado intermediário em pH 4 (Irace *et al.*, 1981; Postnikova *et al.*, 1991; Sirangelo *et al.*, 2000; Tcherkasskaya e Ptitsyn, 1999a; Tcherkasskaya *et al.*, 2000a; Tcherkasskaya *et al.*, 2000b). Uma outra explicação para a redução na intensidade de fluorescência entre os pHs 7 e 5 pode estar associada a maior tendência à agregação das permutéinas em relação à ApoMbWT. Recentemente, alguns trabalhos têm mostrado que ApoMbWT de músculo de cavalo tem uma tendência à agregação quando se trabalha em concentrações superiores a 0,2 mg/mL (Tcherkasskaya e Ptitsyn, 1999b; Tcherkasskaya *et al.*, 2000a; Tcherkasskaya *et al.*, 2000b). Esta proteína demonstra um perfil de desnovelamento em meio ácido que depende da concentração de proteína empregada (Tcherkasskaya *et al.*, 2000b). Esta diferença é notória entre os pHs 8,5 e 6, quando se trabalha com 10 μ M (~0,2 mg/mL) de proteína, onde ocorre um decréscimo na intensidade de fluorescência à medida que os valores de pH diminuem. A redução da concentração de proteína pela metade já é suficiente para eliminar este evento (Tcherkasskaya *et al.*, 2000b). O grupo de Gaetano Irace mostra que a ApoMbWT de espermacete também apresenta esse mesmo comportamento de redução na intensidade de fluorescência entre os pHs 8 e 5,5. Neste trabalho, o grupo não faz nenhuma menção de este fato estar ligado à agregação e acaba fornecendo uma explicação baseada na possibilidade de efeito de supressão de fluorescência por aproximação de resíduos de aminoácidos carregados (Sirangelo *et al.*, 2000). Contudo, as medidas de fluorescência neste trabalho foram realizadas com concentrações de proteína na ordem de 13 a 21 μ M e que podem estar sujeitas à agregação. Nos estudos conduzidos por nós e pelo grupo de Baldwin (Jamin e Baldwin, 1996) a concentração de ApoMbWT utilizada está na ordem de 1 e 2 μ M e nesta condição não é observada esta mudança de intensidades entre os pHs 7 e 5, embora seja observada para as permutéinas.

Do ponto de vista da estrutura secundária de ApoMb-C_GHAB, a resistência ao desenovelamento em meio ácido monitorada por CD ainda não está clara, mas pode estar associada à criação de dois domínios distintos, onde um seria formado pelas hélices CDEF e outro pelas hélices GHAB. O domínio GHAB possui maior quantidade de resíduos hidrofóbicos em relação ao CDEF e, dependendo da protonação das histidinas, uma carga líquida menor em pH 7. Possivelmente, a modificação espacial promovida pela permutação (as hélices que estão envolvidas na formação dos intermediários -A[B]GH- de mioglobina selvagem estão próximas na seqüência primária – Fig. 6) favoreceu o colapso hidrofóbico de GHAB com um empacotamento maior que o observado para o mesmo domínio de ApoMbWT em pH 4. Este fato pode ter dificultado o acesso do solvente até o interior da proteína e/ou alterado o valor de pKa dos resíduos carregados e que podem estar envolvidos nas interações intra-hélices. Este tipo de alteração aberrante dos valores de pKa foi descrita principalmente para as histidinas 24 (Geierstanger *et al.*, 1998) e 64 de mioglobina selvagem (Garcia *et al.*, 2000 e referências contidas neste artigo). As histidinas H24 (hélice B) e H119 (entre as hélices GH) formam uma ligação de hidrogênio na apomioglobina nativa e seu rompimento parece levar à formação do intermediário (Geierstanger *et al.*, 1998). No caso da ApoMb-C_GHAB, estes resíduos de histidina se encontram juntos no domínio GHAB, ao passo que em ApoMb-B_GHA não. Além disto, há mais histidinas no domínio CDEF ou BCDEF do que em GHAB ou GHA, o que pode torná-los bem mais carregados positivamente em pH 7. O pequeno número de resíduos hidrofóbicos associados à alta carga positiva pode explicar porque as seqüências CDEF ou BCDEF podem estar desestruturadas (Fig. 18). O domínio formado pelas hélices CDEF encontra-se desestruturado no intermediário de MbWT (pH4) e seus respectivos peptídeos isolados possuem baixa estruturação, enquanto os peptídeos isolados referentes às hélices B, G, H e segmento GH apresentam maior quantidade de estrutura, ao que o peptídeo referente à hélice A é insolúvel (Waltho *et al.*, 1993; Reymond *et al.* 1997). Estas considerações levam à conclusão que a função das hélices ABGH seria melhor desempenhada quando estão corretamente distribuídas nas extremidades N- e C-terminais de forma a

favorecer um colapso hidrofóbico que possibilitaria a aproximação das hélices menos hidrofóbicas (CDF) [Fig. 18].

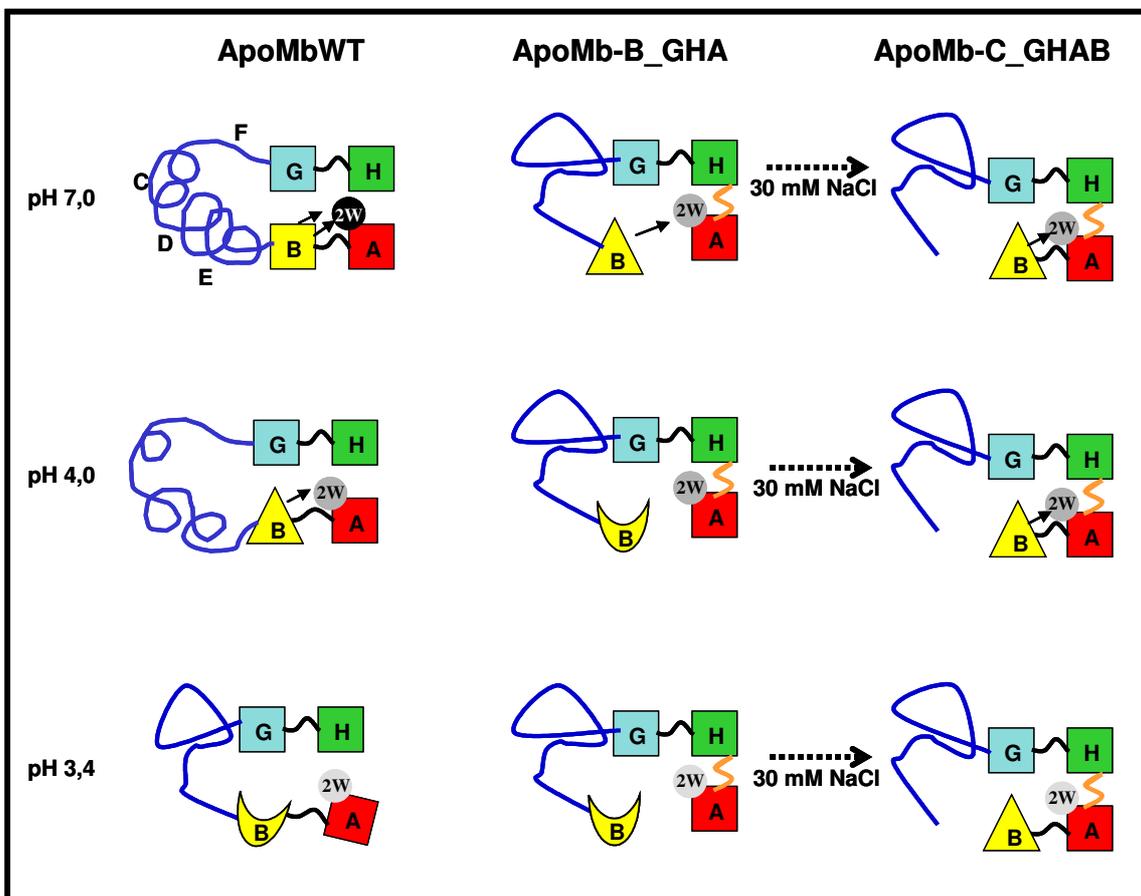


Figura 18- Modelo proposto de estruturação dos mutantes de permutação circular de apomioglobina em diversos pHs, com especial referência à participação da hélice B (amarela) no intermediário. O modelo de estrutura de ApoMbWT foi baseado nas informações que estão contidas na literatura sobre esta proteína (veja Introdução), sendo que os pHs 7,0; 4,0 e 3,4 são as condições onde o estado nativo e as formas I_b e I_a estão mais populadas, respectivamente. Este modelo associado aos dados experimentais para as permutações circulares (ApoMb-B_GHA e ApoMb-C_GHAB), que estão contidos nesta tese e que foram obtidos a partir dos espectros de CD, de emissão de fluorescência dos triptofanos e do tempo de vida de fluorescência dos triptofanos (Tabela 3 e 4 para ver uma síntese destes dados), serviram de referência para a proposição da estruturação destas proteínas mutantes. As hélices de mioglobina A, B, G e H estão representadas pelas cores vermelha, amarela, ciano e verde, respectivamente. As

demais hélices (C, D, E e F) estão marcadas pela cor azul escura. Os quadrados indicam um alto grau de estruturação do tipo α -hélice, os triângulos indicam uma estrutura parcialmente desenovelada, as meia-luas indicam uma estrutura desenovelada e os círculos representam os dois triptofanos (2W) que estão localizados na hélice A. O grau de exposição destes triptofanos varia de acordo com um gradiente de cor, onde a cor preta significa triptofanos menos exposto, o cinza escuro triptofanos parcialmente exposto e o cinza claro triptofanos mais exposto ainda, mas não totalmente. As setas que partem da hélice B (amarela) em direção à hélice A, onde os dois triptofanos (2W) estão localizados, indicam a interação entre estas hélices. As setas pontilhadas entre os modelos de estruturas de ApoMb-B_GHA e ApoMb-C_GHAB indicam o efeito da adição de sal (30 mM NaCl) na estruturação de ApoMb-B_GHA, que provavelmente após este tratamento assume uma estrutura próxima à da ApoMb-C_GHAB. A provável estrutura randômica que é formada por uma seqüência de quatro pares de serinas e glicinas, que está unindo as hélices A e H nas permutações, estão representadas pela cor laranja. Convém lembrar que a ligação do grupo heme enovela todas as formas apresentadas em pH 7,0.

5.2.5. O desenovelamento induzido por uréia.

Durante o desenovelamento de ApoMbWT induzido por uréia, em tampão acetato de sódio pH 4 contendo 30 mM NaCl, monitorado por emissão de fluorescência nota-se um aumento no sinal entre 0 e 0,6 M uréia (Luo *et al.*, 1997). Em tampão citrato de sódio pH 4 contendo 30 mM NaCl (Jamin e Baldwin, 1998), este aumento de emissão de fluorescência é observado entre 0 e 1 M de uréia. Segundo Jamin e Baldwin (1998), este aumento de intensidade de emissão de fluorescência se deve ao desenovelamento do I_b passando para a forma I_a (ver Introdução) que é invisível ao CD_{222} . Na presença de 30 mM NaCl, o intermediário é mais estável. ApoMb-C_GHAB em pH 4,0 apresenta um aumento de sinal de emissão de fluorescência entre 0 e 1,5 M uréia, enquanto ApoMb-B_GHA não apresenta este aumento de sinal de emissão de fluorescência mas apresenta aumento de elipticidade molar na presença de 30 mM de NaCl. A partir destes resultados, propomos que ApoMb-C_GHAB seria similar ao I_b , onde o

intermediário seria composto por ABGH, enquanto ApoMb-B_GHA seria similar ao I_a , onde o intermediário seria composto por AGH (Fig. 18).

Evidências de que I_b seja formado pela estruturação da hélice B vem de experimentos de mutagênese sítio-dirigida onde 2 glicinas da hélice B foram trocadas por alaninas (um aminoácido que favorece a formação de α -hélice) (Kiefhaber e Baldwin, 1995). Essas mutações aumentaram tanto a propensão à formação de α -hélice em um peptídeo referente à hélice B quanto a estabilidade do intermediário em pH 4. Quanto à estabilidade destas permutéinas em pH 4,0, a ApoMb-C_GHAB na ausência de sal se apresentou aproximadamente 1,5 vezes mais estável que ApoMbWT na presença de 30 mM NaCl, condição em que a estabilidade de ApoMbWT em pH 4,0 é aumentada em relação à ausência de sal. A ordem de estabilidade crescente para as proteínas analisadas aqui foi a seguinte: ApoMb-C_GHAB, ApoMb-B_GHA e ApoMbWT. Isto sugere que as permutações das hélices A e AB promovem estabilização das espécies intermediárias I_a e I_b , respectivamente, de forma a desfavorecer a formação de um estado nativo similar ao apresentado pela ApoMbWT em pH 7,0 (Fig. 18). Contudo, estas barreiras energéticas, que foram criadas entre estas estruturas intermediárias (parcialmente enovelada) e a nativa (totalmente enovelada), são vencidas com a ligação do grupo heme.

5.2.6. Modelo para o enovelamento de apomioglobina.

Nossos resultados confirmam o modelo de enovelamento sequencial para a apomioglobina. O primeiro intermediário seria formado pelas hélices A, G e H como mostrado em experimentos de troca de deutério e cinética rápida (Hughson *et al.*, 1990; Jennings e Wright, 1993). Em seguida, ocorreria a estruturação da hélice B formando o intermediário ABGH como proposto por experimentos de cinética rápida (Jamin e Baldwin, 1998).

6. CONCLUSÕES.

1-Foi apresentado um novo método para a purificação de mioglobina sem o grupo heme, apomioglobina. Este método tem a vantagem de ser mais econômico e é eficaz para mutantes que não ligam esse grupo;

2-Foi apresentada uma solução para o problema de perda de estrutura aparente para alguns mutantes de mioglobina. Este problema acometia os pesquisadores na área de enovelamento de apomioglobina desde o início da década de 90;

3-Mutantes de deleção de hélices de apomioglobina são pouco estáveis e não ligam o grupo heme total ou corretamente;

4-Mutantes de permutação de hélices apresentam conformação e ligação características da proteína selvagem. Contudo, são menos estáveis e pode explicar o porquê deste arranjo não ser encontrado entre as globinas conhecidas;

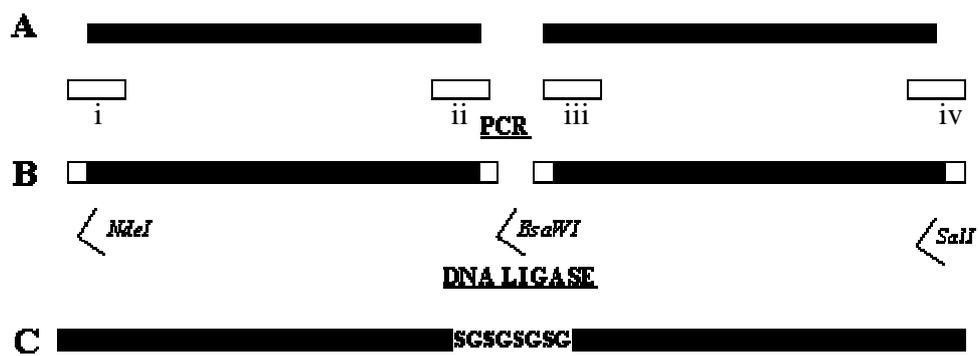
5-Os mutantes de permutação permitiram entender um pouco melhor a estrutura e a formação dos intermediários na via de enovelamento de apomioglobina, reforçando a hipótese de enovelamento sequencial do tipo D-I_a-I_b-N.

7. APÊNDICE.

7.1. Construção do vetor pT7-7a-2Mb.

A figura 19 mostra uma descrição esquemática para a construção do cDNA2Mb, que foi clonado no vetor pT7-7a, para o desenho de permutações. Várias reações de PCR foram empregadas. A primeira reação de PCR (Fig. 19 A) usou o oligo 5' original para o cDNA de mioglobina de espermacete clonado em pT7-7a-Mb (5'AGGAGAACAACACATATGGTTCTGTCTGAA3') [oligo i] com o oligo 3' (5'ACCAGAACCGGAGCCAGATCCGCTACCCTG3') [oligo ii] que removeu o códon de parada, adicionou os códons para uma sequência SGSGS e para o sítio de restrição de *Bsa*WI. A segunda reação de PCR (Fig. 19 A) utilizou o oligo (5'TCTGGCTCCGGTTCTGGTATGGTTCTG3') [oligo iii], que adicionou o sítio de restrição de *Bsa*WI e os códons para GSG seguido do primeiro resíduo em mioglobina, Met, em conjunto com o oligo 3' original para o cDNA de mioglobina de espermacete (5'TGCAGGTCGACCCCCCGG3') [oligo iv]. O produto de PCR foi parcialmente digerido com *Bsa*WI e ligado por DNA ligase (Figura 19 B). A ligação produziu dois cDNAs de mioglobina clonados em série em posição para transcrição e para tradução correta, ligados por uma sequência de nucleotídeos que codifica 8 resíduos de serinas e glicinas (SGSGSGSG) [Fig. 19 C]. Este cDNA foi amplificado por uma terceira reação de PCR com os oligos originais para o cDNA de mioglobina (ver acima), sendo o produto digerido com *Nde*I and *Sa*II e clonado em vetor pT7-7 (Amersham Life Sciences), criando o vetor pT7-7a-2Mb.

Figura 19- Construção do cDNA2Mb



8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Anfinsen, C. B. (1973) Principles that govern the folding of the protein chains. *Science* **181**: 223-230.
- Antonini, E. and Brunori, M. (1971) Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands. North Holland Publishers Co., Amsterdam. p. 1-12.
- Baldwin, R. L. (1989) How does protein get started? *Trends Biochem. Sci.* **14**: 291-294.
- Baldwin, R. L. and Rose, G. D. (1999a) Is protein folding hierarchic? I. Local structure and peptide folding. *Trends Biochem. Sci.* **24**: 26-33.
- Baldwin, R. L. and Rose, G. D. (1999b) Is protein folding hierarchic? II. Folding intermediates and transition states. *Trends Biochem. Sci.* **24**: 77-83. Erratum in: *Trends Biochem. Sci.* **24**: 185.
- Barrick, D. and Baldwin, R. L. (1993a) Three-state analysis of sperm whale apomyoglobin folding. *Biochemistry* **32**: 3790-3796.
- Barrick, D. and Baldwin, R. L. (1993b) Stein and Moore Award address. The molten globule intermediate of apomyoglobin and the process of protein folding. *Protein Sci.* **2**: 869-876.
- Breslow, E., Beychok, S., Hardman, K. D. and Gurd, F. R. N (1965) Relative conformations of sperm whale metmyoglobin and apomyoglobin in solution. *J. Biol. Chem.* **240**: 304-309.
- Brunori, M. (2000) Structural dynamics of myoglobin. *Biophys.Chem.* **86**: 221-230.
- Bryngelson, J. D. and Wolynes, P. G. (1987) Spin glasses and the statistical mechanics of protein folding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 7524-7528.
- Bryngelson, J. D., Onuchic, J. N., Socci, N. D. and Wolynes, P. G. (1995) Funnels, pathways, and the energy landscape of protein folding: a synthesis. *Proteins* **21**: 167-195.
- Bunn, H. F. and Jandl, J. H. (1968) Exchange of heme among hemoglobins and between hemoglobin and albumin. *J. Biol. Chem.* **243**: 465-475.
- Chen, Y. and Barkley, M. D. (1998) Toward understanding tryptophan fluorescence in proteins. *Biochemistry.* **37**: 9976-9982.

- Chen, Y. H., Yang, J. T. and Chau, K. H. (1974) Determination of the helix and b-form of proteins in aqueous solution by circular dichroism. *Biochemistry* **13**: 3350-3359.
- Chiba, K., Ikai, A., Kawamura-Konishi, Y. and Kihara, H. (1994) Kinetics study on myoglobin refolding monitored by five optical probe stopped-flow methods. *Proteins* **19**: 110-119.
- Chotia, C. (1984) Principles that determine the structure of proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **53**: 537-572.
- Chow, C. C., Chow, C., Raghunathan, V., Huppert, T. J., Kimball, E. B. and Cavagnero, S. (2003) Chain length dependence of apomyoglobin folding: structural evolution from misfolded sheets to native helices. *Biochemistry* **42**: 7090-7099.
- Cocco, M. J. and Lecomte, J. T. (1994) The native state of apomyoglobin described by proton NMR spectroscopy: interaction with the paramagnetic probe HyTEMPO and the fluorescent dye ANS. *Protein Sci.* **3**: 267-281.
- Craik, S. C., Buchman, S. R. and Beychok, S. (1980) Characterization of globin domains: Heme binding to the central exon product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 1384-1388.
- Daggett, V. and Fersht, A. R. (2003) Is there a unifying mechanism for protein folding? *Trends Biochem. Sci.* **28**:18-25.
- De Prat Gay, G., Ruiz-Sanz, J., Neira, J. L., Corrales, F. J., Otzen, D. E., Ladurner A. G. and Fersht, A. R. (1995) Conformational pathway of the polypeptide chain of chymotrypsin inhibitor-2 growing from its N terminus in vitro. Parallels with the protein folding pathway. *J. Mol. Biol.* **254**: 968-979.
- De Sanctis, G., Ascoli, F. and Brunori, M. (1994) Folding of apominimyoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 11507-11511.
- De Sanctis, G., Falcioni, G., Giardina, B., Ascoli, F. and Brunori, M. (1986) Mini-myoglobin: Preparation and reaction with oxygen and carbon monoxide. *J. Mol. Biol.* **188**: 73-76.
- De Sanctis, G., Falcioni, G., Giardina, B., Ascoli, F. and Brunori, M. (1988). Mini-myoglobin the structural significance of haem-ligand interactions. *J. Mol. Biol.* **200**: 725-733.

- Dill, K. A. and Chan, H. S. (1997) From Levinthal to pathways to funnels. *Nat. Struct. Biol.* **4**:10-19.
- Dinner, A. R., Sali, A., Smith, L. J., Dobson, C. M. and Karplus, M. (2000) Understanding protein folding via free-energy surfaces from theory and experiment. *Trends Biochem. Sci.* **25**: 331-339.
- Dobson, C. M. (2003) Protein folding and misfolding. *Nature* **426**: 884-890.
- Eaton, W. A. and Hofrichter, J. (1981) Polarized absorption and linear dichroism spectroscopy of hemoglobin. *Methods Enzymol.* **76**: 175-261.
- Eliezer, D. and Wright, P. E. (1996) Is apomyoglobin a molten globule? Structural characterization by NMR. *J. Mol. Biol.* **263**: 531-538.
- Eliezer, D., Jennings, P. A., Wright, P. E., Doniach, S., Hodgson, K. O. and Tsuruta, H. (1995) The radius of gyration of an apomyoglobin folding intermediate. *Science* **270**: 487-488.
- Eliezer, D., Yao, J. Dyson, H. J. and Wright, P. E. (1998) Structural and dynamic characterization of partially folded states of apomyoglobin and implications for protein folding. *Nat. Struct. Biol.* **5**: 148-155.
- Ferguson, N. and Fersht, A. R. (2003) Early events in protein folding. *Curr. Opin. Struc. Biol.* **13**: 75-81.
- Fersht, A. R. (1995) Optimization of rates of protein folding: the nucleation-condensation mechanism and its implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 10869-10873.
- Fersht, A. R. (1997) Nucleation mechanisms in protein folding. *Curr. Opin. Struc. Biol.* **7**: 3-9.
- Fishburn, A. L., Keeffe, J. R., Lissounov, A. V., Peyton, D. H. and Anthony-Cahill, S. (2002) A circularly permuted myoglobin possesses a folded structure and ligand binding similar to those of the wild-type protein but with a reduced thermodynamic stability. *Biochemistry* **41**: 13318-13327.
- Garcia, C., Nishimura, C., Cavagnero, S., Dyson, H. J. and Wright, P. E. (2000) Changes in the apomyoglobin folding pathway caused by mutation of the distal histidine residue. *Biochemistry* **39**: 11227-11237.

- Geierstanger, B., Jamin, M., Volkman, B. F. and Baldwin, R. L. (1998) Protonation behavior of histidine 24 and histidine 119 in forming the pH 4 folding intermediate of apomyoglobin. *Biochemistry* **37**: 4254-4265.
- Goldenberg, D. P. and Creighton, T. E. (1983) Circular and circularly permuted forms of bovine pancreatic trypsin inhibitor. *J. Mol. Biol.* **165**: 407-413.
- Goto, Y., Takahashi, N. and Fink, A. L. (1990) Mechanism of acid-induced folding of proteins. *Biochemistry* **29**: 3480-3488.
- Grandori, R., Schwarzinger, S. and Müller, N. (2000) Cloning, overexpression and characterization of micro – myoglobin, a minimal heme-binding fragment. *Eur. J. Biochem.* **267**: 1168–1172.
- Greenfield, N. J. (1996). Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data. *Anal. Biochem.* **235**: 1-10.
- Griko, Y. V., Privalov, P. L., Venyaminov, S. Y. and Kutysenko, V. P. (1988) Thermodynamic of the apomyoglobin structure. *J. Mol. Biol.* **202**: 127-138.
- Hargrove, M. S., Barrick, D. and Olson, J. S. (1996a) The association rate constant for heme binding do globin is independent of protein structure. *Biochemistry* **35**: 11293–11299.
- Hargrove, M. S., Wilkinson, A. J. and Olson, J. S. (1996b). Structural factors governing heme dissociation from metmyoglobin. *Biochemistry* **35**: 11300–11309.
- Hargrove, M.S. and Olson, J. S. (1996) The stability of holomyoglobin is determined by heme affinity. *Biochemistry* **35**: 11310-11318.
- Harrison, S. C. and Durbin, R. (1985) Is there a single pathway for the folding of a polypeptide chain? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 4028-4030.
- Heinemann, U. and Hahn, M. (1995) Circular permutation of polypeptide chains: implications for protein folding and stability. *Prog. Biophys. Mol. Bio.* **64**: 121-143.
- Hughson, F. M, Wright, P. E. and Baldwin, R. L. (1990) Structural characterization of partly folded apomyoglobin intermediate. *Science* **249**: 1544-1548.
- Irace, G., Balestrieri, C., Parlato, G., Servillo, L. and Colonna, G. (1981) Tryptophanyl fluorescence heterogeneity of apomyoglobins. Correlation with the presence of two distinct structural domains. *Biochemistry* **20**: 792-799.

- Itzhaki, L. S., Otzen, D. E. and Fersht, A. R. (1995) The structure of the transition state for folding of chymotrypsin inhibitor 2 analysed by protein engineering methods: evidence for a nucleation-condensation mechanism for protein folding. *J. Mol. Biol.* **254**: 260-288.
- Iwakura, M., Nakamura, T., Yamane, C. and Maki, K. (2000) Systematic circular permutation of an entire protein reveals essential folding elements. *Nat. Struct. Biol.* **7**: 580-585.
- Jaenicke, R. (1999) Stability and folding of domain proteins. *Prog. Biophys. Mol. Bio.* **71**: 155-241.
- Jamin, M. and Baldwin, R. L. (1996) Refolding and unfolding kinetics of the equilibrium folding intermediate of apomyoglobin. *Nat. Struct. Biol.* **3**: 613-618.
- Jamin, M. and Baldwin, R.L. (1998) Two forms of the pH 4 folding intermediate of apomyoglobin. *J. Mol. Biol.* **276**: 491-504.
- Jamin, M., Yeh, S. R., Rousseau, D. L. and Baldwin, R. L. (1999) Submillisecond unfolding kinetics of apomyoglobin and its pH 4 intermediate. *J. Mol. Biol.* **292**:731-740.
- Jamin, M., Geierstanger, B. and Baldwin, R. L. (2001) The pKa of His-24 in the folding transition state of apomyoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 6127-6131.
- Jennings, P. A. and Wright, P. E. (1993) Formation of a molten globule intermediate early in the kinetic folding pathway of apomyoglobin. *Science* **262**: 892-896.
- Johnson, C. M. and Fersht, A. R. (1995) Protein stability as a function of denaturant concentration: the thermal stability of barnase in the presence of urea. *Biochemistry* **34**: 6795-6804.
- Karplus, M. and Weaver, D. L. (1976) Protein-folding dynamics. *Nature* **260**: 404-406.
- Kauzmann, W. (1959) Some factors in the interpretation of protein denaturation. *Adv. Protein Chem.* **14**: 1-63.
- Kay, M. S. and Baldwin, R. L. (1996) Packing interactions in the apomyoglobin folding intermediate. *Nat. Struct. Biol.* **3**: 439-445.

- Kay, M. S. and Baldwin, R. L. (1998) Alternative models for describing the acid unfolding of the apomyoglobin folding intermediate. *Biochemistry* **37**: 7859-7868.
- Kay, M. S., Ramos, C. H. I. and Baldwin, R. L. (1999) Specificity of native-like interhelical hydrophobic contacts in the apomyoglobin intermediate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 2007-2012.
- Kelly, S. M. and Price, N. C. (1997) The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding. *Biochim. Biophys. Acta* **1338**: 161-185.
- Kendrew, J. C. (1962) Side-chain interactions in myoglobin. *Brookhaven Sym. Biol.* **15**: 216-228.
- Konkel, D. A., Tilghman, S. M. and Leder, P. (1978) The sequence of the chromosomal mouse β -globin major genes: Homologies in capping, splicing and poly(A) sites. *Cell* **15**: 1125-1132.
- Konkel, D. A., Maizel-Jr, J. V. and Leder, P. (1979) The evolution and sequence comparison of two recently diverged mouse chromosomal β -Globin genes. *Cell* **18**: 865-873.
- Kiefhaber, T. and Baldwin, R. L. (1995) Intrinsic stability of individual α -helices modulates structure and stability of the apomyoglobin molten globule form. *J. Mol. Biol.* **252**: 122-132.
- Kim, P. S. and Baldwin, R. L. (1982) Specific intermediates in the folding reactions of small proteins and the mechanism of protein folding. *Annu. Rev. Biochem.* **51**: 459-489.
- Kim, P. S. and Baldwin, R. L. (1990) Intermediates in the folding reactions of small proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **59**: 631-660.
- Kirby, E. P. and Steiner, R. F. (1970) The tryptophan microenvironments in apomyoglobin. *J. Biol. Chem.* **245**: 6300-6306.
- Kuwajima, K. (1989) The molten globule state as a clue for understanding the folding and cooperativity of globular-protein structure. *Proteins* **6**: 87-103.
- Lakowicz, J. R. (1999). *In: Principles of fluorescence spectroscopy*. 2nd Ed. Plenum Press, New York.

- Lecomte, J. T., Sukits, S. F., Bhattacharya, S. and Falzone, C. J. (1999) Conformational properties of native sperm whale apomyoglobin in solution. *Protein Sci.* **8**: 1484-1491.
- Levinthal, C. (1968) Are there pathways for protein folding? *J. Chim. Phys. Chim. Biol.* **65**: 44-45.
- Levinthal, C. (1969) How to fold gracefully? In: *Proceedings of Mössbauer Spectroscopy in Biological Systems Meeting*. p. 22-24
- Levitt, M. and Chothia, C. (1976) Structural patterns in globular proteins. *Nature* **261**: 552-558.
- Loh, S. N., Kay, M. S. and Baldwin, R. L. (1995) Structure and stability of second molten globule state intermediate in the apomyoglobin folding pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 5446-5450.
- Luger, K., Hommel, U., Herold, M., Hofsteenge, J. and Kirschner, K. (1989) Correct folding of circularly permuted variants of a beta alpha barrel enzyme in vivo. *Science* **243**: 206-210.
- Luo Y., Kay, M. S. and Baldwin, R. L. (1997) Cooperativity of folding of the apomyoglobin pH 4 intermediate studied by glycine and proline mutations. *Nat. Struct. Biol.* **11**: 925-930.
- Luo, Y. and Baldwin, R. L. (2001) How Ala-->Gly mutations in different helices affect the stability of the apomyoglobin molten globule. *Biochemistry* **40**: 5283-5289.
- Manavalan, P. and Johnson-Jr, W. C. (1987) Variable selection method improves the prediction of protein secondary structure from CD. *Anal. Biochem.* **167**: 76-85.
- Matthews, C. R. (1993) Pathways of protein folding. *Annu. Rev. Biochem.* **62**: 653-683.
- Nishii, I., Kataoka, M., Tokunaga, F. and Goto, Y. (1994). Cold denaturation of the molten globule states of apomyoglobin and a profile for protein folding. *Biochemistry* **33**: 4903-4909.
- Nishimura, C., Dyson, H. J. and Wright, P. E. (2002) The apomyoglobin folding pathway revisited: structural heterogeneity in the kinetic burst phase intermediate. *J. Mol. Biol.* **322**: 483-489.

- Nishimura, C., Wright, P. E. and Dyson, H. J. (2003). Role of the B helix in early folding events in apomyoglobin: evidence from site-directed mutagenesis for native-like long range interactions. *J. Mol. Biol.* **334**: 293-307.
- Nishioka, Y. and Leder, P. (1979) The complete sequence of a chromosomal mouse α -globin gene reveals elements conserved throughout vertebrate evolution. *Cell* **18**: 875-882.
- Onuchic, J. N., Wolynes, P. G., Luthey-Schulten, Z. and Socci, N. D. (1995) Toward an outline of the topography of a realistic protein-folding funnel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 3626-3630.
- Onufriev, A., Case, D. A. and Bashford, D. (2003) Structural details, pathways, and energetics of unfolding apomyoglobin. *J. Mol. Biol.* **325**: 555-567.
- Postnikova, G. B., Komarov, Y. E. and Yumakova, E. M. (1991) Fluorescence study of the conformational properties of myoglobin structure. 1. pH-dependent changes of tryptophanyl fluorescence in intact and chemically modified sperm whale apomyoglobins. *Eur. J. Biochem.* **198**: 223-232.
- Postnikova, G.B. (1999) Fluorescence study of conformational transitions in the structure of myoglobin. *Biochemistry (Moscow)* **64**: 267-286.
- Ptitsyn, O. B. (1991) How does protein synthesis give rise to the 3D-structure? *FEBS Lett.* **285**: 176-181.
- Ptitsyn, O. B. (1995) Structures of folding intermediates. *Curr. Opin. Struc. Biol.* **5**: 74-78.
- Ptitsyn, O. B. and Rashin, A. A. (1975) A model of myoglobin self-organization. *Biophys. Chem.* **3**: 1-20.
- Ramos, C. H. I. (1999) Mapping subdomains in the C-terminal region of troponin I involved in the binding to troponin C and to thin filament. *J. Biol. Chem.* **274**: 18189-18195. Erratum in: *J. Biol. Chem.* (2000) **275**: 6045.
- Ramos, C. H. I., Kay, M. S. and Baldwin, R. L. (1999) Putative interhelix ion pairs involved in the stability of myoglobin. *Biochemistry* **38**: 9783-9790.
- Reymond, M. T., Merukta, G., Dyson, H. J. and Wright, P. E. (1997) Folding propensities of peptide fragments of myoglobin. *Protein Sci.* **6**: 706-716.
- Rumbley, J., Hoang, L., Mayne, L. and Englander, S. W. (2001) An amino acid code for protein folding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 105-112.

- Sali, A., Shakhnovich, E. and Karplus, M. (1994) How does a protein fold? *Nature* **369**: 248-251.
- Santoro, M. M. and Bolen, D. W. (1988) Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of phenylmethanesulfonyl alpha- chymotrypsin using different denaturants. *Biochemistry* **27**: 8063-8068.
- Schellman, J. A. (1955) The stability of hydrogen-bonded peptide structures in aqueous solution. *C. R. Trav. Lab. Carlsberg [Chim.]* **29**: 230-259.
- Serrano, L., Kellis, J. T. Jr, Cann, P., Matouschek, A and Fersht, A. R. (1992) The folding of an enzyme. II. Substructure of barnase and the contribution of different interactions to protein stability. *J. Mol. Biol.* **224**: 783-804.
- Shin, H. C., Merutka, G., Waltho, J. P., Tennant, L. L., Dyson, H. J. and Wright, P. E. (1993) Peptide models of protein folding initiation sites. 3. The G-H helical hairpin of myoglobin. *Biochemistry* **32**: 6356-6364.
- Sirangelo, I., Tavassi, S. and Irace, G. (2000) Tryptophanyl contributions to apomyoglobin fluorescence resolved by site-directed mutagenesis. *Biochim. Biophys. Acta.* **1476**: 173-180.
- Sirangelo, I., Malmo, C., Casillo, M., Mezzogiorno, A., Papa, M. and Irace, G. (2002). Tryptophanyl substitutions in apomyoglobin determine protein aggregation and amyloid-like fibril formation at physiological pH. *J. Biol. Chem.* **277**: 45887-45891.
- Smith, V. F. and Matthews, C. R. (2001) Testing the role of chain connectivity of the stability and structure of dihydrofolate reductase from *E. coli*: Fragment complementation and circular permutation reveal stable, alternatively folded forms. *Protein Sci.* **10**: 116-128.
- Stryer, L. (1988) Oxygen-transportin proteins: myoglobin and hemoglobin. *In: Biochemistry*. Ed. W.H. Freeman Co. New York.
- Takano, T. (1977) Structure of myoglobin refined at 2.0 Å resolution I. Crystallographic refinement of metmyoglobin from sperm whale. *J. Mol. Biol.* **110**: 537-568.
- Tanford, C. (1968) Protein denaturation. *Adv. Protein Chem.* **23**: 121-282.

- Tcherkasskaya, O. and Ptitsyn, O. B. (1999a) Direct energy transfer to study the 3D structure of non-native proteins: AGH complex in molten globule state of apomyoglobin. *Protein Eng.* **12**: 485-490.
- Tcherkasskaya, O. and Ptitsyn, O. B. (1999b) Molten globule versus variety of intermediates: influence of anions on pH-denatured apomyoglobin. *FEBS Lett.* **455**: 325-331.
- Tcherkasskaya, O., Bychkova, V. E., Uversky, V. N. and Gronenborn, A. M. (2000a) Multisite fluorescence in proteins with multiple tryptophan residues. Apomyoglobin natural variants and site-directed mutants. *J. Biol. Chem.* **275**: 36285-36294.
- Tcherkasskaya, O., Ptitsyn, O. B. and Knutson, J. R. (2000b) Nanosecond dynamics of tryptophans in different conformational states of apomyoglobin proteins. *Biochemistry* **39**: 1879-1889.
- Venyaminov, S. Y. and Vassilenko, K. S. (1994) Determination of protein tertiary structure class from circular dichroism spectra. *Anal. Biochem.* **222**: 176-184.
- Venyaminov, S. Y. and Yang, J. T. (1996) Determination of protein secondary structure. *In: Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules.* Fasman, G. D. (Ed.) first edition. Plenum Press, New York, USA.
- Viguera, A. R., Blanco, F. J. and Serrano, L. (1995) The order of secondary structure elements does not determine the structure of a protein but does affect its folding kinetics. *J. Mol. Biol.* **247**: 670-681.
- Waltho, J. P., Feher, V. A., Merukta, G., Dyson, H. J. and Wright, P. E. (1993) Peptide models of protein folding initiation sites. 1. Secondary structure formation by peptides corresponding to the G- and H- helices of myoglobin. *Biochemistry* **32**: 6337-6347.
- Wetlaufer, D. B. (1973) Nucleation, rapid folding and globular intrachain regions in proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**: 697-701.
- Williams, E. J. (1966) Exposure of the tryptophyl residues of metmyoglobin in solution. *Arch. Biochem. Biophys.* **115**: 21-26.
- Wittenberg, J. B. and Wittenberg, B. A. (2003) Myoglobin function reassessed. *J. Exp. Biol.* **206**: 2011-2020.

- Woolfson, D. N., Evans, P. A., Hutchinson, E. G. and Thornton, J. M. (1993) Topological and stereochemical restrictions in beta-sandwich protein structures. *Protein Eng.* **6**:461-470.
- Wright, P. E. and Baldwin, R. L. (2000) Case study 1: The folding process of apomyoglobin. *In: Mechanisms of Protein Folding*, 2nd Ed. Pain, R. (Ed.). Oxford University Press, New York, p. 309.
- Zhang, T., Bertelsen, E., Benvegna, D. and Alber, T. (1993) Circular permutation of T4 lysozyme. *Biochemistry* **32** :12311-12318.

9. ANEXOS.

9.1. Ribeiro-Júnior, E. A., Regis, W. C. B., Tasic, L. and Ramos, C. H. I. (2003). **Fast purification of the Apo form and of a non-binding heme mutant of recombinant sperm whale myoglobin.** *Protein Expres. Purif.* **28**, 202-208.

Fast purification of the Apo form and of a non-binding heme mutant of recombinant sperm whale myoglobin

Euripedes A. Ribeiro Jr., Wiliam C.B. Regis, Ljubica Tasic, and Carlos H.I. Ramos*

*Centro de Biologia Molecular Estrutural, Laboratório Nacional de Luz Sincrotron, P.O. Box 6192, Campinas SP 13084-971, Brazil
Dept. de Bioquímica, Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas SP, Brazil*

Received 10 July 2002, and in revised form 9 October 2002

Abstract

As molecular biology has developed it has become possible to abundantly produce heterologous proteins in bacteria and to design serial amino acid substitutions for the generation of modified proteins, an approach also known as protein engineering. Sperm whale myoglobin, a protein of broad interest, has been cloned for several years now and a large collection of mutants has been produced. The presence of heme stabilizes the protein, which is recovered soluble from the bacterial pellet, and most purification protocols take advantage of this property for myoglobin purification directly from the pellet. However, recovery from the column resin is poor with these methods making them expensive and the procedure for removing heme is laborious and drastic when the apo form of Mb is required. In the case of proteins with severe mutations, which bind heme weakly or do not bind it at all, such methods cannot be employed without massive loss of productivity. Here, we describe a modified method, which is both low cost and rapid, for the purification of the soluble apo form of Mb from *Escherichia coli* inclusion bodies. Biophysical characterization of the protein after purification shows that the purified apoMb retains its native conformation and is soluble. This modified method is also used for the purification of a non-heme-binding apoMb mutant, demonstrating its efficiency when dealing with drastic mutations. © 2002 Elsevier Science (USA). All rights reserved.

Myoglobin (Mb)¹ functions as a protein for transporting and storing oxygen and is a soluble, globular heme-binding protein, comprising 153 amino acids arranged in eight helical segments (named A–H). Sperm whale myoglobin has been studied exhaustively and investigations have centered on its structure, function, heme-binding, stability, and folding pathway. References are many, see for some examples: [1–7], and citations therein. The ability of myoglobin to bind oxygen depends on the presence of heme and, when this prosthetic group is lost, Mb maintains its native solubility and conformational structural characteristics and is referred to as apoMb. ApoMb demonstrates various differences from its holo form; its red color is lost and the

protein has both a lower ellipticity [8,9], lower stability [3], and is less compact [10]. ApoMb unfolds in just one stage, whereas holoMb appears to unfold throughout a two-state process [11].

The cloning of sperm whale myoglobin cDNA in a prokaryotic expression vector [12,13] opened the possibility of producing this protein in an abundant way. The protein can be expressed in *Escherichia coli*, a cell which produces heme, which in turn binds to Mb, increasing its stability. Most of the purification protocols recover the soluble holoMb from the bacterial pellet and purify the protein from it. However, these methods are somewhat expensive, since recovery from the column resin is inefficient. If the apo form of Mb is required, the protein must undergo a heme-removing procedure. The advance in molecular biology methods has made possible the creation of site-directed mutants for the study of specific residue functions in this protein. In the case of severe mutants that bind heme weakly, or do not bind it at all, the conventional holoMb purification methods cannot be employed without massive loss of protein. The apo

* Corresponding author. Fax: +55-19-3287-7110.

E-mail address: cramos@lnls.br (C.H.I. Ramos).

¹ Abbreviations used: Mb, myoglobin; HrMb, horse myoglobin; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; WT, wild type; Gdm-Cl, guanidinium chloride; IB, inclusion bodies; NMR, nuclear magnetic resonance.

and holo forms of Mb have been our object of study for several years [11,14]. The preparation of the apo form, and the purification of deficient heme-binding mutants, has always been laborious and highly expensive. The development of a less laborious and expensive technique is essential for use in less well-equipped laboratories or when the preparation of mutants is required for the study of Mb structure and function. Here, we describe a modified and rapid method for the purification of the soluble apo form of Mb from *E. coli* inclusion bodies that is effective for work with non-heme-binding mutants.

Materials and methods

Cloning and site-directed mutagenesis

The sperm whale Mb cDNA was cloned between the restriction sites *Nde*I and *Sal*I in pT7-7 vector (Amersham Life Science), originating the pT7-7-Mb vector. This expression vector was a gift from Dr. Robert Baldwin, Stanford University. The Mb mRNA transcription is under the control of the T7 promoter and is produced with a high copy number under IPTG-induction [15]. The site-directed mutagenesis method used is a variation of the method described by Landt et al. [16]. It is a PCR-based method where two oligonucleotides were designed, a forward one containing the *Nde*I restriction site and, consequently, the start codon (Methionine), and a reverse oligonucleotide which replaces the Gly124 codon with a stop codon and introduces a *Sal*I restriction site upstream. The PCR product was digested with *Nde*I and *Sal*I enzymes and cloned in the pT7-7 expression vector previously digested with the same enzymes.

Expression and purification

LB medium containing carbenicillin (Pharmacia) was inoculated with an overnight transformed culture of BL21(DE3) *E. coli* strain (Novagen). The culture was grown at 37 °C until it reached an OD₆₀₀ of between 0.8 and 1.0 U.A., when IPTG was added to a final concentration of 0.4 mM [15]. The temperature was either maintained at 37 °C, for conventional protein expression, or changed to 42 °C for expression in inclusion bodies. After 5 h, the bacteria culture was sedimented by centrifugation, resuspended in 20 ml/L lysis buffer, and passed three times throughout the French press at 2000 psi. The DEAE column was equilibrated with 5 bed volumes of equilibration buffer and the protein was recovered in the flow throughout. The CM column was equilibrated with 5 bed volumes of equilibration buffer but the protein was recovered with increasing concentrations of NaCl (0–100 mM) in equilibration buffer (10

bed volumes). The examination of expression yield and protein profile purification were performed by SDS-polyacrylamide gel (SDS-PAGE), as described by Laemmli [17]. The composition of working buffers is as follows: lysis buffer: Tris-HCl 100 mM, KCl 100 mM, and EDTA 1 mM, pH 8.0. solubilization buffer: Tris-HCl 100 mM, pH 8.0, Gdm-Cl 8 M. Equilibration buffer: sodium phosphate 50 mM, pH 7.2. No protease inhibitors were included in the buffers.

Protein assays

Horse Mb was purchased from Sigma and all chemicals used were of analytical grade. ApoMb concentration was measured spectrophotometrically using the calculated extinction coefficient for denatured proteins [18–20]. Hemin was mixed to the protein solution in the proportion of 1:2 (protein:hemin) and incubated at 4 °C during 30 min in holoMb preparation, followed by centrifugation at 90,000g, 4 °C for 20 min for elimination of any remaining apo form. The concentration of holoMb was measured at the Soret band in 20 mM sodium phosphate at pH 7.0, as described by Antonini and Brunori [1] using a JASCO UV/Vis spectrometer model 530.

Spectroscopic methods

Circular dichroism (CD) measurements were recorded using a Jasco J-810 spectropolarimeter and the calculation of protein α -helical content was determined, as described by Chen et al. [21]. All measurements were performed in Hellma cuvettes of 1 cm path length in 20 mM sodium phosphate, pH 6.5, at 4 °C. MALDI/TOF measurements were performed at the Mass Spectrometry facility at UNICAMP. The NMR spectra were recorded at 20 °C in a Varian INOVA spectrometer with a ¹H operating frequency of 499.73 MHz and processed using Felix 2.3 software (Biosym Technologies).

Results

The substitution of a stop codon for Gly124 in the Mb cDNA, using site-directed mutagenesis, was confirmed by DNA sequencing. The sequencing also confirmed that the cDNA was correctly cloned in the pT7 vector and no other mutation was introduced. These procedures created the mutant pT7-7-Mb_{1–123} expression vector. Fig. 1 shows Mb amino acid sequence and the residues deleted in the mutant (referred to here as Mb_{1–123}). The WT and Mb_{1–123} myoglobins are highly expressed both at 37 and 42 °C (Fig. 2). However, upon cell disruption, we found that Mb_{1–123} was detected in the pellet both at 37 and 42 °C, even when extra heme was added, whilst Mb WT appeared in the pellet only at

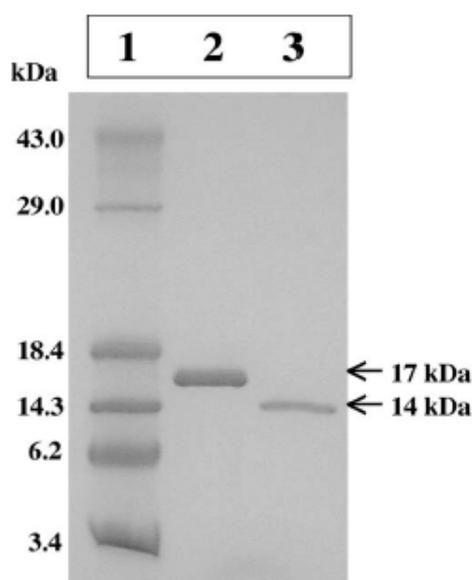


Fig. 3. Purified WT apoMb and apoMb₁₋₁₂₃ proteins after DEAE chromatograph. Lane 1 contains the protein molecular weight standards (Gibco). Lane 2 is apoMbw (~17 kDa—153 amino acid residues). Lane 3 is apoMb₁₋₁₂₃ (~14 kDa—123 amino acid residues). Both proteins are highly purified and present relative migration as expected for their molecular weight.

apoMb was obtained in a yield of 45 mg/L and apoMb₁₋₁₂₃ in a yield of 30 mg/L (Table 1).

The stored protein may be easily resuspended in water without buffer, since the presence of even a little amount of salt increases precipitation (data not shown). The purified wild-type apoMb is soluble and has stable α -helical conformation as seen by its characteristic CD spectra (68% α -helical; Fig. 4A and Table 1). Purified WT apoMb was able to bind heme as seen by its spectra at the Soret band (Fig. 4B and Table 1) and is folded as detected by characteristic 1D ¹H NMR spectra (Fig. 5). After heme binding WT Mb is more structured, as shown both by CD (87% α -helical; Fig. 4A and Table 1) and by 1D ¹H NMR (Fig. 5). The apoMb₁₋₁₂₃ is soluble

but lacks most of its α -helical secondary structure (20% α -helical; Fig. 4A and Table 1) as well as its ability to bind heme. The addition of heme to apoMb₁₋₁₂₃ leads to protein aggregation and no spectral sign is measured either by circular dichroism or by absorbance. The effect of 30% trifluoroethanol on the conformation of apoMb₁₋₁₂₃ as measured by circular dichroism shown in Fig. 4A and an increase in the α -helical composition from 20 to 25% is observed (Table 1).

Discussion

Methods for the purification of recombinant Mb take advantage of the high stability of this protein when bound to heme. When a protein is much more stable than others found in bacteria, stringent conditions can be used for the precipitation of these contaminants while the target remains soluble. In the case of many protocols for the purification of recombinant Mb, the extraction of bacteria without extensive treatment is used in the chromatographic step, making the task of cleaning the resin very difficult or sometimes even impossible. In addition, when purification of apomyoglobin is required, the heme-extraction procedure is extremely harsh for the protein, as it requires precipitation in an acid organic environment. The initial motivation for this study was to find a more suitable method for the purification of apomyoglobin that overcomes the aforementioned unfavorable aspects. We herein describe a novel, rapid, and inexpensive method for the purification of the apo form of myoglobin. This procedure also proved valuable for the purification of myoglobin mutants that either bind heme weakly or do not bind it at all.

The first modification introduced to previous Mb purification protocols is the change in temperature after IPTG induction. An increased temperature induces the WT Mb to precipitate in insoluble inclusion bodies, an occurrence also caused by mutagenesis of some residues in this protein, as observed for the Mb mutant tested in

Table 1
Purified proteins biophysical parameters

Protein form	Yield (mg/L)	A_{408}/A_{280}	Molecular weight: measured (expected) (Da)	CD 222 nm (deg cm ² dmol ⁻¹)	α -Helical content (%)
ApoMb WT	45 ^a	10 ⁻³	17332.6 (17331.0)	19,000	68
HoloMb WT	—	4.3	—	25,500	87
ApoMb ₁₋₁₂₃	30	10 ⁻²	14292.4 (14091.3)	2800	20
ApoMb ₁₋₁₂₃ (TFE 30% _{v/v})	—	—	—	3300	25

The table shows important biophysical parameter characteristics of purified apo and holo forms of WT Mb and of apoMb₁₋₁₂₃. See Materials and methods for details. The parameters measured for wild-type Mb are in good agreement with previously published results. The ApoMb₁₋₁₂₃ mutant lost a large amount of secondary structure as compared with the wild-type and seems not to be able to bind heme. Both proteins are purified in good yield and are of expected molecular weight. By our experience, the purification of apoMb WT using other purification method yields 60–80 mg/L protein [11].

^a All errors are less than 5%.

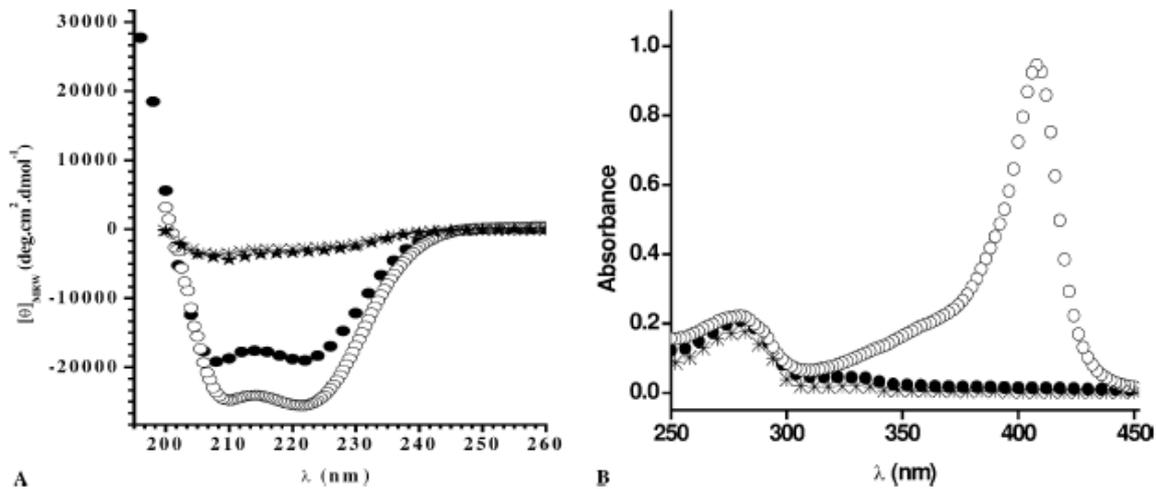


Fig. 4. Conformational characterization of the apo and holo forms of WT Mb and of apoMb₁₋₁₂₃. (A) Far-UV CD spectra. WT apoMb (closed circle) shows characteristic α -helical conformation that becomes more helical in the presence of heme (open circle). The amount of α -helical conformation in ApoMb₁₋₁₂₃ (asterisks) is lower than in WT apoMb and its value increases in the presence of 30% TFE (black stars). (B) Absorbance spectra. The apo (closed circle) and holo (open circle) forms of WT Mb and Mb₁₋₁₂₃ (asterisks) show the characteristic peak at 280 nm due to tryptophan but only the holo form shows the characteristic Soret band due to the heme binding.

this study that precipitates even at 37 °C. Consequently, Mb becomes the main protein component of the inclusion bodies, facilitating its purification. After initial bacterial wall disruption, inclusion bodies were easily separated from the other cell components by centrifugation due to their high density. Afterward, the inclusion bodies must be disrupted to achieve protein solubilization. Detergents have been used both for inclusion body solubilization and for preventing protein aggregation during refolding (see [22] for a recent review

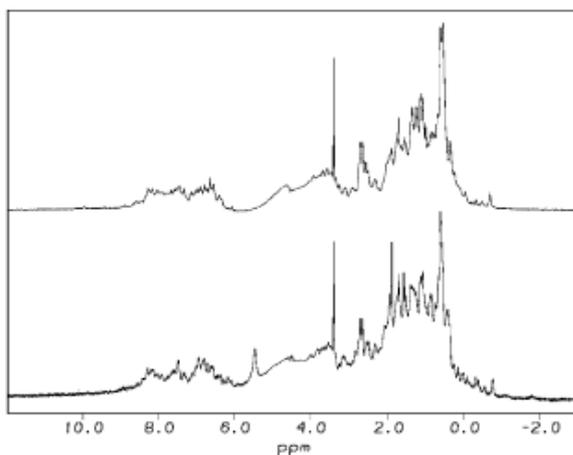


Fig. 5. One-dimensional ^1H NMR spectra of the apo (upper panel) and holo (lower panel) forms of WT Mb. The NMR samples contained 550 μM protein in 95% $\text{H}_2\text{O}/5\%$ D_2O at pH 7.0. The apo and holo forms of WT Mb contain many well-resolved resonances reflecting the folded nature of these states.

on this topic). But, the use of detergents for disruption of the inclusion bodies showed not to be a good strategy as their removal by dialysis is difficult. The procedure of producing apoMb in inclusion bodies and their disruption using SDS have previously been described by Jennings et al. [23]. However, this study used an oversized reverse phase chromatography protocol for SDS elimination, whilst functioning well, is costly. For laboratories without these facilities for the elimination of detergents, the use of inclusion bodies may not be suitable for isolating Mb in its apo form. Herein, we demonstrate that the use of Gdm-Cl in the solubilization buffer combined with several short steps of sonication is an efficient method for this disruption without the use of detergents. Once the protein has been solubilized, we found that decreasing the initial Gdm-Cl concentration from 8 to 4 M reduces by half the protein concentration, an important step for avoiding apoMb precipitation. The amount of contaminant protein that precipitates after dialysis is very high, due to the fact that most of the precipitated proteins are not as stable as apoMb. Even apoMb₁₋₁₂₃, which possesses a severe mutation that causes missing of α -helical content, is found in the soluble portion after dialysis. Since the dialysis procedure takes over 12 h, we found it safer to perform this procedure at low temperature to avoid protease action or precipitation. Although the dialyses were performed at low temperatures, the chromatography procedures were carried out at room temperature without any protein precipitation. The protein is purified by one chromatography step in which the remaining contaminants were eliminated. An optional second chromatography step

using CM-Sepharose can be added when an extremely purified protein is required (>95%) or when the protein yield is low (in the case of poorly expressed mutants).

The resultant purified proteins obtained by this procedure are soluble and maintain both structure and function. Their apo forms have no sign of bounded heme in the Soret band. The WT apoprotein is folded and is able to bind heme as seen by the spectra at the Soret band both by visual inspection and by the relation between the protein absorbance at 408 and 280 nm [1]. Both the purified WT apoMb and the holoprotein resemble native stable proteins in solution from the NMR standpoint. The α -helical structure percentage for apoMb WT and the gain in secondary structure of the order of 20% for its holo form are in accordance with previous studies of this protein [8].

Research in the field of myoglobin proteins sometimes relies on mutations for investigation. Olson and Phillips [6] demonstrated that myoglobin stability depends on heme binding; thus, mutations that affect heme binding have harmful effects on protein stability. Since traditional methods for myoglobin purification rely on high stability, when a cloned mutant has decreased heme affinity its purification yield is reduced. When the mutation is unfavorable, less protein is produced and the level of purification decreases. It is not unusual for a non-heme-binding mutant to be ignored due to the inability to purify a substantial amount for further experiments. The non-heme-binding mutant used herein lacks the last 20 residues responsible for making the H helix. This deletion causes loss of secondary structure as seen by circular dichroism experiments and in contrast to our expectations (see [24] for an example of horse Mb deletion mutant that binds heme), it does not bind heme at all. One of the residues that are involved in heme binding is lost in this mutant (see Fig. 1). Although the discussion of the loss of heme-binding ability in Mb_{1–123} requires further studies, we assume that the partial loss of structure is probably the cause for the absence of heme binding and its low stability at high concentrations. The increase of α -helical content caused by TFE suggests that some regions of the protein have propensity to assume this conformation whereas the fact that the presence of this alcohol does not facilitate heme binding to Mb_{1–123} corroborates the hypothesis that the heme pocket in this protein is not correctly folded (see [25] for an example of sperm whale Mb deletion mutant that does not bind heme). Such non-heme-binding mutant would not be easily purified by the conventional methods where the heme-binding property is important for the purification efficiency. Using the method herein described, we were able to purify this mutant in a similar manner to the WT protein. The mutant apoMb is soluble either after final dialysis or after it has been lyophilized and resuspended in water. However, the protein does not bind heme, as confirmed by its Soret

spectra absorption. Absence of bound heme made the purification of this mutant unfeasible by conventional methods and the purification of apoMb_{1–123} in a soluble form demonstrates that the method developed is efficient for the purification of Mb mutants with low or no heme-binding affinity. We also suggest this method to be suitable for the purification of fusion and His-tagged proteins, but further experimental work should be done to support it.

Conclusion

Myoglobin is a widely studied protein. The cloning of its cDNA in a vector for high protein expression is furthering our knowledge regarding this protein, since larger amounts of protein can be purified and site-directed mutagenesis may be performed where a series of amino acid residues can be changed. The efficiencies of most of the Mb purification protocols available depend on heme-binding properties. Although these methods are very efficient, they are onerous and the subsequent removal of heme for apoMb studies is expensive and laborious. In addition, these methods do function adequately when non-heme-binding mutants are produced. Here, we describe a method that forces expressed apoMb to precipitate in inclusion bodies, where the protein can be extracted in its soluble, purified form by a procedure that is both rapid and inexpensive. We demonstrate efficient results with both WT and a non-heme-binding mutant, producing soluble and pure proteins. Both proteins demonstrate α -helical conformation by CD spectra inspection. The WT apoMb is functional as shown by its ability to bind heme forming holoMb and recovering its α -helical structure. The two forms of purified WT Mb are correctly folded. Therefore, this method is suitable for quick and cheap purification of the apo forms of wild-type and mutant Mbs.

Acknowledgments

We thank the PEW Charitable Trust, FAPESP, and MCT/CNPq for fellowships and financial support. We thank V. Soares for technical assistance and N. Zanchin, C. Benedetti, and P. Correa for helpful discussion. We are grateful to the NMR group at LNLS for all their help. This paper is dedicated to Buzz Baldwin on the occasion of his 75th birthday

References

- [1] E. Antonini, M. Brunori, Hemoglobin and Myoglobin in their Reactions with Ligands, American Elsevier, New York, NY, 1971.

- [2] T. Takano, Structure of myoglobin refined at 2.0 Å resolution I. Crystallographic refinement of metmyoglobin from sperm whale, *J. Mol. Biol.* 110 (1977) 537–568.
- [3] Y.V. Griko, P.L. Privalov, S.Y. Venyaminov, V.P. Kutysenko, Thermodynamic study of the apomyoglobin structure, *J. Mol. Biol.* 202 (1988) 127–138.
- [4] D. Barrick, R.L. Baldwin, Stein and Moore award address. The molten globule intermediate of apomyoglobin and the process of protein folding, *Protein Sci.* 2 (1993) 869–876.
- [5] P.A. Jennings, P.E. Wright, Formation of a molten globule intermediate early in the kinetic folding pathway of apomyoglobin, *Science*. 262 (1993) 892–896.
- [6] J.S. Olson, G.N. Phillips Jr., Kinetic pathways and barriers for ligand binding to myoglobin, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 17593–17596.
- [7] E. Bismuto, G. Irace, The effect of molecular confinement on the conformational dynamics of the native and partly folded state of apomyoglobin, *FEBS Lett.* 509 (2001) 476–480.
- [8] E. Breslow, S. Beychok, K.D. Hardman, F.R.N. Gurd, Relative conformation of sperm whale myoglobin and apomyoglobin in solution, *J. Biol. Chem.* 240 (1965) 304–309.
- [9] D. Eliezer, P.E. Wright, Is apomyoglobin a molten globule? Structural characterization by NMR, *J. Mol. Biol.* 263 (1996) 531–538.
- [10] I. Nishii, M. Kataoka, F. Tokunaga, Y. Goto, Cold denaturation of the molten globule states of apomyoglobin and a profile for protein folding, *Biochemistry*. 33 (1994) 4903–4909.
- [11] C.H.I. Ramos, M.S. Kay, R.L. Baldwin, Putative salt-bridges involved in myoglobin stability, *Biochemistry* 38 (1999) 9783–9790.
- [12] B.A. Springer, S.G. Sligar, High level expression of sperm whale myoglobin in *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987) 8961–8965.
- [13] G.N. Phillips Jr., R.M. Arduini, B.A. Springer, S.G. Sligar, Crystal structure of myoglobin from a synthetic gene, *Proteins* 7 (1990) 358–365.
- [14] M.S. Kay, C.H.I. Ramos, R.L. Baldwin, Specificity of native-like interhelical hydrophobic contacts in the apomyoglobin intermediate, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999) 2007–2012.
- [15] F.W. Studier, A.H. Rosenberg, J.J. Dunn, J.W. Dubendorff, Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes, *Methods Enzymol.* 185 (1990) 60–89.
- [16] O. Landt, H.-P. Grunert, U. Hahn, A general method for rapid site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction, *Gene* 96 (1990) 125–128.
- [17] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [18] H. Edelhoch, Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins, *Biochemistry* 6 (1967) 1948–1954.
- [19] S.C. Gill, P.H. von Hippel, Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data, *Anal. Biochem.* 182 (1989) 319–326.
- [20] C.N. Pace, F. Vajdos, L. Fee, G. Grimsley, T. Gray, How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein?, *Protein Sci.* 4 (1995) 2411–2423.
- [21] Y.H. Chen, J.T. Yang, K.H. Chau, Determination of the helix and b-form of proteins in aqueous solution by circular dichroism, *Biochemistry* 13 (1974) 3350–3359.
- [22] E. De Bernardis-Clark, E. Schwarz, R. Rudolph, Inhibition of aggregation side reactions during in vitro protein folding, *Methods Enzymol.* 309 (1999) 217–236.
- [23] P.A. Jennings, M.J. Stone, P.E. Wright, Overexpression of myoglobin and assignment of its amide, C α and C β resonances, *J. Biomol. NMR* 6 (1995) 271–276.
- [24] G. De Sanctis, G. Faktioni, B. Giardina, F. Ascoli, M. Brunori, Mini-myoglobin: preparation and reaction with oxygen and carbon monoxide, *J. Mol. Biol.* 188 (1986) 73–76.
- [25] G. De Sanctis, F. Ascoli, M. Brunori, Folding of apomyoglobin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994) 11507–11511.
- [26] M.S. Hargrove, J.S. Olson, The stability of holomyoglobin is determined by heme affinity, *Biochemistry* 35 (1996) 11310–11318.

9.2. Ribeiro-Júnior, E. A. and Ramos, C. H. I. (2004) **Origin of the anomalous circular dichroism spectra of many apomyoglobin mutants.** *Analytical Biochemistry*, no prelo.

Origin of the anomalous circular dichroism spectra of many apomyoglobin mutants.

Euripedes A. Ribeiro-Jr.^{a,b} and Carlos H.I. Ramos^{a,*}

^aCentro de Biologia Molecular Estrutural, Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, PO Box 6192, Campinas SP, 13084-971, Brazil

^bDepartamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas SP, Brazil

Running title: Origin of the anomalous apoMb CD spectra

*To whom correspondence should be addressed. E-mail cramos@lnls.br, phone 55-19-3287-4520, fax 55-19-3287-7110

Keywords: apomyoglobin; ellipticity; protein folding; spectroscopy; protein purification.

Abstract

Several authors have reported that many sperm whale apomyoglobin mutants show anomalous circular dichroism spectra. These mutants have a low molar ellipticity when compared to the wild-type protein, but in several cases have the same stability of unfolding. A model in which native apomyoglobin is not folded in the same manner as other proteins and in which mutants show progressive reductions in their degree of folding has been suggested to explain this phenomenon. However, nuclear magnetic resonance of the native apomyoglobin conformation has shown that this state is folded and compact, raising the possibility that the anomalous circular dichroism spectra could have another explanation. We studied several mutants with anomalous circular dichroism spectra and

found that these proteins were all contaminated with nucleic acid that contributed to the ultraviolet absorption and caused uncertainty in the determination of protein concentration. The resulting overestimation of the concentration of apomyoglobin explains the phenomenon of anomalous circular dichroism spectra. We describe a procedure to remove the contaminant nucleic acid which yields accurate protein concentration measurements and provides the normal circular dichroism spectra. Our findings support a well-structured native conformation for apomyoglobin and may also be of the interest to others working with purification of recombinant proteins.

Abbreviations: Mb, myoglobin; WT, wild-type; C_m , urea concentration at the midpoint of the unfolding transition; TFE, trifluoroethanol; CD, circular dichroism; $[\Theta]$, mean residue molar ellipticity; A, absorbance; UV, ultraviolet.

Introduction

Sperm whale myoglobin (Mb) is a monomeric protein with eight α -helices labeled A-H [1]. In the absence of its heme group, apomyoglobin (apoMb) maintains a folded structure at neutral pH and folds throughout an intermediate that can be studied in equilibrium [2]. Because of these special characteristics and also because it is very manageable in solution, apoMb has been widely used in protein folding studies. Several authors have studied apoMb using site-directed mutagenesis and have observed that many mutants show anomalous circular dichroism (CD) spectra. The phenomenon of anomalous CD spectra is characterized by a low mean residue molar ellipticity ($[\Theta]$) compared to the wild-type (WT), although several of these mutants have the same stability of unfolding and the same CD and fluorescence spectra shape as WT. At pH 7, where apoMb is native, the current ellipticity for WT sperm whale apoMb at 222 nm ($[\Theta]_{222}$) is

between -18000 and -21000 $\text{deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ [2-12]. Sperm whale apoMb preparations with anomalous CD spectra have $[\Theta]_{222}$ lower than -17000 $\text{deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ and most of them are single-residue mutants with a stability of unfolding similar to the WT (Table 1).

Lin et al. [13] studied the phenomenon described above and concluded that native apoMb is not folded in the same manner as native proteins and has molten globule character. In their model, native apoMb has a fluctuating structure in which even a single mutation causes large reductions in the degree of folding. This conclusion was disputed by Eliezer and Wright [14], who pointed out that the nuclear magnetic resonance spectral properties of native apoMb do indeed correspond to the properties of native proteins, except for the unfolded F helix. Further detailed investigations of native apoMb using nuclear magnetic resonance have also confirmed that this form of apoMb is compact and folded at neutral pH [15,16]. Finding the answer to the problem posed by Lin et al. [13] has been a long-standing challenge to workers on apoMb.

We have also encountered sperm whale apoMb mutants with anomalous CD spectra (Table 1) and show that the origin of this phenomenon in our work is an imprecise determination of protein concentration caused by the presence of residual nucleic acid. This nucleic acid contributes to the ultraviolet (UV) absorption and causes overestimation of protein concentration, thus leading to anomalous CD spectra. In this work, we report an investigation of the anomalous CD spectra shown by many mutants, and the uncertainty in the determination of protein concentration caused by contamination with residual nucleic acid. We also show that the inclusion of an additional chromatographic step in a recently published protocol for the purification of apoMb [12] removes the nucleic acid. This removal of nucleic acid results in accurate protein concentration measurements and in normal CD spectra.

Materials and Methods

Apomyoglobin preparation and general procedures. All chemicals used were of analytical grade. The expression and purification of recombinant Mb were done as described by Loh et al. [17] and apoMb was prepared from holoMb as described by Rossi-Fanelli et al. [18]. Alternatively, apoMb was obtained directly from inclusion body preparation as described by Ribeiro-Jr et al. [12]. In our experience, either procedure for obtaining apoMb resulted in proteins with normal CD spectra as well as in proteins with anomalous spectra. All chromatographic experiments were done using an Äkta FPLC system (Amersham Pharmacia).

Spectroscopic measurements. Protein concentrations were determined using spectroscopic methods [19-21] that relies on the absorbance spectra of the protein's aromatic groups, tyrosine and tryptophan, and disulfides. Briefly, the protein samples, alone or diluted 1:1 and 1:2 with water, in duplicate, were mixed to a final buffer concentration of 20 mM phosphate buffer pH 6.5 and 6 M Gdm-Cl, and had their absorbance was measured. Each experiment was repeated at least 3 times to guarantee that the error was almost insignificant. A detailed description of this method is given in reference [22]. The presence of nucleic acid in the protein preparation was identified based on the $A_{280/260}$ ratio and by ethidium bromide fluorescence. For the latter, 4 μ L of a) the protein preparations, b) a negative control containing buffer alone, and c) a positive control containing 2 ng of DNA (λ /Hind III, Gibco) were spotted onto glass plates. Ethidium bromide was then added to each spot to give a final concentration of 1 μ g/mL and the glass plate was exposed to UV-light to detect fluorescence using a Kodak DS DC120 system. Circular dichroism measurements were recorded using a Jasco J-810 spectropolarimeter with 1 or 10 mm pathlength cuvettes, and protein concentrations of 1 to 20 μ M. Circular dichroism spectra of holoMb and apoMb, at native conditions, were

obtained at 25 °C in 10 mM HEPES, pH 7.8. The CD data was expressed as the ellipticity (Θ) in millidegrees, which was converted to the mean residue molar ellipticity using the equation:

$$[\Theta] = \frac{\Theta}{10 l C n} \quad (\text{Equation 1})$$

where C is the protein concentration in mol/L, l is the cuvette pathlength, and n is the number of amino acid residues (153 in apoMb). The mean residue molar ellipticity is given in deg.cm².dmol⁻¹. UV absorbances were measured in a JASCO model 530 UV/VIS spectrophotometer. Fluorescence measurements were made in an SLM AB2 spectrofluorimeter using a 1 x 1 cm pathlength cuvette and 1 μ M apoMb, with excitation at 288 nm and a bandpass of 2 nm, and emission at 320 nm with a bandpass of 8 nm. The fluorescence experiments to compare WT and mutant were performed in 10 mM HEPES, pH 7.8, at 25 °C on the same day using the same equipment settings.

Urea- and pH-induced unfolding. Urea solutions were prepared freshly and filtered. The concentration of the urea solution was measured by its refractive index as described by Pace [23]. The unfolding of apoMb by urea was studied in 10 mM HEPES, pH 7.8, at 4 °C, with a 20 min equilibration. The pH-induced unfolding experiments of apoMb were studied using 2 mM acetate buffer at 4 °C, with a 20 min equilibration. Each curve or point was the average of at least three independent experiments. Unless stated otherwise, the experimental error was less than 2%. All data were analyzed using Origin software (Microcal).

Results

The anomalous circular dichroism spectra phenomenon. Figure 1A shows the far-UV CD spectra for WT apoMb and for mutants D44A, K56A, and E04A, used here to investigate

the characterization and the origin of the anomalous CD spectra. The shape of the CD spectra of the mutants was similar to that of the WT, although a large difference in $[\Theta]$ between them was evident: WT had $[\Theta]_{222}$ equal to $-19300 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$, whereas D44A had $-15100 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$, K56A had $-14300 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$, and E04A had $-16000 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ (Figure 1A). It is important to point out that the CD spectra of the WT and mutants are very similar and intersect the X axis at the same wavelength. The characteristics of anomalous apoMb are summarized on the left side of Table 2 for the mutants described above, for a WT preparation with low $[\Theta]_{222}$, and mutants A125L and H24V/H119F. The ellipticity at 222 nm of WT and mutants was nearly independent of concentration up to 20 μM (data not shown). The anomalous mutants had the same fluorescence spectrum profile as WT but lower intensity at 330 nm (Table 2), a characteristic also reported by Lin et al. [13]. The mutants had less than 90% of the fluorescence intensity seen in the WT when their spectra were measured under the same conditions. Urea-induced unfolding showed that D44A, K56A, and E04A, like several other mutants with anomalous behaviour, had the same stability as the WT apoMb, with a C_m of about 3.5 M (Figure 1B). The acid-induced unfolding profile was also similar for WT apoMb and mutants, with the formation of an intermediate at pH 4.2 (Figure 1C). The ellipticities of the intermediates were equal to about 80% of the ellipticity measured for the native state (Figure 1C). The addition of TFE up to a final concentration of 6% did not compensate for the low ellipticity of the mutants (Figure 1D).

Removal of contaminating nucleic acid by chromatograph yields accurate protein concentrations and provides normal CD spectra. Figure 2A shows characteristic UV-absorbance spectra for two apoMb samples: (1) with high nucleic acid contamination as indicated by the low $A_{280/260}$ ratio (<1.55 , spectrum 1 in Figure 2A), and (2) apoMb with A normal CD spectrum that correlates with a high $A_{280/260}$ ratio (>1.55 , spectrum 3 in Figure

2A). The high $A_{280/260}$ ratios were obtained after nucleic acid removal (see below) and are listed on the right side of Table 2. Figure 2B shows the characteristic chromatography profile of apoMb with an anomalous CD spectrum on a CM-sepharose column equilibrated with 10 mM acetate, pH 2.0. Chromatography gave an elution profile with two separate peaks (Figure 2B). The first peak corresponded to unbound material (peak 2 in Figure 2B) and contained nucleic acid, as indicated by the UV-absorbance profile (spectrum 2 in Figure 2A) and the fluorescence in the presence of ethidium bromide (drop 2 in Figure 2C). The second peak eluted with a salt gradient (peak 3 in Figure 2B) and contained apoMb free of, or with very low, nucleic acid contamination, as shown by its UV-absorbance profile (spectrum 3 in Figure 2A) and its very low ethidium bromide fluorescence, similar to the background (drop 3 in Figure 2C). A sample of apoMb with anomalous CD spectra before the chromatographic step showed strong fluorescence in the presence of ethidium bromide (drop 1 in Figure 2C). After nucleic acid removal, the calculated $[\Theta]_{222}$ for the tested proteins were $> -18000 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$, compared with the $[\Theta]_{222}$ value of $< -17000 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ measured before the chromatographic step (Table 2). Table 2 shows the spectral characteristics before and after the chromatography step for three classes of proteins: 1) WT with normal CD spectra, 2) mutants with the same stability as the WT (D44A, K56A, and E04A), and 3) mutants with nearly the same stability (A125L) or even more stable (H24V/H119F) than WT. The proteins with anomalous CD spectra were freed of nucleic acid using the method described here and showed normal CD spectra. Together, these results show that the anomalous CD spectra result from inaccurate determination of protein concentration.

Discussion

Several authors have reported anomalous CD spectra for mutants of sperm whale apoMb although the stability of these proteins is apparently normal and the shape of the CD and the fluorescence spectra are similar to those of the WT. In this study, we sought to understand the origin of these anomalous CD spectra, and developed a procedure to solve this problem and provide normal CD spectra. For this, we report data on several mutants and WT apoMb preparations with a low $[\Theta]_{222}$. Spectroscopic analysis of these proteins showed that they were folded and had similar stability and CD spectra as WT, with normal absorbance behavior ($A_{280/260}$ ratio >1.55), although the ellipticity at 222 nm was much lower. This ellipticity did not vary with increasing protein concentration, indicating little or no tendency to aggregate, and was little affected by small concentrations of TFE. These findings indicated the main characteristics of the phenomenon of apoMb with anomalous CD spectra: low ellipticity at 222 nm with a stability of unfolding similar or nearly equal to WT.

The CD spectral properties of a protein depend on the protein's conformation and concentration. Equation 1 shows that the mean residue molar ellipticity depends on the known optical pathlength, on the protein concentration (which must be known correctly), and on the extent of protein secondary structure (which can be altered by a severe mutation). The explanation that the low $[\Theta]_{222}$ values were caused by imprecise protein concentration determination rather than by a conformational change was reinforced by analysis of the CD spectra. The CD spectra of the proteins showing anomalous and normal behaviour were similar and intersected the X axis at the same wavelength, indicating that they contained very similar structural elements, with no evidence for helix to random coil or helix to beta sheet changes. Another indication that imprecise protein concentration determination was the cause of the anomalous CD spectra is the analysis of the UV absorbance spectra, in which the absorbance at 260 nm increased as the mutant ellipticity decreased. The analysis of the CD spectra, UV absorbance, and ethidium

bromide fluorescence suggested that the anomalous CD spectra was the result of contamination by nucleic acid. This explains why many mutants have anomalous CD spectra but no apparent disturbance in their general structure or stability. The fact that even some WT preparations showed nucleic acid contamination and, by extension, low $[\Theta]_{222}$ values, indicates that disturbance in the general structure of the mutant is unlikely to be the cause of the anomalous CD spectra.

To remove the contaminating nucleic acid, we decreased the pH of the apoMb preparation to 2.0. At this low pH, nucleic acid is denatured [24] and unlikely to interact with protein. ApoMb was purified with a high $A_{280/260}$ ratio (>1.55) and refolded to its native conformation. The recovered apoMb contained no nucleic acid, had CD and fluorescence characteristics similar to those of WT apoMb (Table 2), was able to bind heme and had a folded 1D-NMR spectrum [12]. In our experience, conditions that increase the rate of total bacterial DNA production relative to protein formation during induction, such as overnight preparations or the use of pUC-based vectors for moderate protein expression, enhance the presence of nucleic acid in the apoMb preparation. The results showed that WT preparations and mutants with normal or altered stability, such as A125L (+0.6 Kcal/mol at pH 5.0 [25]) and H24V/H119F (+2.2 Kcal/mol at pH 5.0 [26]), which have low $[\Theta]_{222}$ values, have a high percentage of nucleic acid contamination, as identified by the low $A_{280/260}$ ratio (<1.55), and this is the cause of the anomalous CD spectra phenomenon in apoMb. Since the amount of nucleic acid present in the initial protein preparation appears to be variable, a small amount of remaining nucleic acid, not enough to cause large uncertainty in the protein concentration, may still be present in the final preparation, as judged

by small variations in the $A_{280/260}$ ratio after the chromatographic procedure (Table 2). Thus, we suggest that the $A_{280/260}$ ratio should be measured when characterizing apoMb by CD.

The holo form of many apoMb mutants with anomalous CD spectra has the same ellipticity as the WT holoMb [11, 25-28]. The concentration of holoMb is determined by measuring the absorbance in the Soret band, where interference by nucleic acid contamination is not expected. Recently, Cordeiro et al. [29] suggested that nucleic acids interact with the prion protein, driving it to a fibrillar conformation. It may be that nucleic acid binding is a general phenomenon that affects many proteins to different degrees, some with more deleterious effects than others. Thus, nucleic acid could have an additional effect on apoMb mutants that are severely destabilized, that goes beyond interfering with the determination of protein concentration. We have no indication that this is true, but believe that this aspect merits further investigation.

In conclusion, we have shown that the origin of the anomalous circular dichroism spectra for the apoMb mutants studied here is the result of an overestimated protein concentration caused by the presence of contaminating nucleic acid that can also affect WT preparations. This effect may also be the origin of the anomalous CD spectra reported by several authors for many apoMb mutants in the literature. A simple test for determining whether the effect found by us is present in other samples of mutant apoMb is to measure its $A_{280/260}$ ratio. Our findings support a well-structured native conformation for apomyoglobin, as shown earlier by several studies using nuclear magnetic resonance. We have also shown that the removal of this contamination by a chromatographic procedure restores the normal CD and fluorescence spectra of apoMb.

Acknowledgements

We thank Prof. Robert Baldwin and S. Hyslop for critical reading of this manuscript, W. Regis, P. Moura and Dr. C. Benedetti for helpful discussions, and V. Soares and S. Silva for technical assistance. This work was supported by FAPESP, MCT/CNPq and PEW Charitable Trusts. EARJ is supported by a FAPESP fellowship.

REFERENCES

- [1] Takano, T. (1977). Structure of myoglobin refined at 2.0 Å resolution I. Crystallographic refinement of metmyoglobin from sperm whale. *J. Mol. Biol.* **110**, 537-568.
- [2] Griko, Y. V., Privalov, P. L., Venyaminov, S. Y. & Kutysenko, V. P. (1988). Thermodynamic of the apomyoglobin structure. *J. Mol. Biol.* **202**, 127-138.
- [3] Hughson, F. M. & Baldwin, R. L. (1989). Use of site-directed mutagenesis to destabilize native apomyoglobin relative to folding intermediates. *Biochemistry*, **28**, 4415-4422.
- [4] Jennings, P. A. & Wright, P. E. (1993). Formation of a molten globule intermediate early in the kinetic folding pathway of apomyoglobin *Science*, **262**, 892-896.
- [5] Barrick, D., Hughson, F. M. & Baldwin, R. L. (1994). Molecular mechanism of acid denaturation: The role of histidine residues in the partial unfolding of apomyoglobin. *J. Mol. Biol.* **237**, 588-601.
- [6] Griko, Y. V. & Privalov, P. L. (1994). Thermodynamic puzzle of apomyoglobin unfolding. *J. Mol. Biol.* **235**, 1318-1325.
- [7] Geierstanger, B., Jamin, M., Volkman, B. F. & Baldwin, R. L. (1998). Protonation behavior of histidine 24 and histidine 119 in forming the pH 4 folding intermediate of apomyoglobin. *Biochemistry*, **37**, 4254-4265.

- [8] Jamin, M. & Baldwin, R. L. (1998). Two forms of the pH 4 folding intermediate of apomyoglobin. *J. Mol. Biol.* **276**, 491-504.
- [9] Luo, Y. & Baldwin, R. L. (1998). Trifluoroethanol stabilizes the pH 4 folding intermediate of sperm whale apomyoglobin. *J. Mol. Biol.* **279**, 49-57.
- [10] Nishimura, C., Prytulla, S., Dyson, H. J. & Wright, P. E. (2000). Conservation of folding pathways in evolutionarily distant globin sequences. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 679-686.
- [11] Sirangelo, I., Malmo, C., Casillo, M., Mezzogiorno, A., Papa, M. & Irace, G. (2002). Tryptophanyl substitutions in apomyoglobin determine protein aggregation and amyloid-like fibril formation at physiological pH. *J. Biol. Chem.* **277**, 45887-45891.
- [12] Ribeiro-Jr, E. A., Regis, W. C. B., Tasic, L. & Ramos, C. H. I. (2003). Fast purification of the Apo form and of a non-binding heme mutant of recombinant sperm whale myoglobin. *Protein Express. Purif.* **28**, 202-208.
- [13] Lin, L., Pinker, R. J., Forde, K., Rose, G. D. & Kallenbach, N. R. (1994). Molten globular characteristics of the native state of apomyoglobin. *Nat. Struct. Biol.* **1**, 447-452.
- [14] Eliezer, D. & Wright, P. E. (1996). Is apomyoglobin a molten globule? Structural characterization by NMR. *J. Mol. Biol.* **263**, 531-538.
- [15] Eliezer, D., Yao, J., Dyson, H. J. & Wright, P. E. (1998). Structural and dynamic characterization of partially folded states of apomyoglobin and implications for protein folding *Nat. Struct. Biol.* **5**, 148-155.
- [16] Lecomte, J. T. J., Sukits, S. F., Bhattacharya, S. & Falzone, C. J. (1999). Conformational properties of native sperm whale apomyoglobin in solution. *Protein Sci.* **8**, 1484-1491.
- [17] Loh, S. N., Kay, M. S. & Baldwin, R. L. (1995). Structure and stability of a second molten globule intermediate in the apomyoglobin folding pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 5446-5450.

- [18] Rossi-Fanelli, A., Antonini, E. & Caputo, A. (1958). Studies on the structure of hemoglobin I. Physicochemical properties of human globin. *Biochim. Biophys. Acta* **30**, 608-615.
- [19] Edelhoch, H. (1967). Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry*, **6**, 1948-1954.
- [20] Gill, S. C., & von Hippel, P. H. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **182**, 319-326.
- [21] Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. & Gray, T. (1995). How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* **4**, 2411-2423.
- [22] Ramos, C.H.I. (2004). A Spectroscopic-based Laboratory Course for Protein Conformational Studies. *Biochem. Mol. Biol. Edu.* **32**, 31-34.
- [23] Pace, C. N. (1986). Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Methods Enzymol.* **131**, 266-280.
- [24] Thomas, R. (1993). The denaturation of DNA. *Gene* **135**, 77-79.
- [25] Kay, M. S., Ramos, C. H. I. & Baldwin, R. L. (1999). Specificity of native-like interhelical hydrophobic contacts in the apomyoglobin intermediate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 2007-2012.
- [26] Ramos, C. H. I., Kay, M. S. & Baldwin, R. L. (1999). Putative interhelix ion pairs involved in the stability of myoglobin. *Biochemistry*, **38**, 9783-9790.
- [27] Lin, L., Pinker, R. J. & Kallenbach, N. R. (1993). Alpha-helix stability and the native state of myoglobin. *Biochemistry*, **32**, 12638-12643.
- [28] Pinker, R. J., Lin, L., Rose, G. D. & Kallenbach, N. R. (1993). Effects of alanine substitutions in alpha-helices of sperm whale myoglobin on protein stability. *Protein Sci.* **2**, 1099-1105.

[29] Cordeiro, Y., Machado, F., Juliano, L., Juliano, M. A., Brentani, R. R., Foguel, D & Silva, J. L. (2001). DNA converts cellular prion protein into the beta-sheet conformation and inhibits prion peptide aggregation. *J. Biol. Chem.* **276**, 49400-49409.

Table 1. Sperm whale apoMb mutants with anomalous circular dichroism spectra.

The anomalous mutants have a low ellipticity at 222 nm when compared to the WT, independently of the method used to prepare the apoMb (see the references). Unless indicated otherwise, the mutants listed have the same or nearly the same stability as the WT at native pH.

ApoMb	[Θ]₂₂₂ at native pH (deg.cm².dmol⁻¹)	Reference
Wild-type (WT)	-18000 to -21000	[2-12]
H64Q	-15500	[5]
H82Q	-16000	[5]
H24V/H119F	-16500	[7]
W7F	85%	[11]
W14F	80%	[11]
L9A*	-12100	[13]
I28V*	-11300	[13]
T67A*	-12200	[13]
P88A*	-8600	[13]
I111L*	-14200	[13]
S117A*	-14200	[13]
I142V*	-12200	[13]
I142L*	-13330	[13]
A125L	-13900	[24]**
E04A	-16000	[25]**
D44A	-15100	[25]**
K56A	-14300	[25]**

D60A	-16000	[25]**
------	--------	--------

*– for the mutants described by Lin et al. [13] are listed only the examples with similar stability to the WT (stability measured for the holo form [26,27], for the entire list of mutants see reference [13].^{||} –only the percentage of $[\Theta]_{222}$ compared to the wild-type is reported;

** – reference to the mutation, the $[\Theta]_{222}$ value is reported here for the first time.

Table 2. Biophysical characteristics of apoMb with normal and anomalous CD spectra.

	ANOMALOUS CD [§]			NORMAL CD		
	(BEFORE CHROMATOGRAPHY)			(AFTER CHROMATOGRAPHY)		
<i>ApoM</i> <i>b</i>	CD at 222 nm (deg.cm ² .d mol ⁻¹) < -17000*	A 280/260 < 1.55	Ethidium bromide fluorescence	CD at 222 nm (deg.cm ² .d mol ⁻¹) > - 18000	A 280/260 > 1.55	Ethidium bromide fluorescence
WT**	-	-	-	-18600	1.56	No
E04A	- 16000	1.50	Yes	-21100	1.59	No
D44A	- 15100	1.39	Yes	-18900	1.55	No
K56A	- 14300	1.45	Yes	-18500	1.55	No
A125L	- 13900	1.33	Yes	-19500	1.60	No
H24V/ H119F	- 16000	1.35	Yes	-18200	1.55	No

[§]relative fluorescence intensity at 330 nm lower than 90% when compared to the WT with normal CD; ^{||}relative fluorescence intensity at 330 nm higher than 90% when compared to the WT with normal CD; *the intermediate also has a low signal. **results for a preparation with normal characteristics.

Figure captions.

Figure 1: The anomalous circular dichroism spectra phenomenon. The negative ellipticity at 222 nm of many anomalous sperm whale apoMb (here represented by mutants D44A, K56A, and E04A) is low compared to normal apoMb (here represented by the WT), although they have similar spectral shapes and stability of unfolding. **A)** Far-UV CD spectra. The spectral shapes are similar, but WT has $[\Theta]_{222}$ equal to $-19300 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$, whereas D44A had $-15100 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$, K56A had $-14300 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$, and E04A had $-16000 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$. The CD spectra of the WT and mutants are very similar and intersect the X axis at the same wavelength. **B)** Urea-induced unfolding. All proteins show C_m of about 3.5 M urea. **C)** pH-induced unfolding. The mutants intermediate at pH 4.2 also show a low ellipticity at 222 nm compared to the WT. **D)** Ellipticity at 222 nm as a function of increased TFE concentration for WT and mutants apoMb. TFE added to a final concentration of 6% did not alter the low ellipticity of the mutants.

Figure 2: ApoMb with anomalous circular dichroism spectra have nucleic acid contamination, which is removed by chromatograph. **A)** Characteristic UV-absorbance spectra of apoMb before and after nucleic acid removal. Spectrum 1, apoMb before the chromatographic step, $A_{280/260}$ ratio of 1.3. Spectrum 2, flow-through of the chromatographic profile shown in Figure 2B. Spectrum 3, apoMb after nucleic acid removal by the chromatographic step, $A_{280/260}$ ratio of 1.6. **B)** Characteristic elution profile of apoMb during nucleic acid removal by CM-sepharose chromatograph. Peak 2, flow-through. Peak 3, protein eluted with NaCl. **C)** Ethidium bromide fluorescence before and after nucleic acid removal. EtBr, buffer alone (background); drop 1, apoMb preparation before chromatograph; drop 2, flow-through of the chromatographic step; drop 3, apoMb after chromatograph; Ctrl, positive control containing 2 ng of DNA. The preparation of apoMb

presenting the anomalous CD spectra phenomenon fluoresced in the presence of EtBr whereas after the chromatographic step the fluorescence was similar to the background, indicating that the nucleic acid was removed.

Figure 1A.

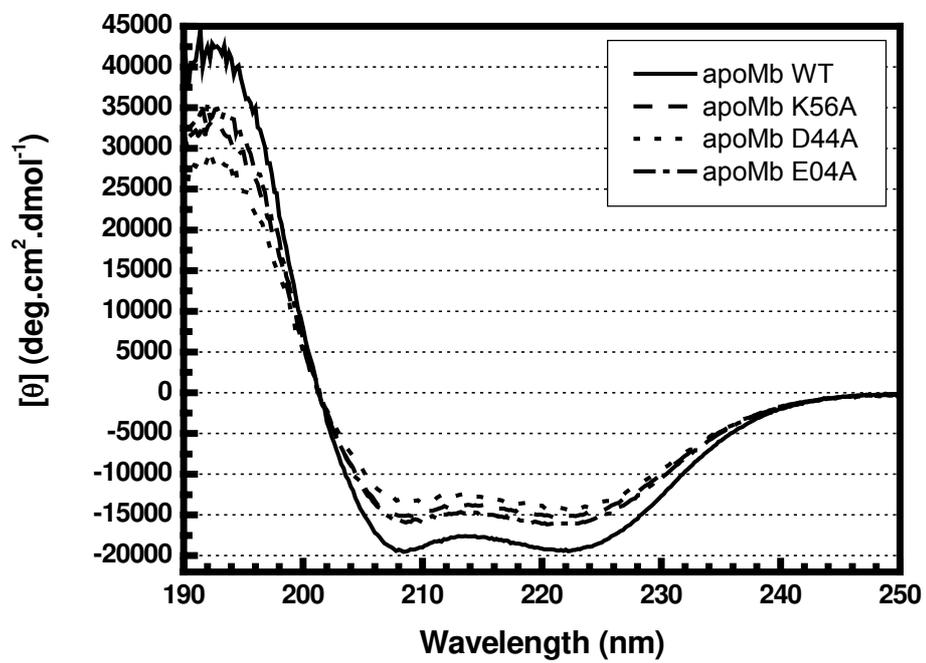


Figure 1B.

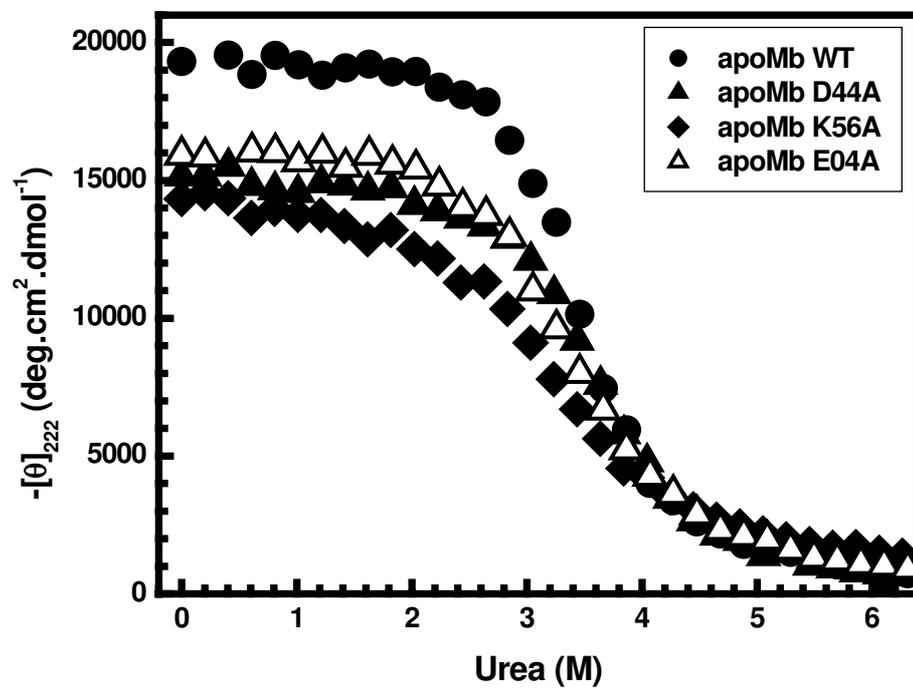


Figure 1C.

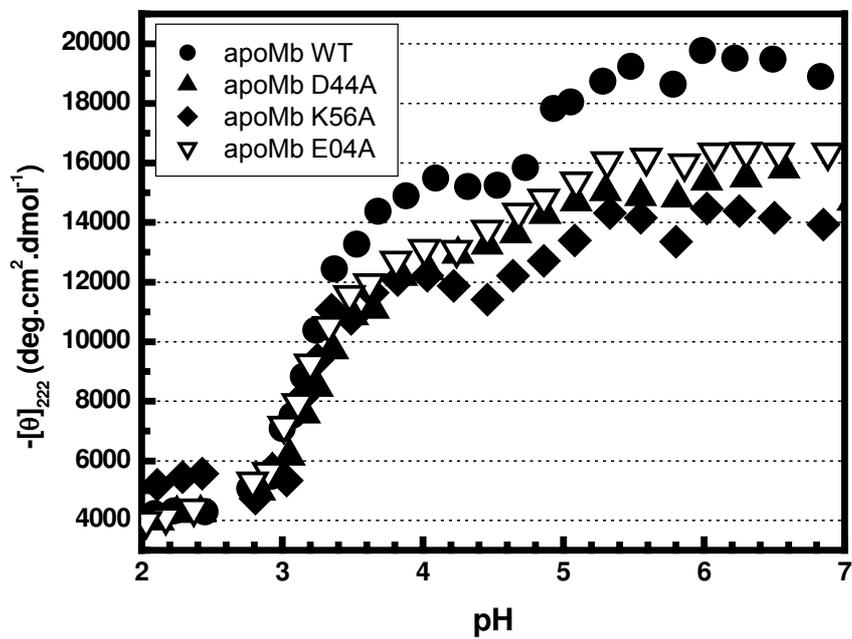


Figure 1D.

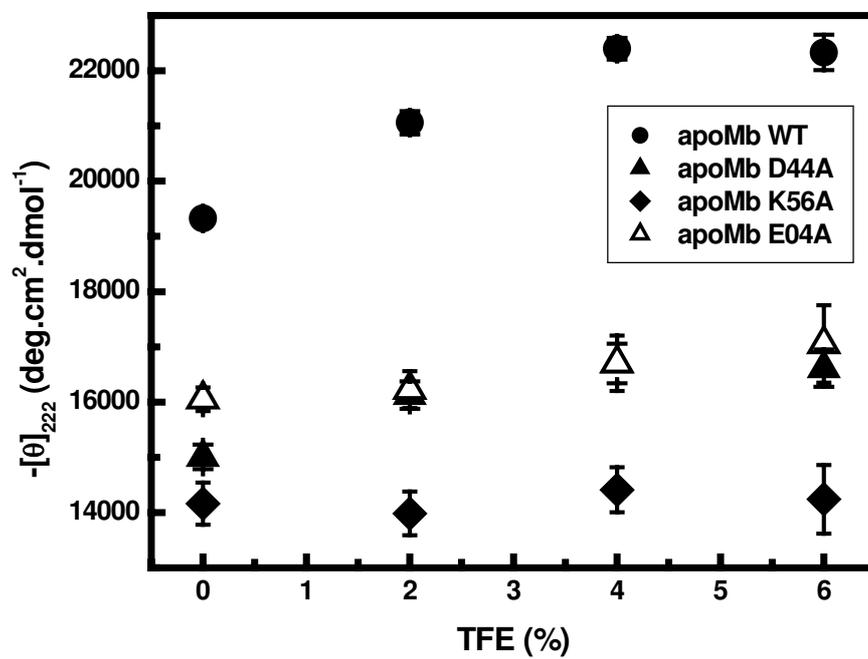


Figure 2A.

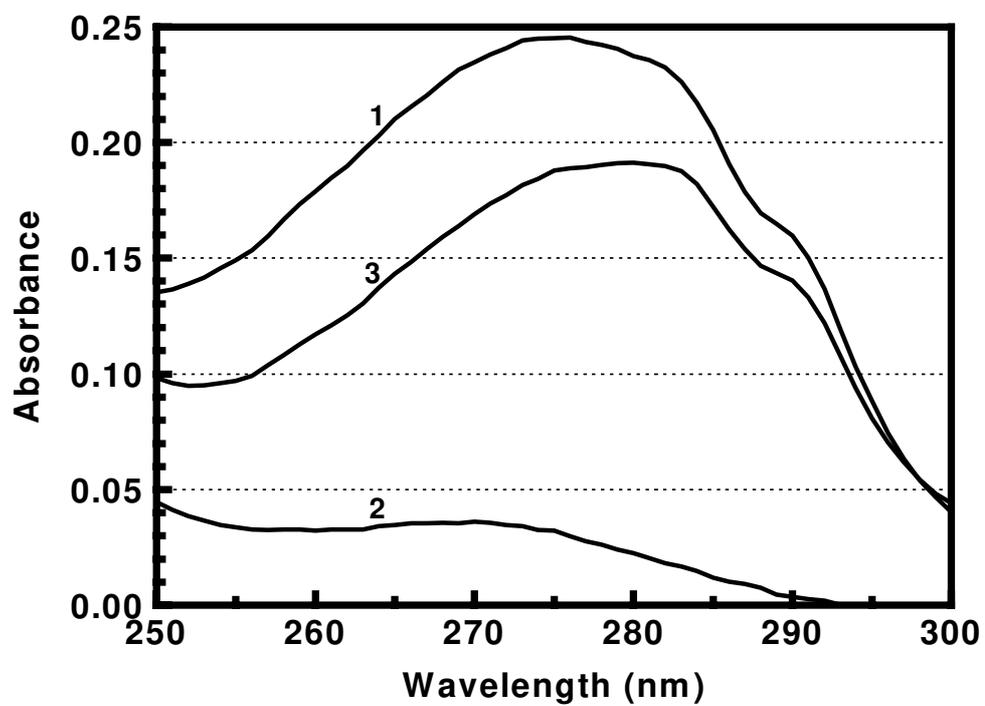


Figure 2B.

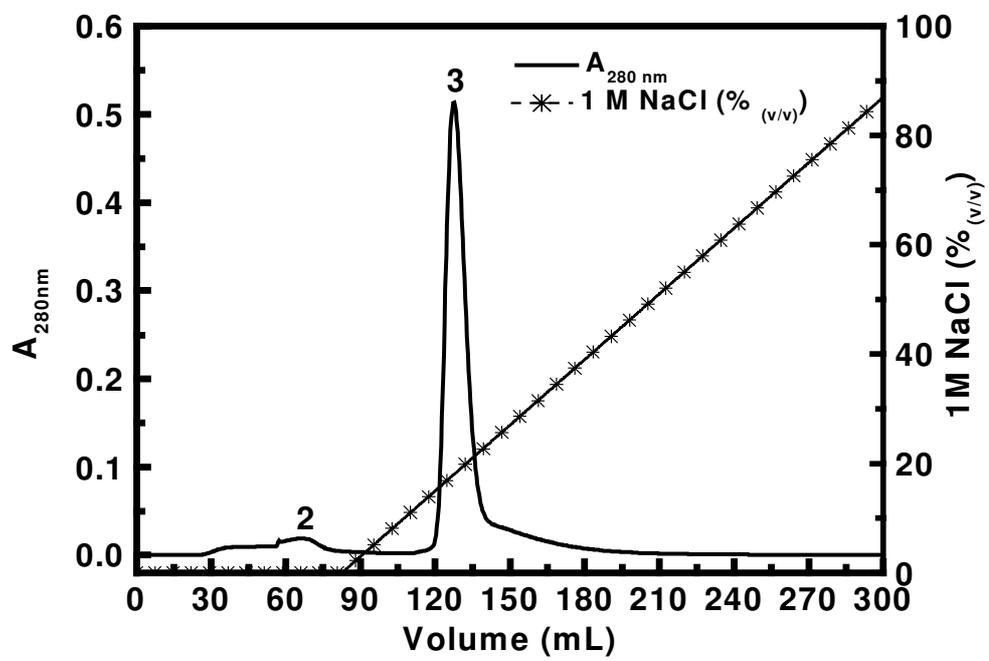


Figure 2C.

