

WILLIAM CESAR BENTO REGIS

**CARACTERIZAÇÃO DAS FORÇAS ENVOLVIDAS NA ESTABILIDADE E  
NA VIA DE ENOVELAMENTO DE GLOBINAS**

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(s) candidato(s):

*William Cesar Bento Regis*

e aprovada pela Comissão Julgadora:

*Carlos Henrique Inácio Ramos*

Tese para apresentação ao Instituto de  
Biologia da Universidade Estadual de  
Campinas, para obtenção do título de  
Doutor em Biologia Funcional e Molecular  
na área de Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique Inácio Ramos

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Mattos Santoro

## FICHA CATALOGRÁFICA

Data da Defesa: 14 de setembro de 2005

**BANCA EXAMINADORA:**

Prof. Dr. Carlos Henrique Indício Ramos  
(Orientador)

Prof. Dr. Carlos Francisco Sampaio Bonafil

Profa. Dra. Beatriz Gomes Guimarães

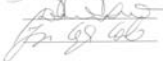
Profa. Dra. Maria Isabel Nogueira Cano

Profa. Dra. Íscia Teresinha Lopes Mendes

Prof. Dr. Hiroshi Aoyama

Prof. Dr. Ricardo Aparício

Profa. Dra. Ljubica Tasic



## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus acima de tudo por Ele ter me conduzido até aqui.

Agradeço ao Carlos pelas oportunidades e pela orientação neste trabalho.

Meu agradecimento muito especial a minha mãe e meus irmãos pelo apoio constante e incondicional. Aos meus tios Rogério, Márcia Roberto e Bela pela força e incentivo nos momentos mais críticos e decisivos.

Agradeço a todos do Centro de Biologia Molecular e Estrutural do LNLS pelo convívio ímpar que tivemos. Faço um agradecimento muito especial a Ana Olívia, que foi um grande pilar da minha sustentação durante grande parte do meu doutorado. Sou muito grato a Arlete que cuidou de mim tornado os momentos difíceis mais divertidos. A Veruska, técnica muitíssimo especial por seu carinho e dedicação. Sem palavras para agradecer a Letícia, a melhor colega de doutorado do mundo! E ao, hoje Dr. Eurípides Ribeiro, que caminhou junto comigo por esse caminho e fez desse período uma fase cheia de muitas, mas muitas histórias mesmo. Fica também um agradecimento especial a Silvia, Buba, Patrícia, Luciana, Telma e Anita pela imensa amizade e grande carinho que nos uniu neste processo. Ao Celso Benedetti e Nilson Zanchin pelas discussões e apoio. Um agradecimento muito forte e especial a todos que já passaram pelo grupo BFM.

Não poderia deixar de agradecer todos da PIBC, por tudo que foram, são e serão em minha vida. Em especial deixo um agradecimento ao Léo e sua família, que se tornou minha também. Ao Enéas Filho, Milton Junior, Livia e Ávila pela amizade tão especial que foi crucial em vários momentos desta caminhada. Ao Wagner Endo e Claudete por seus conselhos e apoio.

Ao professor Marcelo Santoro sou imensamente grato por sua paciência, por sua sabedoria, pelo seu exemplo de conduta científica e por tudo que me ensinou. Aos meus amigos de Belo Horizonte, a minha turma de graduação que mesmo distante sempre esteve presente. Aos eternos amigos Fabrício, Gilmar, Jacqueline, Fabiana, Carla, Dayse e Luciana.

Agradeço à Fundação de Amparo do Estado de São Paulo pela bolsa de doutorado. Agradeço à Fundação de Amparo do Estado de São Paulo, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e ao PEW Charitable Trusts pelo apoio financeiro dado para a realização deste trabalho. Agradeço ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron pelo uso das instalações.

William Regis

## ÍNDICE

|                                                                                        |      |
|----------------------------------------------------------------------------------------|------|
| LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....                                                        | x    |
| ABREVIATURAS.....                                                                      | xi   |
| RESUMO.....                                                                            | xiii |
| ABSTRACT.....                                                                          | xv   |
| 1.INTRODUÇÃO GERAL .....                                                               | 1    |
| 1.1 – O enovelamento de proteínas.....                                                 | 1    |
| 1.2 – Globinas.....                                                                    | 7    |
| 1.2.1 – Mioglobinas.....                                                               | 9    |
| 1.3.Técnicas biofísicas utilizadas para estudos de enovelamento e<br>estabilidade..... | 16   |
| 1.3.1. Dicroísmo circular.....                                                         | 16   |
| 1.3.2. Calorimetria.....                                                               | 19   |
| 1.3.3.Ultracentrifugação analítica.....                                                | 22   |
| 2.OBJETIVOS.....                                                                       | 24   |
| 3.MATERIAIS E MÉTODOS.....                                                             | 25   |
| 3.1. Linhagens de <i>Escherichia coli</i> .....                                        | 25   |
| 3.2. Meios de cultura.....                                                             | 25   |
| 3.3.Transformação de bactérias.....                                                    | 26   |
| 3.3.1.Preparação de células competentes.....                                           | 26   |
| 3.3.2.Transformação utilizando o método do PEG.....                                    | 27   |
| 3.4.Extração de DNA plasmidial.....                                                    | 27   |
| 3.5. Eletroforese.....                                                                 | 28   |
| 3.5.1. Eletroforese em gel de agarose.....                                             | 28   |
| 3.5.2.Eletroforese em gel de poliacrilamida.....                                       | 29   |
| 3.6.SDS-PAGE.....                                                                      | 29   |
| 3.7. Expressão de proteínas.....                                                       | 30   |

|                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.8. Purificação de proteínas.....                                                                       | 31 |
| 3.8.1. Lise bacteriana.....                                                                              | 31 |
| 3.8.2. Lise dos corpos de inclusão.....                                                                  | 32 |
| 3.8.3.Cromatografia de troca iônica.....                                                                 | 32 |
| 3.9. Análises espectroscópicas.....                                                                      | 33 |
| 3.9.2.Solução tampão para medida de concentração de proteínas.....                                       | 33 |
| 3.9.3. Solução tampão para desenovelamento ácido da forma apo.....                                       | 34 |
| 3.9.4. Solução tampão para desenovelamento químico da forma apo.....                                     | 34 |
| 3.9.5.Determinação da concentração de proteínas.....                                                     | 35 |
| 3.9.6.Reação de ligação do grupo heme e cianoheme.....                                                   | 37 |
| 3.9.6.1.Preparação do grupo heme em solução .....                                                        | 37 |
| 3.9.6. 2.Reação de ligação proteína – grupo heme.....                                                    | 37 |
| 3.9.7. Espectros de dicroísmo circular (CD).....                                                         | 38 |
| 3.10. Experimentos de desenovelamento químico.....                                                       | 39 |
| 3.11.Medidas da estabilidade de proteínas.....                                                           | 39 |
| 3.12. Comparação da estabilidade.. cálculo do $C_m$ e da variação de energia livre ( $\Delta G$ ). ..... | 39 |
| 3.13. Calorimetria de varredura diferencial.....                                                         | 41 |
| 3.14.Cromatografia em gel filtração.....                                                                 | 43 |
| 3.15. Ultracentrifugação analítica.....                                                                  | 41 |
| 4. RESULTADOS.....                                                                                       | 45 |
| 4.1. Preparação e caracterização da SWMb.....                                                            | 45 |
| 4.2. Preparação e caracterização de HrMb.....                                                            | 50 |
| 4.3. Análise de Seqüências.....                                                                          | 52 |
| 4.3. Outros resultados.....                                                                              | 54 |
| 5.DISSCUSSÃO.....                                                                                        | 65 |
| 5.1.Expressão e purificação de SWMb.....                                                                 | 65 |
| 5.2. Medidas de estabilidade de SWMb e HrMb.....                                                         | 67 |
| 5.3. Origens da diferença de estabilidade entre SWMb e HrMb.....                                         | 69 |

|                                           |           |
|-------------------------------------------|-----------|
| <b>5.4. Implicações fisiológicas.....</b> | <b>71</b> |
| <b>6.CONCLUSÕES GERAIS.....</b>           | <b>72</b> |
| <b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....</b> | <b>74</b> |



## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

|                                                                                                                                              |        |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Figura 1. Representação esquemática de um funil rugoso para o enovelamento de proteínas.....                                                 | 6      |
| Figura 2 – Estrutura da mioglobina selvagem de baleia ( <i>Physeter catodon</i> )...                                                         | 8      |
| Figura 3 – Estrutura primária da mioglobina selvagem de baleia ( <i>Physeter catodon</i> ).....                                              | 9      |
| Figura 4. Ilustração das transições responsáveis pelo espectro de CD.....                                                                    | 18     |
| Figura 5. Microcalorimetria diferencial de varredura.....                                                                                    | 21     |
| Figura 6. Expressão e etapas de purificação da mioglobina de baleia.....                                                                     | 45     |
| Figura 7. Mioglobina de baleia purificada.....                                                                                               | 46     |
| Figura 8. Espectro de absorção entre 250 e 280 nm.....                                                                                       | 47     |
| Figura 9. Espectro de absorção entre 250 e 600 nm.....                                                                                       | 48     |
| Figura 10 - Espectros de CD, entre 195 e 250 nm da mioglobina de baleia na forma apo e holo.....                                             | 49     |
| Figura 11. Espectro de absorção entre 250 e 600 nm.....                                                                                      | 50     |
| Figura 12. Espectro de dicroísmo circular entre 195-260 nm.....                                                                              | 51     |
| <br>Tabela 1: Comparação dos resíduos não-idênticos das mioglobinas de cavalo e espermacete.....                                             | <br>15 |
| Tabela 2. Coeficientes de absorbância molar para apoproteínas.....                                                                           | 36     |
| Tabela 3. Coeficientes de absorbância molar para holoproteínas.....                                                                          | 36     |
| Tabela 4. Comparação do tipo de aminoácido presente em algumas posições na sequência de aminoácidos de mioglobina de diversos mamíferos..... | 52     |

## ABREVIATURAS

$\epsilon$ : Coeficiente de extinção;

$\lambda$ : Comprimento de onda

$\Delta G$ : Variação da energia livre de Gibbs;

**ApoMb**: Mioglobina sem o grupo prostético (heme);

**CD**: Dicroísmo circular;

**Cm**: Concentração média de desnaturante, onde 50% da população de proteínas estão desnaturadas;

**CN<sup>-</sup>**: Cianeto

**D**: Estado desenovelado;

**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 em alta Performance;

**Hr**: cavalo

**I**: Intermediário;

**IPTG**: Isopropil-beta-D-tiogalactopiranosídeo;

**k**: constante de Boltzman

**FPLC**: Cromatografia líquida de rápida performance;

**MbWT**: Mioglobina selvagem;

**N:** Estado nativo;

**PCR:** Reação em cadeia da polimerase;

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

**T:** Temperatura;

**T<sub>m</sub>:** Temperatura de transição;

**UV:** Ultravioleta.

**SW:** Espermacete.

## RESUMO

Os estudos em biologia estrutural avançaram muito nos últimos anos e inúmeras informações, obtidas principalmente por dados cristalográficos, ajudaram no entendimento dos mecanismos de ação e efeito biológico de várias proteínas contudo o caminho que vai da síntese até a estruturação de uma proteína ainda é pouco conhecido. Uma descrição termodinâmica detalhada de proteínas é fundamental para se entender seu papel biológico e conhecer as interações e forças que determinam o enovelamento. Este é o foco principal deste trabalho que utilizou para isso as mioglobinas de baleia e de cavalo. O estudo da apomioglobina se divide quase igualmente entre as proteínas oriundas de espermacete, a qual está clonada, e de cavalo, a qual é obtida comercialmente. Ambas possuem alta homologia e comportamento similar quanto ao enovelamento, assumindo-se em geral que estas proteínas apresentam o mesmo fenômeno no que diz respeito ao enovelamento. Contudo, esta hipótese pode não ser verdadeira, o que torna necessário medir e comparar a estabilidade destas proteínas. Apenas recentemente um método confiável para medir a estabilidade de mioglobina em uma reação reversível foi implantado: análise do desenovelamento por uréia de um derivado ciano de mioglobina em uma faixa de pH limitado. Nossos resultados mostraram que a mioglobina de cavalo é 2,1 kcal/mol menos estável que a mioglobina de espermacete em pH 5,0 e 25 °C. Além disso, a mioglobina de cavalo agregou em altas concentrações, como medido por experimentos de gel filtração e ultracentrifugação analítica. A alta estabilidade da mioglobina de espermacete foi identificada tanto para a forma apo

quanto para a forma holo e se mostrou independente de pH, na faixa de 5 até 8, e da presença de até 200 mM de cloreto de sódio. A substituição dos resíduos de alanina nas posições 15 e 74 por glicina, encontrados na mioglobina de cavalo, diminuiu a estabilidade da proteína em 1,0 kcal/mol. As apoproteínas de mamíferos que mergulham são significativamente mais estáveis do que as apoproteínas de mamíferos terrestres. Este fenômeno pode ser explicado pela suposição de que sob pressão seletiva um acúmulo de mutações que levam a pequenas estabilizações nas características globais de estabilidade das proteínas. Mamíferos que mergulham em grandes profundidades, como a baleia, são expostos a anaerobiose prolongada e conseqüente condições de acidose. Isto pode levar a uma série de acúmulos de mutações que promoverão resistência ao desenovelamento e a perda do grupo heme, fenômenos que podem ocorrer durante a acidose (Tang *et al.*, 1998). Os resultados deste trabalho indicaram que a propensão a formação de hélices é um componente importante para explicar as diferenças de estabilidade entre as mioglobinas de cavalo e de espermacete.

## ABSTRACT

The work in the literature on the stability and folding pathway of myoglobin is almost equally divided between horse myoglobin, which is available commercially, and sperm whale myoglobin, which must be cloned and expressed. The two proteins share high homology, show similar folding behavior and it is often assumed that all folding phenomena found with one protein will also be found with the other. This assumption may not be true, which makes essential to compare their basic properties, such as stability and dependence on temperature and salt concentration. However, no reliable method have been used to access the precisely difference in stability between these two proteins because it was not possible until recently to measure the stability of holoMb in a reversible unfolding-refolding reaction. The reversible folding of myoglobin can be measured by using the cyanmet derivative and urea unfolding but only in a limited pH range. We report data at equilibrium showing that horse myoglobin was 2.1 kcal/mol less stable than sperm whale myoglobin at pH 5.0, 25 °C, and aggregated at high concentrations as measured by gel filtration and analytical ultracentrifugation experiments. The higher stability of sperm whale myoglobin was identified for both apo and holo forms, and was independent of pH from 5 to 8 and of the presence of sodium chloride. We also show that the substitution of sperm whale myoglobin residues Ala15 and Ala74 to Gly, the residues found at positions 15 and 74 in horse myoglobin, decreased the stability by 1.0 kcal/mol, indicating that helix propensity is an important component of the explanation for the difference in stability between the two proteins.

## **1.INTRODUÇÃO:**

### **1.1 – O enovelamento de proteínas:**

Os estudos em biologia estrutural avançaram muito nos últimos anos e inúmeras informações, obtidas principalmente por dados cristalográficos, ajudaram no entendimento dos mecanismos de ação e efeito biológico de várias proteínas. É conhecido que, na maioria dos casos, toda a informação necessária para a formação da estrutura terciária de uma molécula protéica está codificada em sua seqüência primária de aminoácidos (Anfinsen & Sheraga, 1975). Efetivamente, existe um processo que se interpõe entre esse código da seqüência primária e a estrutura terciária ativa e funcional de uma proteína. Este fenômeno é conhecido como enovelamento de proteínas, caminhos ou etapas que a seqüência primária necessita para alcançar a estruturação terciária e a funcionalidade. A estrutura por si só não nos permite ver a ordem e a seqüência de eventos de um fenômeno como o enovelamento de proteínas. Portanto, desvendar as regras e os mecanismos da reação que levam à aquisição da estrutura tridimensional tornou-se fundamental para a ciência moderna. Uma descrição termodinâmica detalhada de proteínas é fundamental para se entender seu papel biológico e conhecer as interações e forças que determinam o enovelamento. Esta elucidação pode ser de grande valia, por exemplo, no desenho racional de proteínas, ou seja, a construção de moléculas com características de estabilidade e funções modificadas. Um dos complicadores desse entendimento é a pequena diferença de estabilidade (entre 5 e 15 Kcal.mol<sup>-1</sup>) que existe entre os estados nativo e

desenovelado de uma proteína com aproximadamente 150 resíduos. Essa variação está relacionada a inúmeras interações químicas que no seu conjunto tornam essa diferença de extrema importância para a diversidade funcional de biomoléculas.

Várias características podem contribuir nesse caminho, por exemplo, a hidrofobicidade que faz com que uma cadeia polipeptídica se estruture escondendo resíduos hidrofóbicos da água e as interações eletrostáticas que podem ajudar na manutenção da estabilidade final da molécula (Ramos *et al.*, 1999). Um outro tópico que precisa ser levado em consideração é a existência de estados intermediários entre o estado nativo e desenovelado, que em alguns casos, mas aparentemente não em todos, podem ser detectados e estudados. Estudos utilizando cinética rápida mostraram a presença desses intermediários na via de enovelamento de proteínas (Ikai & Tanford, 1971; Tsong *et al.*, 1971). A descoberta de intermediários tão compactos quanto a estrutura nativa (Dolgikh *et al.*, 1981) sugeriu que estes possuíam elementos de estrutura secundária semelhantes aos do estado enovelado, porém, poucos elementos de estrutura terciária (Kuwajima, 1989). A marcação de proteínas desenoveladas com  $^3\text{H}$  ou  $^2\text{H}$  seguida do monitoramento das substituições por  $^1\text{H}$ , utilizando Ressonância Magnética Nuclear, deram força à hipótese de intermediários na via de enovelamento (Schmid & Baldwin, 1979; Roder *et al.*, 1988; Udgaonkar & Baldwin, 1988). Outros trabalhos demonstraram a presença de intermediários nas vias de enovelamento de proteínas, sendo os mais clássicos os que identificaram o intermediário de apomioglobina em equilíbrio (Griko *et al.*, 1988) e por experimentos de cinética rápida (Jennings & Wright, 1993).



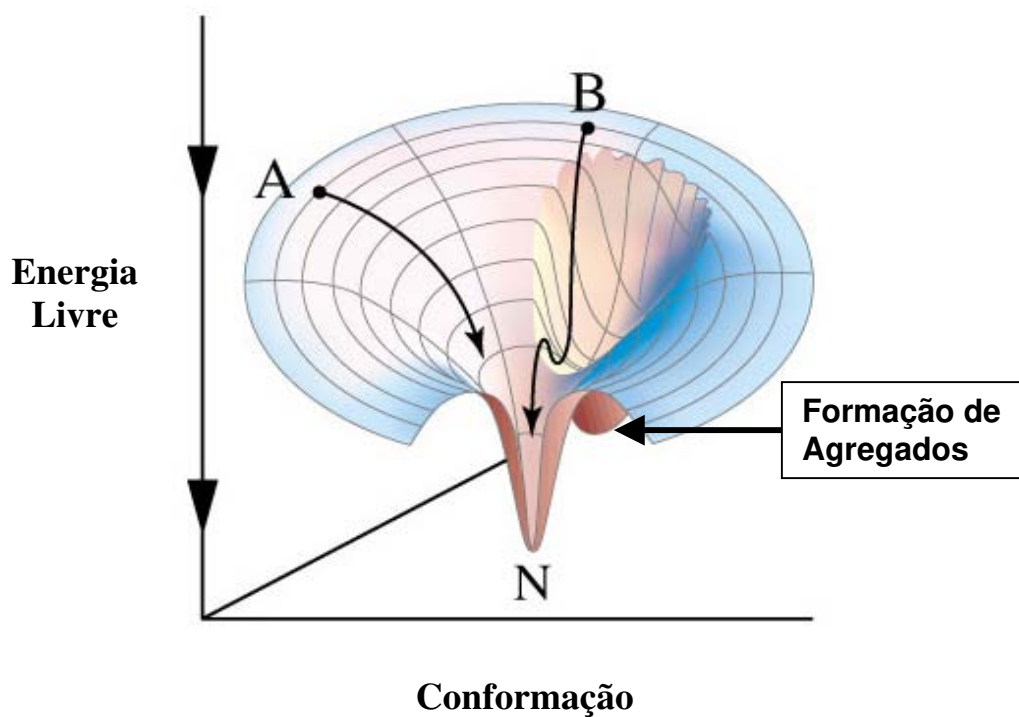
As vias de enovelamento com intermediários, segundo Ptitsyn (1991) seriam descritas em três passos: 1) formação muito rápida de estruturas secundárias; 2) formação rápida do intermediário ou 'molten globule' (o colapso da cadeia peptídica contendo estrutura secundária em um glóbulo compacto sem estrutura terciária rígida); 3) formação da estrutura protéica nativa. Vários modelos foram criados para explicar o enovelamento de proteínas, como por exemplo o modelo de enovelamento desenvolvido por Karplus & Weaver (1976) conhecido como modelo de difusão-colisão e o modelo hierárquico (Baldwin, 1989; Baldwin & Rose, 1999) onde elementos estruturais mais simples seriam formados inicialmente dando origem a elementos estruturais mais complexos, como ocorre com a apomioglobina (Wright & Baldwin, 2000). Outro modelo, conhecido como quebra-cabeças, foi proposto por Harrison & Durbin (1985), onde se propôs que o empacotamento de interações específicas, no interior das proteínas, seria o maior responsável pela estrutura das mesmas e as cadeias laterais se juntariam com alta complementaridade. Essa interpretação é consistente com estudos de evolução pois os resíduos mais conservados são aqueles encontrados no interior da proteína. Levitt & Warshel (1975) sugeriram que um colapso hidrofóbico seria o primeiro evento que ocorreria com uma cadeia polipeptídica antes da formação de qualquer estrutura. Uversky & Fink (2002) analisaram dados relacionados a 41 proteínas e, não encontrando intermediários que não tivessem estrutura secundária ou estruturas altamente ordenadas que não fossem compactas, concluíram que o colapso hidrofóbico ocorreria concomitantemente com a formação de estrutura secundária, o que foi também apoiado por dados de simulação (Kaya & Chan, 2002). Fersht (1997) sugeriu um modelo de nucleação-

condensação para descrever o enovelamento de proteínas. Este modelo propõe a formação de interações hidrofóbicas nativas no estado de transição que aumentariam a estabilidade das estruturas secundárias sendo formadas. Numa visão mais ampla deste modelo, Daggett & Fersht (2003) propuseram que ele conteria tanto os modelos seqüenciais quanto o modelo do colapso hidrofóbico.

Analisando os diversos estados envolvidos em um processo como o enovelamento podemos considerar que o estado desenovelado pode ter várias conformações, enquanto que o estado nativo é praticamente único. Em contrapartida, não há ainda uma concordância quanto a heterogeneidade do estado de transição (Shakhnovich, 1998) o que se assume é que como em uma reação o acúmulo de intermediários desacelera o processo (Creighton, 1995; Fersht, 1995). Por exemplo, alguns estudos de simulação mostram que o estado de transição pode ser composto de várias espécies diferentes (Bryngelson *et al.*, 1995). Mutações em regiões que fazem interações estabilizantes no estado de transição diminuem a velocidade do enovelamento, enquanto que mutações em regiões desordenadas no estado nativo têm menor efeito (Chiti *et al.*, 1999; Martinez & Serrano, 1999). A compreensão dessas variáveis é de extrema importância para se entender em que etapa do processo, por exemplo, uma alteração gênica pode causar uma doença devido ao comprometimento da estrutura ativa biologicamente.

Houve um grande avanço nessa direção e enfoque de estudo, ou seja, investigações sobre o efeito de alterações pontuais da seqüência primária de uma proteína em sua estabilidade e enovelamento. Este avanço ocorreu devido a utilização de mutações pontuais como, por exemplo, a técnica de duplo-mutante,

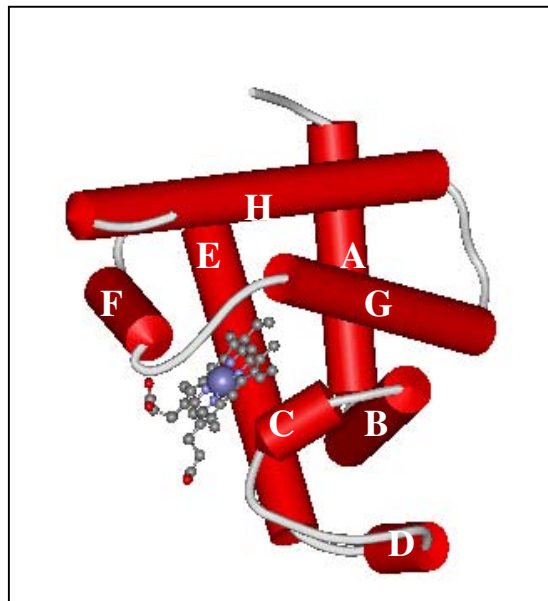
que consiste em mutar dois resíduos separadamente e depois alterá-los juntos na mesma proteína para comparar o efeito cumulativo das mutações (Carter *et al.*, 1984). Uma série de estudos experimentais, utilizando mutações sítio dirigidas, mostrou que a barreira energética do estado de transição é mais baixa e larga para proteínas do que para reações químicas comuns (Matouschek & Fersht, 1993; Milla *et al.*, 1995). Para se entender melhor essas barreiras a melhor representação que temos é a do funil rugoso do enovelamento de proteínas (Figura 1). Neste funil o topo representaria o vasto número de conformações com alta energia, ou seja, o estado desenovelado. Dessa forma, as proteínas se enovelariam como se descessem no funil e o número de conformações possíveis, assim como a quantidade de energia da molécula, decresceria até a saída do funil (estado enovelado e de menor energia). Esta conversão poderia ocorrer a partir de qualquer rota iniciando-se de qualquer lugar do funil. Algumas destas rotas podem ser lisas, enovelamento rápido do tipo ‘tudo ou nada’, ou rugosas e lentas apresentando intermediários (com barreiras energéticas variáveis). Estes intermediários seriam mínimos de energia locais que desacelerariam o enovelamento (Radford *et al.*, 1992). Algumas destas rotas poderiam levar a um ‘vale’ de baixa energia (diferente do estado enovelado) com uma barreira energética intransponível o que levaria, por exemplo, a formação de agregados e fibrilas. Os agregados irreversíveis seriam mínimos de energia com barreiras muito altas para serem vencidas.



**Figura 1. Representação esquemática de um funil rugoso para o enovelamento de proteínas.** A) representação do enovelamento de dois estados passando diretamente do estado desenovelado (topo do funil) para o estado nativo (N). B) representação do enovelamento passando por intermediários (barreira energética representada pela rugosidade).

## 1.2 – Globinas:

A família das globinas, proteínas que possuem o grupo prostético heme, pode servir como modelo para estudos comparativos por ser encontrada entre os mais variados organismos. Essas proteínas são globulares e possuem estrutura terciária básica composta de oito alfa-hélices (Figura 2) e apresentam alguns resíduos conservados, geralmente próximos ao local de ligação do grupo heme e outros resíduos distantes deste sítio (Bashford *et al*, 1987). A conservação de resíduos não funcionais tem sido correlacionada à própria conservação da via de enovelamento (Nishimura *et al*. 2000). Diversas teorias predizem que estruturas intermediárias estejam presentes na via de enovelamento das globinas.



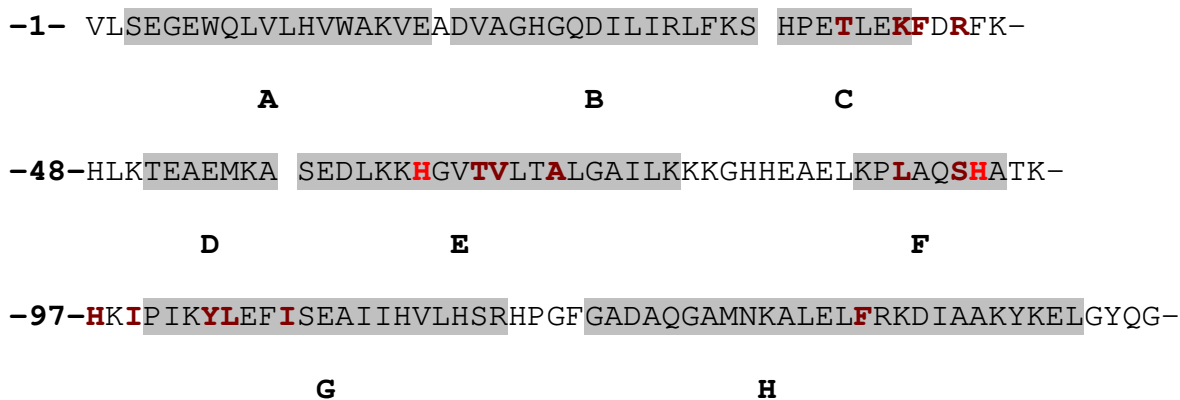
**Figura 2 – Estrutura da mioglobina selvagem de baleia (*Physeter catodon*).**

As  $\alpha$ -hélices que compõem a estrutura secundária da mioglobina estão nomeadas de A à H. O grupo heme está evidenciado pela cor cinza. O desenho foi obtido

através da modelagem da estrutura de mioglobina extraída do PDB (PDB, <http://www.rcsb.org/pdb>), código 5MBN, utilizando os recursos do programa *WebLab ViewerLite 3.7 (Molecular Simulations Inc)*.

### 1.2.1 – Mioglobinas:

A mioglobina (Mb), é uma hemoproteína de massa molecular de 17 kDa, monomérica que possui 8 alfa-hélices (nomeadas de A – H, Figura 2 e Figura 3 para a seqüência primária de mioglobina de espermacete) e encontrada abundantemente nos músculos de mamíferos possuindo a função de armazena-



**Figura 3 – Estrutura primária da mioglobina selvagem de baleia (*Physeter catodon*).** A estrutura primária da mioglobina está representada pelas letras códigos de cada aminoácido e os aminoácidos que formam as  $\alpha$ - hélices estão sombreados pela cor cinza. As hélices são nomeadas de A - H. Os resíduos destacados em vermelho mostram as histidinas 64 (distal) e 93 (proximal), respectivamente. Estes resíduos estão envolvidos na coordenação do grupo heme e constituem a quinta (His93) e a sexta (His64) posições de coordenação. Os demais resíduos que estão envolvidos na coordenação e na estabilidade da ligação do grupo heme estão destacados pela cor vinho (Hargrove *et al.*, 1996a). A estrutura e a via de enovelamento desta proteína são bem conhecidas (ver

revisões: Wright & Baldwin, 2000; Brunori, 2000; Wittenberg & Wittenberg, 2003). *In vivo*, sua função está associada à ligação reversível do oxigênio e também pode interagir com outros ligantes como CO<sub>2</sub>, NO, CO (Antonini & Brunori, 1971). A ligação da mioglobina ao oxigênio é feita através do grupo prostético heme (grupo heme), que consiste de uma protoporfirina (parte orgânica) e um átomo de Fe central (parte inorgânica). O átomo de Fe da heme está ligado a quatro átomos de nitrogênio no centro do anel protoporfirínico. Este Fe pode formar ligações, em cada plano do anel protoporfirínico, posições de coordenação de número 5 e 6. Dependendo do seu estado de oxidação, oxidado (+3) ou reduzido (+2), o sítio da sexta coordenação pode ficar desocupado ou ligado de forma reversível ao O<sub>2</sub>, CO, NO, aos isocianetos, CN<sup>-</sup>, N<sub>3</sub><sup>-</sup>, F<sup>-</sup>, SCN<sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> ou ao NO quando no estado Fe<sup>+3</sup> (Antonini & Brunori, 1971). As cadeias laterais do grupo heme, quando ligadas à molécula de mioglobina, estão na superfície da molécula e se encontram ionizadas em pH fisiológico (Hargrove & Olson, 1996). O átomo de Fe está diretamente ligado à histidina proximal (F8 – His93), que ocupa a quinta posição de coordenação. Este átomo de Fe está em torno de 0,3 Å fora do plano da porfirina na direção da His93. 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 é importante para a coordenação do heme (E7-His64). O aumento na quantidade de estrutura secundária da apomioglobina quando ocorre a ligação com o grupo heme e os baixos valores das constantes de dissociação desta ligação (na ordem de 10<sup>-12</sup> à 10<sup>-15</sup> M) implicam em um alto grau de especificidade deste processo (Hargrove *et al.*, 1996A).



A coordenação do heme à proteína produz, na solução, uma intensa coloração que está relacionada às transições dos orbitais moleculares porfirínicos. Estas transições são influenciadas pelo tipo de ligação que as porfirinas fazem com as proteínas, pelo estado de oxidação do Fe, pela ligação axial do Fe à proteína e pela cavidade de ligação ao grupo heme, que é dependente do enovelamento da proteína. Estes eventos são responsáveis pelas modificações no espectro de absorção das hemeproteínas, que é caracterizado pela presença de duas bandas de absorção. Uma banda é delimitada pelo intervalo entre 390 e 450 nm e é denominada de banda de Soret ou banda Q. A outra banda está no intervalo entre 450 e 700 nm e é denominada de banda visível ou bandas A e B. Estas características contribuem para que as bandas de absorção de coordenação do heme às hemeproteínas constituam sondas importantes que auxiliam no monitoramento de eventos ocorridos na estrutura destas proteínas, por exemplo, o enovelamento de suas cadeias polipeptídicas.

Existem evidências experimentais que suportam a hipótese de que as vias de enovelamento de proteínas homólogas foram conservadas durante a evolução (Lesk & Chothia, 1980; Bashford *et al.*, 1987; Hollecker & Creighton, 1983; Krebs *et al.*, 1983; Stackhouse *et al.*, 1988; Jaenicke, 1987; Plaxco *et al.*, 1997; Chiti, 1999; Riddle *et al.*, 1999; Martinez & Serrano, 1999). As mioglobinas possuem alguns resíduos funcionalmente importantes como a His proximal que se coordena ao Fe do heme, e outros resíduos distantes do local de coordenação mas que são ideais para investigação das vias de enovelamento (Bashford *et al.*, 1987; Ptitsyn & Ting, 1999). Foi proposto também que a conservação dos resíduos não

funcionais esteja relacionada com a conservação de etapas na via de enovelamento de globinas (Ptitsyn & Ting, 1999).

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 deste intermediário são: elipticidade molar de aproximadamente  $-14.000 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ , com estrutura nas hélices A, G e H e parte da B (Hughson *et al.*, 1990; Loh *et al.*, 1995; Eliezer *et al.*, 1998), triptofanos parcialmente expostos (Kirby e Steiner, 1970) e estrutura terciária menos compacta que a forma nativa (Eliezer *et al.*, 1995). Jennings & 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. A caracterização mais detalhada desse intermediário foi feita por experimentos de troca de deutério (Hughson *et al.*, 1990; Jennings & 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 & 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 (por exemplo, Kay *et al.*, 1999; Luo & Baldwin, 2001;

Sirangelo *et al.* 2002). 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). Outros trabalhos também sugerem a presença de dois intermediários na via de enovelamento desta proteína (Loh *et al.*, 1995; Kiefhaber & 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 (ácido tricloroacético) 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 & 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 na presença de uréia 1 M, levando-se à conclusão de 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  $I_b$ , com a hélice B total ou parcialmente formada, que seria a primeira a se desenovelar em presença de 0 a 1M uréia, onde apenas  $I_a$  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.

O trabalho na literatura sobre estabilidade e enovelamento de mioglobinas está dividido quase igualmente entre as mioglobinas de cavalo (mais detalhes em Gilmanshin *et al.*, 1997; Goto & Fink, 1994 e nas referências neles citadas) e de baleia (mais detalhes ver Barrick & Baldwin, 1993; Jennings & Wright, 1993 e referências neles citadas). Estas duas proteínas apresentam a via de enovelamento com fenômenos similares e o que se observa para uma das proteínas assume-se ocorrer também para outra. Esta suposição pode não ser verdadeira e diferenças fisiológicas podem ser encontradas, levando-se em conta o ambiente em que esses dois mamíferos vivem. A alta concentração celular ao qual a mioglobina de baleia é submetida, em condições fisiológicas, pode ter exercido algum efeito evolutivo nestas proteínas. Das evidências, como a maior resistência à pHs ácidos, podemos supor como uma resposta natural às situações de anaerobiose causadas pelo mergulho prolongado de mamíferos como a baleia (Noren & Williams, 2000). Como é conhecido, a alanina é um aminoácido com alta

propensão de para a formação de alfa hélice (Chreighton, 1996). A análise de resíduos da SwMb, comparados com a maioria das seqüências de mioglobina depositadas no banco de dados do NCBI mostra duas posições (uma no resíduo 15 da hélice A e outro no resíduo 74 da hélice E) que estão sempre ocupadas por resíduos de alanina, seja pelo menos em um ou então nos dois locais das seqüências de mioglobina de mamíferos mergulhadores. Outro fator de extrema relevância é que na HrMb essas posições são ocupadas por duas glicinas (Tabela 1).

**Tabela 1: Comparação dos resíduos não-idênticos das mioglobinas de cavalo e espermacete.**

| Nº  | HELICE | Hr  | SW  | NATUREZA DA SUBSTITUIÇÃO  | COMENTÁRIOS                  |
|-----|--------|-----|-----|---------------------------|------------------------------|
| 0   | NA     | -   | Met | -                         | Expressão                    |
| 1   | NA     | Gly | Val | Propensão a formar hélice | Não forma hélice; N-terminal |
| 4   | A      | Asp | Glu | Conservado                | Ponte salina em SW           |
| 9   | A      | Gln | Leu | -                         | Ponte salina em Hr           |
| 12  | A      | Asn | His | Carga                     |                              |
| 15  | A      | Gly | Ala | Propensão a formar hélice | C-cap da hélice              |
| 34  | B      | Thr | Lys | Carga                     |                              |
| 35  | B      | Gly | Ser | Propensão a formar hélice | Fim da helice                |
| 74  | E      | Gly | Ala | Propensão a formar hélice | C-cap da hélice              |
| 118 | G      | Lys | Arg | Conservado                | Ponte salina em SW           |
| 140 | H      | Asn | Lys | Carga                     |                              |

As apoproteínas de mamíferos que mergulham são significativamente mais estáveis do que as apoproteínas de mamíferos terrestres. Este fenômeno pode ser explicado pela suposição de que sob pressão seletiva um acúmulo de mutações que levam a pequenas estabilizações nas características globais de estabilidade das proteínas (Scott *et al.*, 2000). Mamíferos que mergulham em grandes profundidades, como a baleia, são expostos a anaerobiose prolongada e conseqüente condições de acidose (Kooyman & Ponganis, 1998; Snyder, 1983; Zapol *et al.*, 1979). Isto pode levar a uma série de acúmulos de mutações que promoverão resistência ao desenovelamento e a perda do grupo heme, fenômenos que podem ocorrer durante a acidose (Tang *et al.*, 1998). O conteúdo intracelular de mioglobina em uma baleia é 10 vezes maior que em mamíferos terrestres.

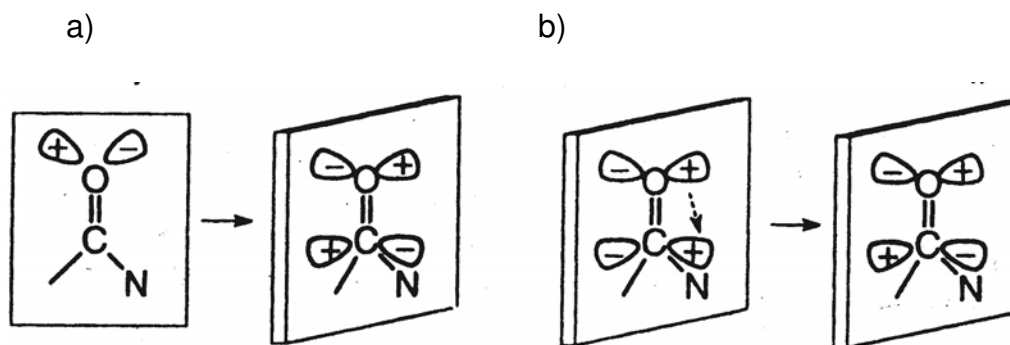
### **1.3.Técnicas biofísicas utilizadas para estudos de enovelamento e estabilidade:**

#### **1.3.1. Dicroísmo circular:**

As proteínas formam estruturas secundárias regulares devido a presença da unidade peptídica planar e rígida (  $O=C-N-$  ) com um alto grau de liberdade rotacional em relação ao resto da cadeia polipeptídica. Estas duas características limitam as orientações relativas possíveis dos resíduos vizinhos na cadeia deixando uma variedade de possíveis arranjos intramoleculares de ligações de hidrogênio entre o C-O de uma unidade peptídica e o N-H de outras unidades da cadeia. Como os aminoácidos que ocorrem naturalmente na maioria dos sistemas biológicos são quirais, a estrutura secundária formada por essas moléculas

apresenta, conseqüentemente, características quirais. O cromóforo peptídico (transições observadas na região do UV distante (180 a 240 nm) não possuem elétrons não-ligantes no O e no N e os elétrons- $\pi$  são deslocados através dos átomos de C, N e O.

A transição de menor energia no cromóforo peptídico é uma transição do tipo  $n \rightarrow \pi^*$  análoga a das cetonas, sendo a outra transição é do tipo  $\pi \rightarrow \pi^*$  (Figura 4). A primeira transição ocorre por volta de 210 a 230 nm (dependendo da extensão das ligações de hidrogênio). As transições  $\pi \rightarrow \pi^*$  ocorrem predominantemente devido as interações no orbital  $\pi$  do carbonil e são afetadas também pelo envolvimento de n no orbital  $\pi$ . Esta transição ocorre próxima da região entre o oxigênio e o nitrogênio e está centralizada em 190nm. Estes tipos de transições também podem ocorrer nas cadeias laterais e podem ser até mais fortes que os da unidade quiral. Entretanto, os cromóforos peptídicos são mais abundantes e as transições de cadeias laterais são quase impossíveis de se detectar. Mesmo assim, a presença dessas cadeias laterais pode atrapalhar, por exemplo, uma estimativa da porcentagem de estrutura secundária, especialmente em proteínas com baixo conteúdo de alfa hélice. O espectro de CD característico de alfa hélices é caracterizado por picos negativos de magnitudes similares em 222 (transições  $n \rightarrow \pi$ ) e 208 nm (parte das transições  $\pi \rightarrow \pi^*$ ).



**Figura 4. Ilustração das transições responsáveis pelo espectro de CD.**

a) transição  $n \rightarrow \pi^*$  ; b) transição  $\pi \rightarrow \pi^*$ .

Segundo a classificação das proteínas através da estrutura secundária, que foi proposta por Levitt & Chothia (1976) as proteínas são divididas em cinco classes baseadas na sua estrutura: 1) toda  $\alpha$  (principalmente  $\alpha$ -hélices), 2) toda  $\beta$  (principalmente folhas  $\beta$  pregueadas), 3)  $\alpha + \beta$  (regiões  $\alpha$  e  $\beta$  separadas), 4)  $\alpha/\beta$  (regiões com  $\alpha$  e  $\beta$  misturadas) e 5) randômica (predominantemente desordenada). Manavalan & 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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -hélices podem ser distinguidas de proteínas contendo alguma estrutura  $\beta$  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  $\alpha/\beta$  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  $\alpha/\beta$  são inversas.

Segundo a classificação das proteínas através da estrutura secundária, que foi proposta por Levitt & Chothia (1976), a mioglobina é uma proteína pertencente à classe 1, pois é formada principalmente por  $\alpha$ -hélices. Desta forma, as mudanças estruturais que possam ocorrer nesta proteína, quando submetida a variações (exemplo: variação de temperatura, de concentração de uréia ou de pH), podem ser facilmente monitoradas a partir da inspeção do espectro de CD, principalmente em 222 nm.

### **1.3.2. Calorimetria:**

Os estudos da energia envolvida em processos como a desnaturação podem ser diretamente realizados através da calorimetria. O princípio da técnica é a manutenção do equilíbrio térmico entre duas células revestidas por jaquetas adiabáticas. O equipamento de calorimetria de varredura diferencial (DSC) contém duas células: a célula de referência e a célula de amostra aquecidas sempre nas mesmas velocidades e têm suas temperaturas sempre igualadas. Neste processo de compensação de energia, o calorímetro detecta a diferença de energia elétrica aplicada na célula de amostra, que é proporcional a diferença de capacidade calorífica entre a mesma e a da referência, como função da temperatura, T. A diferença de energia elétrica é dada em watts e então convertida pelo aparelho em

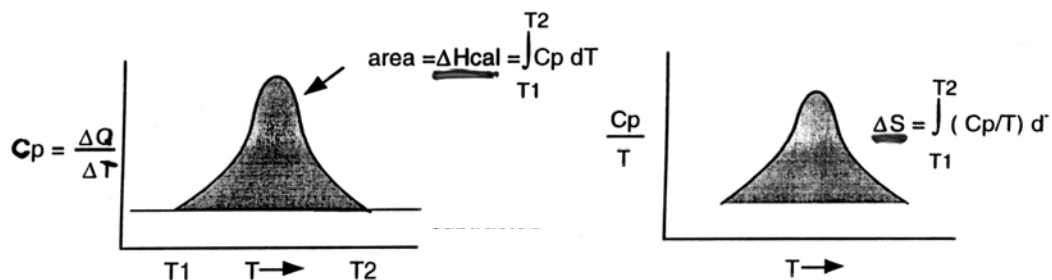
capacidade calorífica, Cp. Através da integração da curva de capacidade calorífica em função da temperatura pode-se obter a entalpia H e a entropia S envolvida no processo através das equações:

$$\Delta H_{cal} = \int Cp \, dT \quad (\text{Equação 1})$$

e

$$\Delta H_S = \int (Cp/T) \quad (\text{Equação 2})$$

O aumento de temperatura provoca o desenovelamento de uma proteína, este desenovelamento provoca uma variação da capacidade calorífica mensurável pelo DSC (figura 5). Se este desenovelamento for do tipo tudo ou nada e reversível, pode-se, através da integração do gráfico plotado da capacidade calorífica em função da temperatura, obter a entalpia e a entropia envolvida no processo de desenovelamento térmico da proteína. Deste modo, com os dados da variação de entalpia e entropia do sistema e com auxílio da equação de Van't Hoff ( $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ ) podemos determinar a energia livre do desenovelamento da proteína. Sendo que, a energia livre é uma importante parâmetro para quantificar e comparar a estabilidade de uma proteína (Santoro & Bolen, 1992). Outro parâmetro que é extraído do desenovelamento térmico por DSC é o  $T_m$  ( $T_m = \Delta H/\Delta S$ , quando  $\Delta G=0$ ) ou temperatura de transição, que é o pico máximo da fase de transição no desenovelamento. No  $T_m$ , obedecida as condições acima descritas, 50% das proteínas estão enoveladas e outros 50% encontram-se desenoveladas. Em uma análise de transição de dois estados existe o equilíbrio somente entre os estados nativo e desenovelado (Shnyrov *et.al.*, 1997).



**Figura 5. Microcalorimetria diferencial de varredura.** Na figura estão indicados os parâmetros termodinâmicos obtidos através da técnica.

Se ocorrer um processo exo ou endotérmico na célula da amostra, o aparelho detecta a diferença de calor entre as células e compensa esta diferença na célula de amostra. A diferença de compensação, em watts, constitui o sinal observado e que é convertido pelo equipamento.

A calorimetria de varredura diferencial (DSC) é usada para medir a  $\Delta C_p$  de um sistema submetido a um aumento contínuo de temperatura. O aparelho mantém a temperatura das células sempre iguais e neste processo de compensação de energia descrito acima, o aparelho detecta a energia liberada pelo sistema ocasionada pelo processo de desenovelamento das proteínas através de termosensores (termopares).

Uma vez coletadas essas informações e se o processo de desenovelamento for reversível, é possível, através da integração da curva de  $C_p$  em função da temperatura, obter a  $\Delta H$  e a  $\Delta S$  do processo de desenovelamento da proteína através das equações 1 e 2.

Deste modo, com os dados de  $\Delta H$  e  $\Delta S$  do sistema e com o auxílio da equação acima é possível medir a  $\Delta G$  de desenovelamento. Quando o desenovelamento térmico não for reversível essas análises não podem ser conclusivas sobre o processo pois podem envolver a energia relacionada com o rompimento de outras interações.

### 1.3.3.Ultracentrifugação analítica:

A técnica de ultracentrifugação analítica (UAL) pode ser utilizada para se obter a MM de uma molécula além de informações sobre processos como oligomerização. Informações sobre a termodinâmica de um sistema associativo também podem ser adquiridas, pois é possível obter a estequiometria e a constante de equilíbrio envolvida na interação entre as espécies moleculares (Lebowitz *et al.*, 2002). Em uma velocidade constante, uma partícula migra para o fundo do tubo pela ação da força centrífuga ( $F_c$ ). Durante a sua migração, a partícula sofre a ação de forças que retardam o seu progresso: força de empuxo ( $F_{emp}$ ) e da força friccional ( $F_f$ ). A  $F_{emp}$  depende unicamente da densidade do fluído ( $\rho_f$ ) e do volume do objeto em função da massa. A  $F_f$  é a força do atrito da partícula e é proporcional à velocidade  $v$  do objeto. Em uma situação de velocidade constante, estas forças se anulam:

$$F_c + F_{Emp} + F_f = \omega^2 rm + (-\omega^2 rm V_{bar} \rho_f) + (-fv) = 0 \quad (\text{Equação 3})$$

onde  $\omega$  é a velocidade angular;  $r$  é o raio;  $m$  é igual a massa do objeto;  $V_{bar}$  é o volume parcial específico da partícula;  $f$  é o coeficiente friccional e  $v$  é a

velocidade. O sinal negativo da  $F_{\text{emp}}$  e  $F_f$  indica que estas forças são contrárias à  $F_c$ .

A técnica de sedimentação em equilíbrio é baseada em princípios termodinâmicos, e através da utilização de baixas velocidades é possível produzir uma pequena sedimentação que contrapõem a força de sedimentação e a força de difusão da partícula. No estado de equilíbrio provocado pela lei da ação das massas, é possível obter informações sobre a massa molecular (de maneira independente da forma da partícula), sobre as constantes de afinidade e também da estequiometria do sistema associativo. A distribuição da proteína através da célula obtida nos experimentos de sedimentação em equilíbrio é ajustado pela equação 4.

$$C = C_0 \exp \left[ \frac{M(1 - \bar{V}\rho)\omega^2(r^2 - r_0^2)}{2RT} \right] \text{ (Equação 4)}$$

onde C é a concentração de proteína na posição r,  $C_0$  é a concentração da proteína na posição radial  $r_0$ , M é a massa molecular,  $\bar{V}$  é o volume parcial específico,  $\omega$  é a velocidade centrífuga angular, R é a constante dos gases e T é a temperatura absoluta.

## **2.OBJETIVOS**

Geral:

Estabelecer os parâmetros relativos a estabilidade e a via de enovelamento das mioglobinas de espermacete e de cavalo com o intuito de comparar a relação entre estes e a seqüência primária.

Específicos:

Medir a estabilidade das formas holo das proteínas na presença e ausência de cloreto de sódio e em diferentes pHs.

Medir a propensão a agregação das formas holo das proteínas.

Medir a estabilidade das formas apo das proteínas.

Medir o efeito de mutações na estabilidade das proteínas

### **3.MATERIAIS E MÉTODOS:**

#### **3.1. Linhagens de *Escherichia coli*:**

DH5 $\alpha$ , linhagem utilizada para a multiplicação e manutenção de vetores plasmidiais.

BL21(DE3), linhagem utilizada para a expressão de proteínas recombinantes. Possui níveis baixos de produção de proteases que poderiam degradar a proteína de interesse. Esta linhagem possui o gene DE3 que é responsável pela síntese da enzima T7 RNA polimerase e é controlado pelo promotor *lacUV5* que é ativado pela adição de agentes indutores como Lactose e IPTG.

BL21(DE3)pLysS, além das características anteriormente citadas para BL21(DE3), esta linhagem possui o plasmídeo pLysS que é responsável pela síntese de lisozima que age reduzindo os níveis de produção da T7 RNA polimerase que está envolvida na transcrição.

#### **3.2. Meios de cultura:**

TYM: meio de cultura para obtenção de bactérias competentes pelo método de transformação por PEG, composição: triptona 20 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 5,8 g/L e MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 2,5 g/L.

LB (Luria-Bertani): meio de cultura utilizado para o crescimento das cepas bacterianas na maioria das etapas, tais como: transformações, expressão de

proteínas e manutenção das colônias competentes em glicerol 15%. Composição: triptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L e NaCl 10 g/L. Para o meio sólido acrescenta-se 1,5% de ágar.

### **3.3. Transformação de bactérias:**

#### **3.3.1. Preparação de células competentes:**

Uma colônia isolada de *E. coli* da linhagem DH5 $\alpha$  foi inoculada em 5 ml de meio TYM a 37 °C por 16 h a 200 rpm. Em seguida este inóculo foi diluído 1:100 em 10 ml de meio TYM. A cultura de 10 ml permaneceu a 37 °C sob agitação (200 rpm) até atingir uma OD<sub>600</sub> de 0,4. Transferiu-se esta cultura para um novo frasco estéril contendo 40 ml de TYM. Esta cultura (50 ml) foi novamente crescida sob agitação de 200 rpm a 37 °C até atingir uma OD<sub>600</sub> de 0,5. Em seguida a cultura de 50 ml foi transferida para um novo meio TYM (200 ml) onde as colônias cresceram até atingir uma densidade ótica em comprimento de onda de 600 nm (OD<sub>600</sub>) igual a 0,6. A partir desta etapa resfriou-se a cultura imediatamente (8 min) e manteve-se as células sempre em banho de gelo. A cultura resfriada foi transferida para tubos (também resfriados a 4 °C) e centrifugada a 1500 xg durante 15 min a 4 °C. O precipitado de células foi ressuspensionado em 100 ml de TBF1, resfriado em banho de gelo e centrifugado a 1500 xg por 4 min a 4 °C em garrafas também resfriadas. O precipitado foi então ressuspensionado em 10 ml de TBF2 resfriados e as células aliqüotadas em microtubos de 500  $\mu$ l resfriados em banho de gelo (100  $\mu$ l de células em cada tubo). Essas alíquotas foram estocadas logo em seguida a -80 °C.



### **3.3.2.Transformação utilizando o método do PEG:**

As células competentes foram transformadas como descrito por Avi Levy (1991). Resumidamente, elas foram descongeladas e incubadas por 30 min em banho de gelo juntamente com 80 µl de Tampão de transformação e 20 µl da ligação contendo o DNA plasmidial de interesse. Após esse período deixou-se o tubo à temperatura ambiente por 10 min. Em seguida foi adicionado 1 ml de meio LB e seguiu-se com uma incubação a 37 °C sob agitação (200 rpm) durante 1h. Foram plaqueados 500 µL em meio LB com a adição do antibiótico de seleção do DNA plasmidial.

### **3.4.Extração de DNA plasmidial:**

A extração de DNA plasmidial foi realizada através do método de lise alcalina em pequena escala como descrito em Sambrook *et al* (1989). As colônias foram inoculadas em 5 ml de meio LB contendo o antibiótico adequado. A cultura foi crescida a 37 °C por 16 hs a 200 rpm e centrifugada por 5 min a 4000 xg. à temperatura ambiente. O precipitado de células foi ressuspendido por agitação vigorosa em 300 µl de STET (sacarose 8%, triton X-100 1%, EDTA 50 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 8,0). Em seguida foram adicionados 20 µl de solução de lisozima/RNase (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; lisozima 10 mg/ml, RNase) ao conteúdo do tubo. A solução foi misturada por inversão 6 vezes e incubada à temperatura ambiente durante 15 seg. Em seguida esta foi fervida durante 2 min e centrifugada a 10.000 xg durante 10 min à temperatura ambiente. O sobrenadante foi

transferido para um microtubo onde sofreu a adição de 325 µl de isopropanol. Em seguida este foi centrifugado a 10.000 xg por 5 min à temperatura ambiente. Após a remoção do isopropanol, o precipitado foi lavado com 1 ml de etanol 70%. Em seguida foi feita uma nova centrifugação a 10.000 xg durante 5 min à temperatura ambiente. O DNA foi ressuspenso em 50 µl de água estéril.

Para a obtenção de DNA plasmidial para as reações de seqüenciamento de DNA e transformações em cepas de expressão, utilizou-se kit de extração de DNA plasmidial Perfect prep (Eppendorf) segundo as especificações do fabricante.

### **3.5. Eletroforese:**

#### **3.5.1. Eletroforese em gel de agarose:**

As amostras de DNA foram submetidas, após a extração, à eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE (Tris-Borato 45mM, EDTA 1mM) a uma diferença de potencial de 60V durante 1h. A determinação da concentração de DNA foi feita através da comparação de intensidade de marcação com brometo de etídio (EtBr) das amostras de DNA, em relação à marcação com EtBr de um padrão de bandas de DNA ( $\lambda$ DNA/HindIII, GIBCO) que fornece uma estimativa da quantidade de massa de DNA contida na mesma. A intensidade das bandas do DNA foi então comparadas com esse padrão. Estas marcações foram visualizadas em gel de agarose 1%.

### **3.5.2.Eletroforese em gel de poliacrilamida:**

Gel de empacotamento: foram utilizados 1,4 ml de água, 330 µL da solução de acrilamida 29% com 1% de Bis-acrilamida, 250 µl de Tris-HCl 1 M (pH 6,8), 20 µl de SDS 10%, 20 µL de persulfato de amônio e 2 µl de TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamino).

Gel de resolução: foram utilizados 1,1 ml de água, 2,5 ml da solução de 29% de acrilamida com 1% de bis-acrilamida, 1,3 ml de Tris-HCl 1 M (pH 8,8), 50 µL de SDS 10%, 50 µL de persulfato de amônio e 2 µl de TEMED.

### **3.6.SDS-PAGE:**

As amostras coletadas submetidas à eletroforese foram diluídas em tampão de amostra para eletroforese (Tris-HCl 50 mM pH 6,8; DTT 100 mM; SDS 2%; azul de bromofenol 0,1% e glicerol 10%), fervidas durante 10 min e centrifugadas por 10 min em uma microcentrífuga Eppendorf à temperatura ambiente. A eletroforese das amostras, juntamente com um padrão de massa molecular (marcador de proteínas pré – corado, New England, BioLabs), foi realizada no aparato Mini-Protean II Dual Slab Cell (Bio-Rad), com gel de empilhamento de 5%, gel de separação 15% e voltagem constante de 200 V por 45 min.

O gel foi corado por 30 min em etanol: ácido acético: água 5:1:5 (v/v/v) e Coomassie Brilliant Blue R (Bio-Rad) 0,25% a 50 °C e descorado em ácido acético: etanol: água 3:2:3 (v/v/v) por 40 min a 50 °C.

### 3.7. Expressão de proteínas:

O vetor utilizado para a expressão das proteínas recombinantes foi o pT7-7. Este vetor de expressão está sob o controle do sistema T7 no qual o cDNA alvo é clonado sob o controle do promotor do gene 10 do bacteriófago T7 (Studier *et al.*, 1990). A expressão do cDNA alvo ocorre somente na presença da RNA polimerase do vírus T7, devido à especificidade do promotor. As cepas de bactérias utilizadas possuem, integrado ao seu genoma, o prófago do bacteriófago T7, que é lisogênico. Neste prófago, a expressão da T7 RNA polimerase está sob o controle do promotor lacUV5 do operon lac, que é mantido reprimido na presença de glicose e na ausência de seu indutor natural, a 1,6 aldolactose, um derivado da galactose (Studier *et al.*, 1990). O produto do gene *lac I* representa o repressor que, quando ligado ao operador O (presente no prófago do T7), impede a expressão da T7 RNA polimerase, não ocorrendo a transcrição do cDNA alvo. Porém, na presença de IPTG (isopropil-tiogalactopiranosídeo), que é um análogo do indutor natural (a 1,6-aldolactose), o repressor se desliga do operador liberando a expressão da T7 RNA polimerase do bacteriófago T7. Esta, por sua vez, atua na transcrição do cDNA alvo clonado no vetor do sistema pET. Como a T7 RNA polimerase é cinco vezes mais eficiente que a RNA polimerase da *E. coli* e é produzida em grandes quantidades. Em pouco tempo, praticamente, o único produto protéico sintetizado pela bactéria será aquele representado pelo cDNA alvo. Assim, na presença da RNA polimerase do bacteriófago T7, o cDNA alvo é altamente transcrito, resultando em grande quantidade do produto protéico.

O plasmídeo pT7-7 contendo o inserto desejado foi usado para transformar as bactérias *E. coli* das linhagens BL21(DE3). As bactérias transformadas foram

inoculadas em meio LB com agitação constante de 200 ciclos por minuto a 37°C. Quando a leitura espectrofotométrica de uma amostra do meio em OD<sub>600</sub> atingia o valor de 0,8, amostras da cultura bacteriana eram coletadas (1 ml) e o IPTG, na concentração final de 0,4 mM, era adicionado. Neste mesmo momento a temperatura foi aumentada para 42 °C com agitação constante de 180 rpm. As células foram mantidas nessas condições durante 5 h. Em seguida uma nova alíquota foi coletada (1 ml) e todo o restante do meio foi então centrifugado a 2.700 xg por 10 min, a 4 °C. As amostras coletadas antes da adição do IPTG e após as 5 h de indução foram submetidas á eletroforese (SDS-PAGE).

Os mutantes estudados nesta tese foram produzidos por outros membros do grupo (ver Publicação em anexo para as referências destas mutações).

### **3.8. Purificação de proteínas:**

#### **3.8.1. Lise bacteriana:**

As bactérias que expressaram as proteínas recombinantes foram lisadas com auxílio de uma prensa de French<sup>®</sup> em tampão de lise contendo Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 50 mM e EDTA 10 mM (15 ml/l de cultura) e centrifugadas a 17.700 xg, por 30 min, a 4 °C. Os corpos de inclusão, contendo a mioglobina de espermacete selvagem ou mutante, foram sedimentados e posteriormente ressuspensos (5 vezes) no tampão acima descrito. A verificação da presença destes corpos de inclusão foi feita por SDS-PAGE (Laemmli, 1970) das amostras provenientes da lise bacteriana.

### **3.8.2. Lise dos corpos de inclusão:**

Os corpos de inclusão com a mioglobina de espermacete assim como os mutantes foram solubilizados em 100 mM de Tris-HCl, 100 mM de KCl e 8M de Gdn-HCl, pH 8,0, na proporção de 15 ml de tampão para cada litro de cultura de bactéria induzida. Os corpos de inclusão solubilizados foram lentamente diluídos 2X sob agitação branda em Tris-HCl 50 mM pH 8,0. Esta solução, agora com o volume dobrado, foi dialisada a 4 °C contra 60 vezes seu volume em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,4, cuidando para que ocorresse 2 a 3 trocas de 2 l a cada duas horas e uma última troca de 4 a 6 L de tampão de diálise que foi mantida durante a noite (aproximadamente 12h). Após estas diálises, a amostra foi centrifugada a 22.000 xg por 15 min a 4 °C para a remoção da parte insolúvel. Foram coletadas alíquotas do sobrenadante e do precipitado análise por SDS-PAGE.

### **3.8.3.Cromatografia de troca iônica:**

Após a certificação feita por SDS-PAGE, de que a proteína estava presente em solução após a diálise, o sobrenadante foi submetido à cromatografia em uma coluna de troca aniônica DEAE-Sepharose (Fast Flow, Pharmacia Biotech®) equilibrada com o mesmo tampão utilizado na diálise após a solubilização. Após a passagem pela coluna e aplicação de um gradiente linear de 2M de NaCl, as amostras foram coletadas e submetidas à análise por SDS-PAGE. A fração contendo a proteína foi submetida à cromatografia de troca catiônica em coluna, CM-Sepharose (Fast Flow, Pharmacia Biotech®) equilibrada com o mesmo

tampão da etapa anterior. Aplicou-se novamente um gradiente linear de 2M de NaCl para a eluição da proteína.

Após o isolamento, a solução protéica foi dialisada contra 4 l de tampão acetato de sódio 10 mM pH 2,0 (corrigido com HCl) a 4 °C durante 12h. A proteína foi aplicada em uma coluna de troca catiônica CM-Sepharose (Fast Flow, Pharmacia Biotech) e eluída no gradiente de NaCl (0-2M) em tampão acetato de sódio 10mM pH 2,0, para eliminar a contaminação por ácidos nucléicos. Toda a purificação e a qualidade das amostras foram verificadas por SDS-PAGE (Laemmli, 1970). As proteínas foram dialisadas contra água (4 trocas de 1l a cada 1h e uma troca 12h de 4l) e utilizadas nos experimentos logo em seguida.

### **3.9. Análises espectroscópicas:**

#### **3.9.1. Soluções estoque e tampões:**

Para eliminar partículas que poderiam interferir nas leituras espectroscópicas, as soluções estoques foram filtradas utilizando-se filtros de 0,45 µm (Millipore). O pH das soluções foi conferido utilizando-se um pHmetro Orion modelo 420 A.

#### **3.9.2. Solução tampão para medida de concentração de proteínas:**

As amostras foram diluídas em tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 6,5) contendo Gmd-HCl na concentração final de 6 M. As soluções de cloreto de guanidina foram preparadas apenas na data de realização dos experimentos e suas concentrações foram aferidas em um refratômetro (Spectronic Instrument).

Os valores obtidos na leitura do refratômetro foram inseridos na equação abaixo (Pace, 1986):

$$M_{\text{GmdHCl}} = 57,147(\Delta N) + 38,68 (\Delta N)^2 - 91,60 (\Delta N)^3 \quad (\text{Equação 7})$$

Onde M é a molaridade do Gmd-HCl (moles/L) e  $\Delta N$  é a diferença entre o índice de refração do desnaturante e da água (ou tampão) obtida na leitura do refratômetro. No caso das determinações de concentrações nos comprimentos de onda da banda de Soret - heme proteínas - (423 nm) as amostras de proteínas foram diluídas em tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,0.

### **3.9.3. Solução tampão para desenovelamento ácido da forma apo:**

A variação de pH (7,4 a 3,0) necessária para o desenovelamento ácido foi obtida pela mistura de diferentes proporções de citrato de sódio e ácido cítrico 2 mM na presença de 30 mM NaCl. Para pH inferiores a 3,0 fez-se necessário à adição de concentrações crescentes de HCl a partir do ácido cítrico pH 3,0.

### **3.9.4. Solução tampão para desenovelamento químico da forma apo:**

Para a aquisição de espectro de absorbância e dicróico das proteínas em pH 7,8 foi utilizado o tampão MES 10mM. As soluções de uréia foram preparadas apenas na data de realização dos experimentos e suas concentrações foram aferidas em um refratômetro (Spectronic Instrument). Os valores obtidos na leitura do refratômetro foram inseridos na equação abaixo (Pace, 1986):



$$M_{\text{Uréia}} = 117,66(\Delta N) + 29,753 (\Delta N)^2 + 185,56 (\Delta N)^3 \quad (\text{Equação 8})$$

Onde M é a molaridade da uréia (moles/l) e  $\Delta N$  é a diferença entre o índice de refração do desnaturante e da água (ou tampão) obtida na leitura do refratômetro.

### 3.10.5.Determinação da concentração de proteínas:

As proteínas puras e liofilizadas foram solubilizadas em água deionizada e centrifugadas a 12.000 xg por 20 min à 4° C para remoção de possíveis agregados. A concentração de proteínas foi determinada espectroscopicamente através do método descrito por Edelhoch (1967) utilizando os seguintes comprimentos de onda: 282, 280, 279, 278, 276 nm. Os coeficientes a 282, 280, 279, 278, 276 nm foram calculados utilizando-se a seguinte equação abaixo:

$$\varepsilon(\lambda)(M^{-1}cm^{-1}) = n_{Trp} \times \varepsilon_{Trp} + n_{Tyr} \times \varepsilon_{Tyr} + n_{Cys} \times \varepsilon_{Cys} \quad (\text{Equação 9})$$

Onde,  $\varepsilon(\lambda)$  é o coeficiente de absorbância molar ( $M^{-1}cm^{-1}$ ) da proteína de interesse em um determinado comprimento de onda ( $\lambda$ );  $n_{Trp}$  - número de triptofanos da proteína;  $n_{Tyr}$  - número de tirosinas; e  $n_{Cys}$  é o número de cisteínas.  $\varepsilon_{Trp}$ ,  $\varepsilon_{Tyr}$  e  $\varepsilon_{Cys}$  são os coeficientes de absorbância molar do triptofano, da tirosina e da cisteína, respectivamente. Os valores dos coeficientes de absorbância molar destes aminoácidos variam com o comprimento de onda ( $\lambda$ ) (Pace e Schmid, 1997). As concentrações das proteínas foram determinadas utilizando os seguintes coeficientes de absorbância molar:

**Tabela 2. Coeficientes de absorbância molar para apoproteínas:**

| $\lambda$<br>(nm)                                              | 282   | 280   | 279   | 278   | 276   |
|----------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| $\epsilon$ apoMbSWwt<br>(mM <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> )  | 14,80 | 15,22 | 15,35 | 15,40 | 15,15 |
| $\epsilon$ apoMbHr wt<br>(mM <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> ) | 12,40 | 12,66 | 12,66 | 12,60 | 12,25 |

**Tabela 3. Coeficientes de absorbância molar para holoproteínas:**

| $\lambda$ (nm)       | $\epsilon$ MbSWwt (mM <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> ) | Heme (mM <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> ) |
|----------------------|---------------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| 423 (ciano-heme)     | 35                                                      | 109,7                                      |
| 414 (hemeproteína)   | 32,1                                                    | 97,2                                       |
| 409,5 (hemeproteína) | 31,2                                                    | 157                                        |

Os valores de  $\epsilon(\lambda)$  calculados para a proteína foram utilizados na equação de Beer – Lambert:

$$A = \epsilon \cdot l \cdot C \quad (\text{Equação 10})$$

Onde A é a absorbância; l, comprimento do caminho ótico em cm e C, concentração molar em M. A concentração molar determinada corresponde à média das concentrações encontradas para cada comprimentos de onda entre 276 e 282 nm. As leituras de absorbância, para cada comprimento de onda relacionado, foram realizadas em triplicada. As hemeproteínas foram utilizadas

nos experimentos somente quando a diferença entre as concentrações calculadas na região de Soret e a 280 nm era inferior a 10%.

### **3.9.6.Reação de ligação do grupo heme e cianoheme:**

#### **3.9.6.1.Preparação do grupo heme em solução :**

A solução de hemina foi preparada homogeneizando-se 5 a 10 mg de hemina bovina (MW= 652 g/mol) em 1 ml de NaOH 0,1 M a 4 °C. Esta solução foi usada no máximo três horas após a preparação devida a baixa estabilidade deste composto em solução.

#### **3.9.6. 2.Reação de ligação proteína – grupo heme:**

As apoproteínas foram diluídas para a concentração final de 20 – 50  $\mu\text{M}$  em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,0. A hemina foi titulada para uma relação final de 1:1,3 (proteína:hemina) e a solução mantida no gelo durante 2 h. A preparação das cianohemeproteínas foi feita adicionando-se KCN até a concentração final de 0,5 mM na reação de ligação preparada anteriormente. Esta solução foi mantida por mais 12 h na câmara fria (4 °C) e em seguida ultracentrifugada a 90.000 xg por 1 h. A ligação e coordenação do grupo heme foi monitorada através da correlação da leitura de absorbância a 280 nm ( $\epsilon_{280}$ = 35,0  $\text{mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ), e 423 nm ( $\epsilon_{423}$ = 109,7  $\text{mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ), realizadas em um espectrofotômetro UV/VIS modelo V-530 (JASCO) e cubetas de quartzo de 1 cm de caminho ótico. As amostras só foram utilizadas quando as diferenças entre as concentrações calculadas a 280 e 423 nm eram inferiores a 10%.

### 3.9.7. Espectros de dicroísmo circular (CD):

*Calibração do espectropolarímetro J-810 (JASCO):* a calibração deste aparelho foi realizada com uma substância padrão com alto grau de pureza, solúvel em água, de fácil manipulação, estável em solução e com uma boa amplitude de sinal dicróico. Foi utilizado o padrão d-10-Camphorsulfonato de amônio não higroscópico na preparação de uma solução 0,06%. Foi medido o espectro de CD na região de 350 a 250 nm em uma cubeta de 1cm. Em seguida o sinal foi comparado com o esperado para verificar se a leitura do espectro estava de acordo com a descrição do fabricante do aparelho.

Os espectros das proteínas foram medidos utilizando-se uma cubeta de quartzo de 1 cm x 1 cm de caminho ótico e proteínas na concentração final de 1-2  $\mu$ M em tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7,0 ou em água. Os programas utilizados para registro e tratamento dos dados foram o Spectra manager<sup>®</sup> (JASCO) e Origin<sup>®</sup> versão 6.0. A temperatura foi mantida através de um controlador de temperatura Peltier Type Control System PFD425S (JASCO). Os valores obtidos na leitura de CD (mdeg) a 222 nm, a 25 °C e acumuladas durante 300 s foram convertidos para elipticidade residual molar ( $[\theta]_{MRW}$ ) que é definida pela equação:

$$[\theta]_{MRW} = (\theta \times MW) / (c \times l \times n) \quad (\text{Equação 11})$$

Onde  $\theta$  é a elipticidade em graus, MW é a massa molecular da proteína (g), c é a concentração da proteína (mg/ml), l é o comprimento do caminho ótico (cm) e n o número de resíduos de aminoácidos da proteínas.

### **3.10. Experimentos de desenovelamento químico:**

Após a quantificação as proteínas foram submetidas a concentrações crescentes de uréia, que variaram de 0 a 9 M, através da diluição de um estoque de 10 M em tampão acetato 10 mM com 0,5 mM de KCN em pH 5,0, 5,5 e 6,0 para um volume final de 2 ml. O grau de desenovelamento à 25 °C foi monitorado através da leitura do máximo de absorbância na região de Soret (comprimento de onda de 423 nm) utilizando-se um espectrofotômetro UV/VIS modelo V-530 (JASCO) para monitorar a perda do heme. O desenovelamento também foi monitorado pela leitura no comprimento de onda de 222 nm no dicroísmo circular no espectropolarímetro J-810 (JASCO) para monitorar a perda de estrutura secundária. Foram usadas cubetas de quartzo de 1 cm x 1 cm de caminho ótico. Cada alíquota de proteína, em uma determinada concentração de desnaturante foi equilibrada por exatamente 1 h à 25 °C (uréia) antes das leituras.

### **3.11. Medidas da estabilidade de proteínas:**

As proteínas foram comparadas através da avaliação da variação de energia livre de seus desenovelamentos. A energia livre de desenovelamento das proteínas foram medidas seguindo-se a desnaturação em equilíbrio. As avaliações do desenovelamento foram feitas por espectroscopia de dicroísmo circular e absorbância e os cálculos foram feitos utilizando o programa Origin (Microcal).

### **3.12. Comparação da estabilidade: cálculo do $C_m$ e da variação de energia livre ( $\Delta G$ ).**

$C_m$  é a concentração de uréia na qual 50% das proteínas se encontram na forma nativa e 50 % na forma desenovelada.

Os cálculos das variações da energia livre ( $\Delta G^{\circ}_{N-D}$ ) foram feitos através do método de extrapolação linear utilizando os dados de pré e pós-transição de acordo com Santoro & Bolen (1988) para proteínas com o desenovelamento em dois estados e reversível.

Para tanto, considerou-se que a transição N (estado nativo)- D (estado desnaturado) pode ser descrita por um processo de dois estados. Ou seja:

$$f_N + f_D = 1 \quad (\text{Equação 12})$$

A partir daí utilizou-se a equação de Gibbs, que relaciona energia livre com a constante de equilíbrio:

$$\Delta G^{\circ} = -RT \ln K_{eq} \quad (\text{Equação 13})$$

Onde  $\Delta G$  é a variação de energia livre do processo, R é a constante de dos gases, T a temperatura absoluta e  $K_{eq}$  a constante de equilíbrio. Então, a fórmula da constante de equilíbrio será:

$$K_{eq} = f_D / f_N, \quad (\text{Equação 14})$$

para o desenovelamento do estado nativo.

Considerando o valor da sonda utilizada para seguir o desenovelamento como y teremos:

$$(y_N f_N) (y_D f_D) = y \quad (\text{Equação 15})$$

logo:

$$K_{eq} = y_N - y / y - y_D, \quad (\text{Equação 16})$$

Aplicando-se na equação de Gibbs temos a variação da energia livre em função de y para cada ponto dentro da zona de transição :

$$\Delta G_{obs} = -RT \ln y_N - y / y - y_D \quad (\text{Equação 17})$$

Tanto a pré-transição (N-estado enovelado) quanto a pós-transição (D-estado desenovelado) são descritas por equações de retas do tipo:

$$Y_N = mN[E] + N_0 \text{ e } Y_D = m[E] + D_0 \quad (\text{Equação 18})$$

onde Y é o valor da sonda em cada ponto, N<sub>0</sub> e D<sub>0</sub> representam o valor da sonda nos respectivos estados (intercepto) e m representa a inclinação da reta ou seja a dependência do valor da sonda em relação ao desnaturante E.

Estas equações podem ser extrapoladas para a zona de transição através da equação:

$$K_{obs} = (N - N_0) / (N_0 - D) \quad (\text{Equação 19})$$

Combinando estas equações temos que:

$$Y = [(Y_N + mN[E]) + (Y_D + m[E]) \times \exp(\Delta G_{H_2O}/RT + m[E]/RT)] / [1 + \exp(\Delta G_{H_2O}/RT + m[E]/RT)] \quad (\text{Equação 20})$$

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

Esta equação foi utilizada para ajustar as curvas de enovelamento para definir os parâmetros de  $\Delta G_{H_2O}$ , m e C<sub>m</sub>.

### 3.13. Calorimetria de varredura diferencial:

*Calibração elétrica (eixo Y):* a calibração do eixo y foi realizada através da dissipação de uma quantidade de energia conhecida (energia diferencial) por meio de uma resistência localizada na parede das células que foram preenchidas com

água. Dez graus após o início de uma varredura de 10 a 110 °C a 60 °C/h foi aplicado um pulso térmico de -10 mCal/min com a duração de 1.200s. O desvio da linha de base foi calculado pelo próprio programa VP-Viewer. Após as análises desses desvios (<1%) foi feita a calibração térmica.

*Calibração térmica (eixo X):* a calibração do eixo x foi realizada através da análise das temperaturas de transição de dois padrões de parafina selados em um tubo de metal. Estes padrões possuem transições bem definidas a 28,2 e 75,9 °C. Foi procedida uma varredura de 10 a 85 °C a 60 °C/h. Os picos de transição dos padrões foram utilizados para ajustar o aparelho através do próprio programa VP-Viewer.

*Desenovelamento térmico:* cada célula foi preenchida com 0,5 ml de tampão acetato 10 mM pH 5,0 + 0,5 mM cianeto de potássio. Para se obter as linhas de base, as células de amostra e de referência foram preenchidas com o mesmo tampão. Foram realizadas 10 varreduras de 25 a 95 °C na velocidade de aquecimento de 90 °C/hora. Em seguida foram aplicados 23 µM de cianoholomioglobina nas condições citadas acima, na célula de amostra e o mesmo tampão, o qual a proteína está diluída, na célula de referência. Os parâmetros experimentais foram: variação de temperatura 25 a 95 °C; 3 corridas; pré-corrida inicial de 1 hora e as seguintes pré-corridas com duração de 2 horas; pós-corrida 0h, velocidade de aquecimento 90 °C/h e velocidade de resfriamento 60 °C/h. O calorímetro utilizado para a realização dos experimentos foi o microcalorímetro de varredura diferencial modelo VP-DSC (Microcal).



### **3.14. Cromatografia em gel filtração:**

A cromatografia em gel filtração foi feita utilizando-se uma coluna Superdex 75 HR 10/30 (Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden) conectada a um sistema ÄKTA FPLC (Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden). Esta coluna foi equilibrada com tampão fosfato 50 mM pH 7,4. Foram aplicados 100  $\mu$ L das amostras de apo e de holomioglobinas na concentração final de 150  $\mu$ M sob um fluxo de 0,5 ml/min na temperatura ambiente. Para a calibração da coluna foi eluído um padrão de massas moleculares da Amersham Pharmacia, nas mesmas condições da proteína, contendo ribonucleaseA (13,7 kDa), ovalbumina (43 kDa), quimotripsinogênio A (25 kDa) e albumina (67 kDa). A partir dos volumes de eluição desse padrão foi construída a curva de calibração utilizada na estimativa da massa molecular das amostras.

### **3.15. Ultracentrifugação Analítica:**

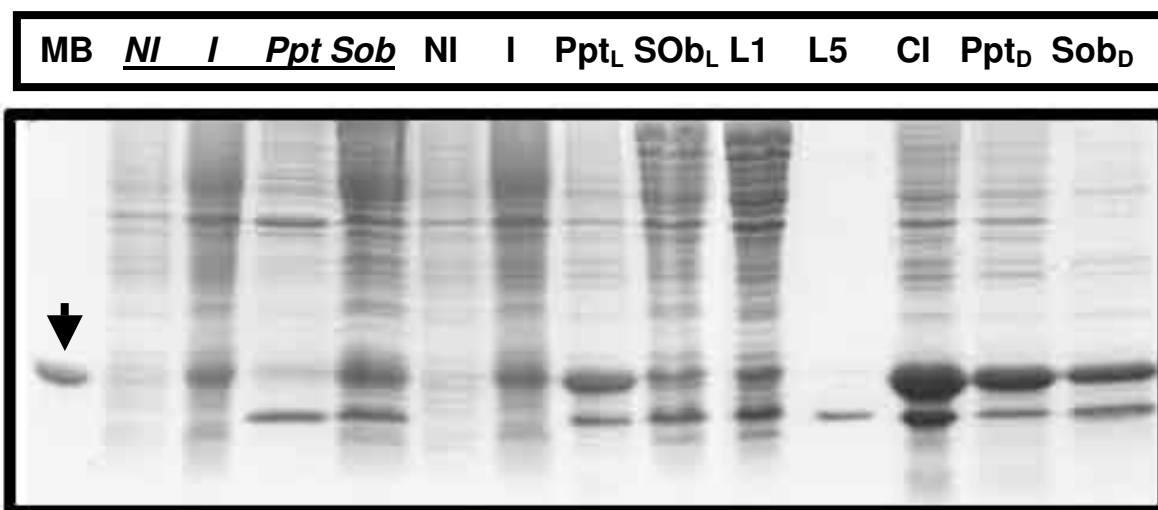
As análises de sedimentação em equilíbrio, foram feitas em uma ultracentrifuga analítica Beckman Optima XL-A (Beckman Coulter), em temperatura constante de 20 °C, utilizando o rotor AN-60Ti (Beckman Coulter) e coletando os dados nos comprimentos de onda de 280 nm e 423 nm. Os experimentos de sedimentação em equilíbrio das cianomioglobinas foram realizados em Tris-HCl 20 mM pH 7,2 com 50 mM NaCl. As amostras, nas concentrações de 3 a 40  $\mu$ M foram aceleradas a 9.000, 10.000 e 11.000 rpm. Foi utilizado o método de *Self-Association* para analisar os dados de sedimentação em equilíbrio utilizando diferentes modelos de associação para cada conjunto de dados utilizando o pacote de programa Origin (Microcal). A distribuição de proteína pela célula foi

ajustada pela equação 6 (Johnson, 1981; ver Introdução). O programa Sedinterp foi utilizado para estimar os valores de densidade e viscosidade do tampão e do  $\bar{V}$  (Mioglobina de baleia e mutantes=0,750 ml/g e mioglobina de cavalo=0,747 ml/g).

## 4. RESULTADOS:

### 4.1. Preparação e caracterização da SWMb:

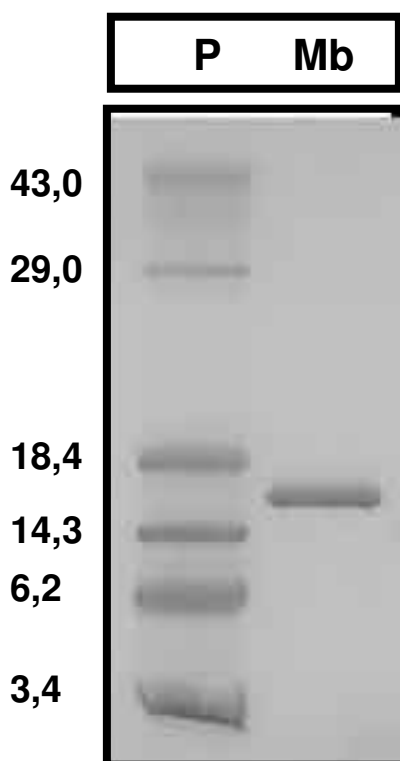
A mioglobina de baleia (~17 kDa) foi expressa em BL21(DE3) (Figura 6, linha I) e os corpos de inclusão produzidos durante esta expressão foram utilizados para a purificação desta proteína. Após a solubilização dos corpos de inclusão com tampão apropriado e posterior diálise, a proteína se manteve solúvel como pode ser observado na Figura 6 linha Sob<sub>d</sub>. Esta diálise reduziu também a quantidade de impurezas, o que facilitou o isolamento da molécula nas etapas posteriores de cromatografia de troca iônica.



**Figura 6. Expressão e etapas de purificação da mioglobina de baleia.** NI: amostra não induzida 37 °C; I: amostra induzida a 37 °C; Ppt: precipitado da lise a 37 °C; Sob: sobrenadante da lise a 37 °C; NI: amostra não induzida 42 °C; I: amostra induzida a 42 °C; Ppt<sub>L</sub>: precipitado da lise a 42 °C; Sob<sub>L</sub>: sobrenadante da

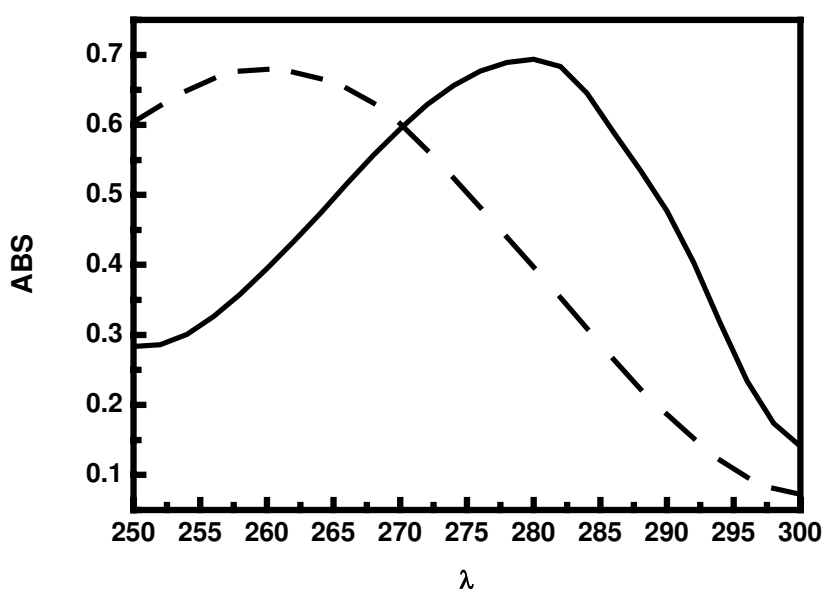
lise a 42 °C; L1: sobrenadante da primeira lavagem do corpo de inclusão; L5: sobrenadante da quinta lavagem do corpo de inclusão; CI: corpo de inclusão lisado; Ppt<sub>d</sub>: precipitado da diálise do corpo de inclusão solubilizado; Sob<sub>d</sub>: sobrenadante da diálise do corpo de inclusão solubilizado.

Após a passagem pela coluna de troca iônica, a proteína foi isolada com alto grau de pureza como pode ser observado na Figura 7. A concentração molar determinada para esta proteína foi de 130 µM. O rendimento desta purificação foi de aproximadamente 40 mg por litro de cultura de bactérias induzidas.



**Figura 7. Mioglobina de baleia purificada.** P: padrão de massa molecular (ver massa em kDa à esquerda); Mb: sobrenadante da diálise dos corpos de inclusão após passagem pela coluna DEAE Sepharose (mioglobina purificada).

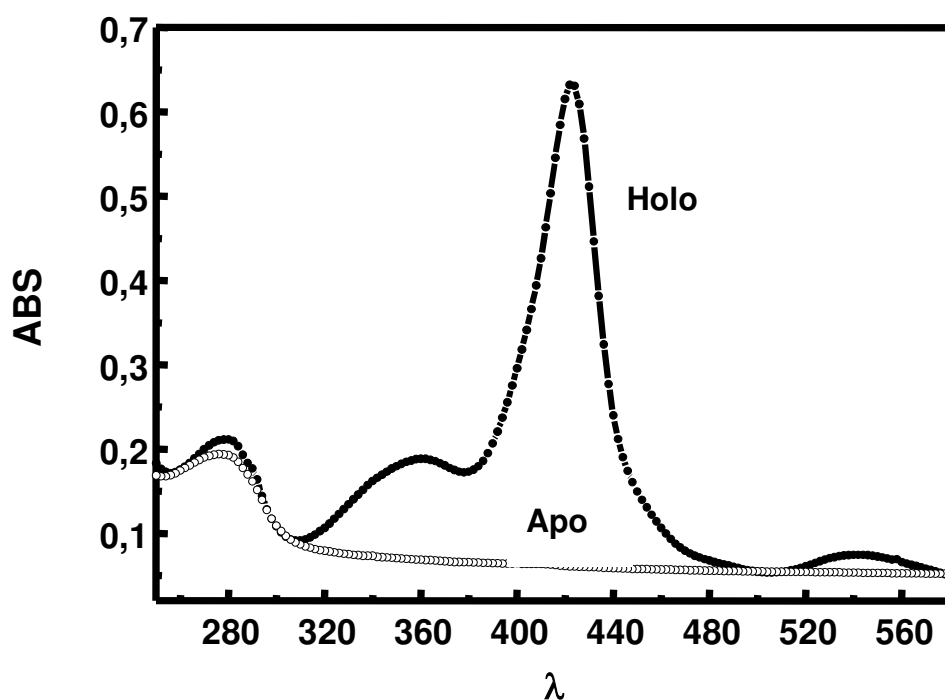
O espectro de absorção foi checado logo após a purificação para a verificação da quantidade de DNA contida na amostra protéica. Após a purificação, a proteína apresentou uma grande quantidade de ácidos nucleicos, o que pode ser verificado na Figura 8 (linha pontilhada) através do deslocamento do máximo de absorção para o comprimento de onda de 260nm.



**Figura 8. Espectro de absorção entre 250 e 280 nm.** A figura mostra os espectros de absorção da forma apo apresentando as regiões do triptofano (260-295 nm). Os espectros, que estão normalizados, evidenciam a presença de ácidos nucleicos antes da passagem pela cromatografia em pH 2,0 (linha pontilhada) e posterior eliminação dos mesmos através de cromatografia, o que pode ser evidenciado pelo do máximo de absorção em 280 nm (linha contínua). Um comportamento idêntico foi observado na purificação dos mutantes.

Logo após a purificação da amostra foi realizada uma cromatografia em troca iônica em pH2,0 para a eliminação dos ácidos nucleicos. A análise do espectro demonstrou a eficácia do método que pode ser avaliado pelo deslocamento do máximo de absorção para o comprimento de onda de 280 nm, observado na Figura 8 (linha contínua).

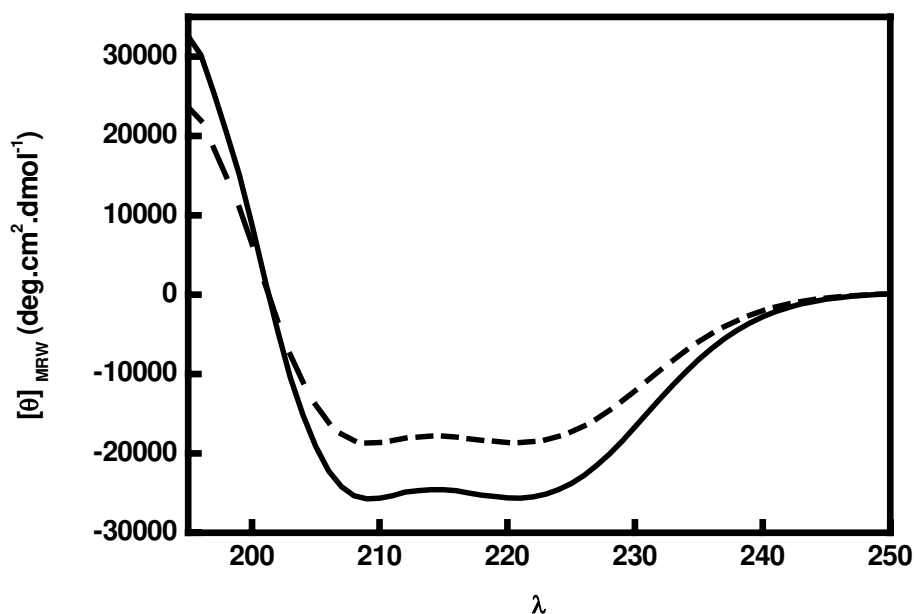
A amostra purificada foi submetida à ligação de cianoheme que se coordenou corretamente na proteína como pode ser verificado pela correlação entre os máximos de absorção nos comprimentos de onda em 280, 423 e 540nm (Figura 9).



**Figura 9. Espectro de absorção entre 250 e 600 nm.** A figura mostra os espectros de absorção da forma holo (CN<sup>-</sup>) apresentando as regiões do triptofano (260-295 nm) e da banda de Soret (390-450 nm) e da banda Q (500 a 600 nm) e

da forma apo apresentando as regiões do triptofano (260-295 nm). Os espectros evidenciam a ligação e a coordenação do grupo heme à proteína devido à intensa absorção nas bandas de Soret e Q.

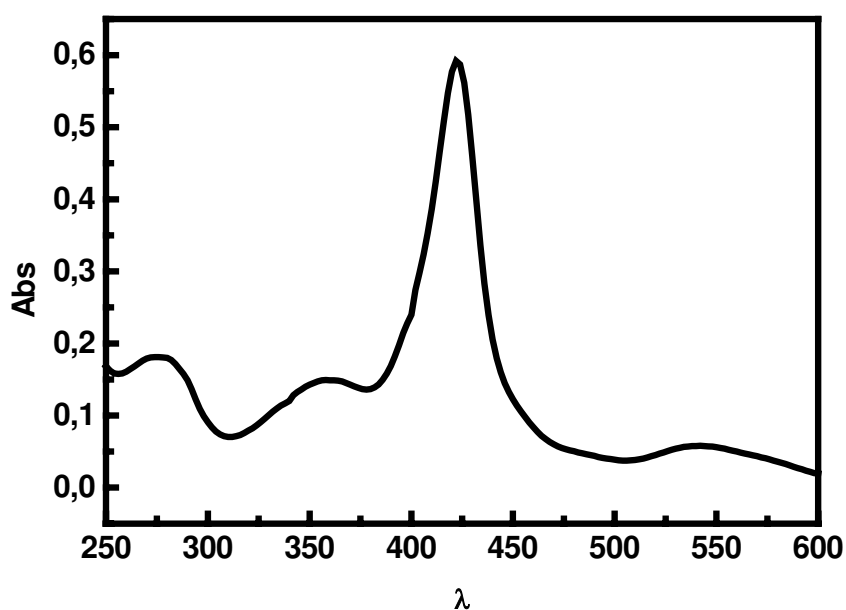
Os espectros de dicroísmo circular das formas apo e holo de SWMb estão mostrados na Figura 10. As proteínas estão enoveladas como demonstrado pelos mínimos em 208 e 222 nm. ApoMb apresentou  $[\Theta]_{222\text{nm}} = -19000 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$  e holoMb  $[\Theta]_{222\text{nm}} = -25000 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ .



**Figura 10 - Espectros de CD, entre 195 e 250 nm da mioglobina de baleia na forma apo (pontilhado) e holo (linha).** As proteínas foram diluídas para a concentração final de 2  $\mu\text{M}$  em tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7,2 a 25 °C.

#### 4.2. Preparação e caracterização de HrMb:

Foi checado o espectro de absorção da proteína de cavalo, antes de cada medida, para avaliar a ligação do grupo heme e de cianeto à proteína. Foi observado o deslocamento do espectro de absorção para o comprimento de onda de 423 nm característico da ligação do íon cianeto ao grupamento hemina (Figura 11.)

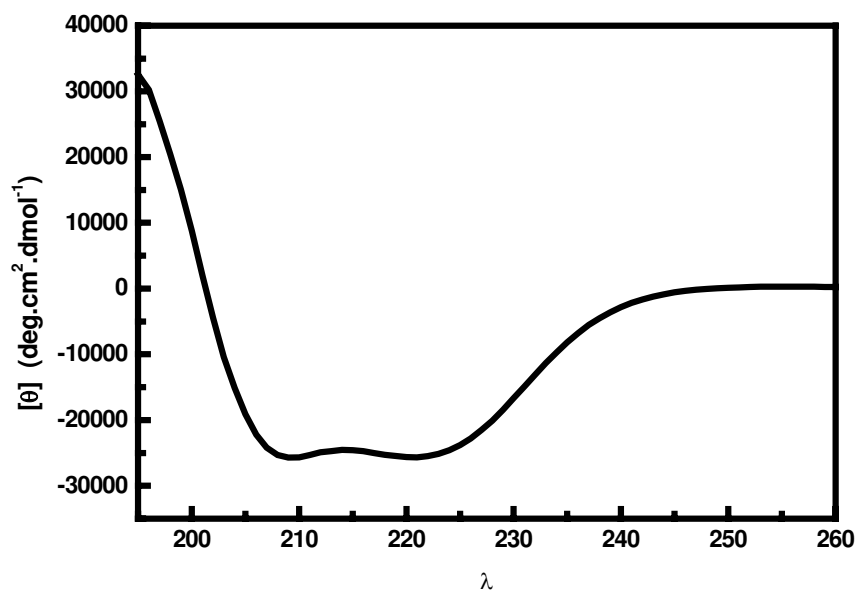


**Figura 11. Espectro de absorção entre 250 e 600 nm.** A figura mostra os espectros de absorção das formas holo com e sem  $\text{CN}^-$  apresentando as regiões do triptofano (260-295 nm) e da banda de Soret (390-450 nm). Os espectros evidenciam a coordenação do íon cianeto ao grupo heme das proteínas devido ao



deslocamento observado para o comprimento de onda de 423 nm após a adição do cianeto.

Foi checado o espectro dicróico da proteína de cavalo, antes de cada medida, para avaliar a elipticidade residual molar da proteína. Foram observados os máximos nos comprimentos de onda característicos de alfa hélices e  $[\Theta]_{222\text{nm}} = -24000 \text{ deg.cm}^2.\text{mol}^{-1}$  (Figura 12).



**Figura 12. Espectro de dicroísmo circular entre 195-260 nm.** A proteína foi diluída para a concentração final de 2  $\mu\text{M}$  em tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7,2 e os espectros adquiridos a 25 °C. Espectropolarímetro Jasco J-810 cubeta 1 cm x 1 cm.

### 4.3. Análise de Seqüências

Para compreender melhor esta diferença de estabilidade entre as mioglobinas de mamíferos mergulhadores e de mamíferos terrestres, nós analisamos a seqüência de aminoácidos disponíveis no Entrez/NCBI de diversos organismos em busca de quais eram os resíduos presentes nas posições 04, 20, 79 e 118, pois seriam resíduos com potencial envolvimento na formação de pontes salinas (Ramos *et al.*, 1999) e nas posições 15 e 74, ocupados por Ala na mioglobina de espermacete e por Gly na mioglobina de cavalo (Tabela 4).

**Tabela 4. Comparação do tipo de aminoácido presente em algumas posições na seqüência de aminoácidos de mioglobina de diversos mamíferos.**

| ORGANISMO                                                    | IDENTIFI<br>CAÇÃO<br>NCBI | POSI<br>ÇÃO<br>04 | POSI<br>ÇÃO<br>20 | POSI<br>ÇÃO<br>79 | POSI<br>ÇÃO<br>118 | POSI<br>ÇÃO<br>15 | POSI<br>ÇÃO<br>74 |
|--------------------------------------------------------------|---------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|
| <i>Espermacete</i><br>( <i>Physeter catodon</i> )            | <u>MYWHP</u>              | E                 | D                 | K                 | R                  | A                 | A                 |
| <i>espermacete dwarf</i><br>( <i>Kogia simus</i> )           | <u>MYWHW</u>              | E                 | D                 | K                 | R                  | A                 | A                 |
| <i>Baleia Goose beaked</i>                                   | <u>MYWHZ</u>              | E                 | D                 | K                 | R                  | A                 | G                 |
| <i>Baleia Hubb's beaked</i>                                  | <u>MYWHU</u>              | E                 | D                 | K                 | K                  | A                 | G                 |
| <i>Baleia Dall porpoise</i><br>( <i>Phocoenoides dalli</i> ) | <u>MYPED</u>              | E                 | D                 | K                 | R                  | G                 | G                 |
| <i>Baleia Harbor</i><br><i>porpoise</i>                      | <u>MYPE</u>               | E                 | D                 | K                 | R                  | G                 | G                 |
| <i>Baleia Finback</i>                                        | <u>MYWHF</u>              | D                 | D                 | K                 | R                  | A                 | G                 |
| <i>Baleia Minke</i>                                          | <u>MYWHK</u>              | D                 | D                 | K                 | R                  | A                 | G                 |
| <i>Baleia Humpback</i>                                       | <u>MYWHH</u>              | D                 | D                 | K                 | R                  | A                 | G                 |
| <i>Baleia California gray</i>                                | <u>MYWHC</u>              | D                 | D                 | K                 | R                  | A                 | G                 |
| <i>Baleia Pilot</i>                                          | <u>MYWHT</u>              | D                 | D                 | K                 | R                  | G                 | A                 |
| <i>Baleia Killer</i>                                         | <u>MYWHL</u>              | D                 | D                 | K                 | R                  | G                 | A                 |
| Golfinho Bottle-nose                                         | <u>MYDD</u>               | D                 | D                 | K                 | R                  | G                 | A                 |
| Golfinho Saddleback                                          | <u>MYDDBS</u>             | D                 | D                 | K                 | R                  | G                 | A                 |

|                                                   |                  |   |   |   |   |   |   |
|---------------------------------------------------|------------------|---|---|---|---|---|---|
| Golfinho Amazon                                   | <u>MYDDAR</u>    | D | D | K | R | G | G |
| Harbor seal                                       | <u>MYSLH</u>     | D | D | K | K | G | G |
| sealion                                           | <u>MYZC</u>      | D | D | K | K | G | G |
| Baikal seal                                       | <u>JN0344</u>    | D | D | K | K | G | G |
| river otter                                       | <u>MYOT</u>      | D | D | K | K | G | G |
| Halichoerus grypus<br>(gray seal)                 | <u>P02162</u>    | D | D | K | K | G | G |
| Cavalo                                            | <u>MYHO</u>      | D | D | K | K | G | G |
| <i>Bos taurus</i>                                 | <u>NP 776306</u> | D | D | K | K | G | G |
| <i>Mus musculus</i>                               | <u>NP 038621</u> | D | D | K | R | G | T |
| <i>Rattus norvegicus</i>                          | <u>NP 067599</u> | D | D | K | R | G | G |
| <i>Homo sapiens</i>                               | <u>NP 005359</u> | D | D | K | K | G | G |
| Macaco: <i>Symphalangus</i><br><i>syndactylus</i> | <u>A61366</u>    | D | D | K | K | G | G |
| Zebra                                             | <u>MYHOZ</u>     | D | D | K | K | G | G |
| Castor (European<br>beaver)                       | <u>JN0410</u>    | D | D | K | K | G | G |
| Morcedo (Bat-eared)                               | <u>MYFXBE</u>    | D | D | K | K | G | G |
| muskrat                                           | <u>PN0126</u>    | D | D | K | K | G | G |
| Veado                                             | <u>MYDE</u>      | D | D | K | K | G | G |
| Ovelha                                            | <u>MYSH</u>      | D | D | K | K | G | G |
| Elefante indiano                                  | <u>MYELI</u>     | D | D | K | K | G | G |
| Elefante africano                                 | <u>MYELA</u>     | D | D | K | K | G | G |
| Panda gigante                                     | <u>JC1086</u>    | D | D |   |   | A |   |
| Coelho (pika)                                     | <u>MYOI</u>      | D | D | K | K | G | G |
| Coelho (tentative)                                | <u>MYRB</u>      | D | D | K | K | G | A |
| <i>Lagostomus maximus</i><br>(roedor)             | <u>MYVJ</u>      | D | D | R | K | G | G |
| <i>Proechimys guairae</i><br>(roedor)             | <u>MYKS</u>      | D | D | K | K | G | G |
| ( <i>Ctenodactylus gundi</i> ,<br>Roedor)         | <u>MYRTNG</u>    | D | D | K | K | G | G |
| tamanduá                                          | <u>MYOY</u>      | D | D | K | K | G | G |
| cachorro                                          | <u>MYDG</u>      | D | D | K | K | G | G |
| (porco espinho)                                   | <u>MYHH</u>      | D | D | K | K | G | G |
| Macaco: <i>Aotes</i><br><i>trivirgatus</i>        | <u>MYMQN</u>     | D | D | K | K | G | G |
| chimpanzé                                         | <u>MYCZ</u>      | D | D | K | K | G | G |
| orangotango                                       | <u>MYOG</u>      | D | D | K | K | G | G |
| Porco: <i>Sus scrofa</i>                          | <u>P02189</u>    | D | D | K | K | G | G |

Vemos que 8 das 10 mioglobinas de baleia analisadas possuem Ala na posição 15 e 4 possuem Ala na posição 74, sendo que nenhuma possui simultaneamente Gly nas duas posições. A análise da sequência de aminoácido

de mamíferos que não são mergulhadores por longo períodos de tempo, golfinhos e mamíferos terrestres (37 espécies), mostra que 37 possuem Gly na posição 15 e 35 na posição 74. Estes dados reforçam a discussão descrita acima, de que estes resíduos são importantes para a estabilidade das mioglobinas de baleia frente as condições celulares a que estão submetidas.

Outro resíduo bastante conservado entre os mamíferos mergulhadores é a Arg na posição 118, presente na sequência de mioglobina de 9 das 10 baleias analisadas e em 5 dos golfinhos analisados. Os mamíferos terrestres possuem Lys nesta posição, um aminoácido com a mesma carga, mas de tamanho menor, o que em determinados caso pode desfavorecer a formação de uma ponte salina. Contudo, apesar das mutações nas posições 15, 74 e 118 alterarem a estabilidade da mioglobina de espermacete, elas não causaram um aumento na agregação nas condições aqui testadas.

#### **4.4.Outros resultados**

Os outros resultados estão inseridos no anexo apresentado a seguir:

Regis, W.C.B, Fattori, J., Santoro, M.M., Jamin, M., Ramos, C.H.I. (2005). On the difference in stability between horse and sperm whale myoglobins. *Arch. Biochem. Biophys.* **436**, 168-177.

Este anexo apresenta os resultados sobre o desenovelamento químico e térmico das mioglobinas de cavalo e espermacete e a caracterização destas proteínas quanto ao estado de oligomerização. Importantes discussões destes resultados e referências da literatura também podem ser consultadas neste anexo.

## On the difference in stability between horse and sperm whale myoglobins

William C.B. Regis <sup>a,b</sup>, Juliana Fattori <sup>a</sup>, Marcelo M. Santoro <sup>c</sup>, Marc Jamin <sup>d</sup>,  
Carlos H.I. Ramos <sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Centro de Biologia Molecular Estrutural, Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, P.O. Box 6192, ZIP Code 13084-971, Campinas SP, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas SP, Brazil

<sup>c</sup> Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte MG, Brazil

<sup>d</sup> Université Joseph Fourier, Grenoble, France

Received 9 December 2004, and in revised form 19 January 2005

### Abstract

The work in the literature on apomyoglobin is almost equally divided between horse and sperm whale myoglobins. The two proteins share high homology, show similar folding behavior, and it is often assumed that all folding phenomena found with one protein will also be found with the other. We report data at equilibrium showing that horse myoglobin was 2.1 kcal/mol less stable than sperm whale myoglobin at pH 5.0, and aggregated at high concentrations as measured by gel filtration and analytical ultracentrifugation experiments. The higher stability of sperm whale myoglobin was identified for both apo and holo forms, and was independent of pH from 5 to 8 and of the presence of sodium chloride. We also show that the substitution of sperm whale myoglobin residues Ala15 and Ala74 to Gly, the residues found at positions 15 and 74 in horse myoglobin, decreased the stability by 1.0 kcal/mol, indicating that helix propensity is an important component of the explanation for the difference in stability between the two proteins. © 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Protein stability; Protein folding; Myoglobin; Analytical ultracentrifugation;  $\alpha$ -Helix; Site-directed mutagenesis

A main question regarding the expression of the genetic code is how a polypeptide chain folds into its native conformation, which is known as the protein folding problem [1–4]. The complete understanding of this process may require the complete characterization of all the species present during folding: the unfolded state, the partially folded intermediate(s), and the native folded state. Therefore, the study of the forces that stabilize the native state is of great importance to understand protein folding and is relevant to provide insights into the determination of tertiary structure from amino acid sequence and into the mechanistic principles of the so-called misfolding diseases. The understanding of protein folding and stability has always relied on

the study of model proteins, and myoglobin (Mb),<sup>1</sup> a small and compact globular protein formed by eight  $\alpha$ -helices named A–H [5], is one of the most studied among them ([6–8] and references therein). Nuclear magnetic resonance studies [9–11] showed that apoMb, Mb without the heme group, is structurally similar to the holoMb, except for an unfolded F-helix. The urea-induced unfolding profile of apoMb populates an intermediate at about pH 4 [12], which is formed by a A[B]GH core. This core comprehends helices A, G,

<sup>1</sup> Abbreviations used: Mb, myoglobin; SW, sperm whale; WT, wild-type; CD, circular dichroism; DSC, differential scanning calorimetry; SEC, size exclusion chromatography; AUC, analytical ultracentrifugation;  $C_m$ , urea concentration at the midpoint of unfolding;  $\Delta G_{\text{fold}}$ , free energy of unfolding;  $\Delta\Delta G_{\text{fold}}$ , the difference in stability compared to the WT SW Mb.

\* Corresponding author. Fax: +55 19 3512 1006.

E-mail address: [crmos@fzns.br](mailto:crmos@fzns.br) (C.H.I. Ramos).

and H, which are well structured, and a partially folded helix B [13,14].

The work in the literature on the stability and folding pathway of Mb is almost equally divided between horse Mb (e.g., [15–17] and references therein), which is available commercially, and sperm whale (SW) Mb (e.g., [18,19] and references therein), which must be cloned and expressed [20,21]. The two proteins share high homology (Fig. 1), show similar folding behavior, and it is often assumed that all folding phenomena found with one protein will also be found with the other. This assumption may not be true, which makes essential to compare their basic properties, such as stability and dependence on temperature and salt concentration. However, no reliable methods have been used to access the precise difference in stability between these two proteins because it was not possible until recently to measure the stability of holoMb in a reversible unfolding–refolding reaction. Ramos et al. [22] discovered that reversible folding can be measured by using the cyanomet derivative and urea unfolding but only in a limited pH range. We measured the difference in the free energy of the SW and horse cyanometMb, and we report here on the stability of these two proteins in equilibrium. We also used site-directed mutagenesis to investigate the effect of mutations on the stability of SW Mb.

## Materials and methods

### Myoglobin amino acid sequences library

The amino acid sequences of Mb from several organisms were downloaded from the Entrez/NCBI databank



Fig. 1. Sequencing alignment of sperm whale (SW) and horse (Hr) Mb. The amino acid residues are represented by one letter code. SW Mb has methionine at position 0 that is needed for expression in an *Escherichia coli* system. Helices A–H are shown (according to [5]). Nonconserved residues are shown in italic and residues which mutation were studied in this work are underlined.

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/>): (1) Whales: sperm whale, MYWHP; dwarf sperm whale, MYWHW; goose beaked whale, MYWHZ; hubb's beaked whale, MYWHU; finback whale, MYWHF; minke whale, MYWHK; humpback whale, MYWHH; California gray whale, MYWHC. (2) Porpoises and dolphins: dall porpoise, MYPED; harbor porpoise, MYPE; bottle-nose dolphin, MYDD; saddleback dolphin, MYDDBS; Amazon dolphin, MYDDAR. (3) Other mammals (most terrestrial): horse, MYHO; *Bos taurus*, NP\_776306; *Mus musculus*, NP\_038621; *Rattus norvegicus*, NP\_067599; *Homo sapiens*, NP\_005359; ape, A61366; *Common zebra*, MYHOZ; muskrat, PN0126; deer, MYDE; sheep, MYSH; Indian elephant, MYELE; African elephant, MYELA; pika, MYOI; rabbit, MYRB; *Lagostomus maximus*, MYVJ; *Proechimys guirae*, MYKS; *Ctenodactylus gaudi*, MYRTNG; aardvark, MYOY; dog, MYDG; hedgehog, MYHH; *Aotes trivirgatus*, MYMQN; chimpanzee, MYCZ; orangotango, MYOG; pig, P02189; bat-eared fox, MYFXBE; *European beaver*, JN0410; river otter, MYOT; harbor seal, MYSLH; sealion, MYZC; Baikal seal, JN0344; gray seal, P02162.

### Site-directed mutagenesis and protein purification

Horse Mb was purchased from Sigma. The procedures for site-directed mutagenesis of SW apoMb were performed as described elsewhere [21,22]. Briefly, the SW Mb double-mutant A15G/A74G was created by PCR methodology using the forward primer 5'TGAATGGCA GCTGGTTCTGAGTGTTGGGGA AAA3', which replaces the Ala15 codon for a Gly codon, and the reverse primer 5'TTTTTTCTTAAGGATTCCACCTAGGGC AGTCAACAC3', which replaces the Ala74 codon for a Gly codon. The PCR product was then double-digested with the restriction enzymes *PvuII* and *AflIII*, and cloned into the pT7-7Mb vector [21] previously double-digested with the same enzymes. The correct cloning and sequence were confirmed by DNA sequencing. Other SW Mb mutants are described elsewhere (E04A and R118A in [22] and K140A in [23]). The expression and purification of the SW Mb in the apo form were performed as described elsewhere [21] followed by a chromatographic step for removal of nucleic acid contamination to certify that  $A_{280}/A_{410}$  ratio >1.5 [24]. All chemicals used for protein expression, purification, and analyses were of analytical grade. The purity of the proteins was evaluated by SDS-PAGE [25] and apoMb concentration was determined spectrophotometrically as previously described [26,27]. The holoMb was prepared by adding hemin to the protein in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 6.0, and cyanoholoMb was prepared from holoMb by adding KCN [22] followed by a gel chromatograph step to eliminate unbound forms. The formation of oxidized and cyanide holoMb was monitored by absorbance at the Soret band and the holoMb concentration was calculated as previously



described [28]. A cyanoMb preparation was used if the concentrations calculated at  $A_{280}$  ( $\epsilon_{280} = 35.0 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) and at  $A_{423}$  ( $\epsilon_{423} = 109.7 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) varied by less than 10%.

#### Size exclusion chromatography

SEC was performed with a Superdex 75 HR prep grade column coupled to an HPLC system (Amersham-Pharmacia, Uppsala, Sweden) equilibrated with 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, with 1 mM KCN, and a flow rate of 0.5 ml/min. The elution profile was determined by monitoring the absorbance at 280, 423, and 540 nm. The apparent molecular mass was calculated using a plot of  $\ln$  of the molecular mass (kDa) of standard proteins (bovine pancreas ribonuclease A1, 13,700 Da; chymotrypsinogen A, 25,000 Da; bovine serum albumin, 67,000 Da) as a function of the retention time. The fraction corresponding to single species of each Mb purified as described above was let to sit for seven days in Eppendorf tubes at concentrations from 3 to 200  $\mu\text{M}$  and at 20 °C either for a second round of SEC experiments, at conditions described above, or for AUC experiments, at conditions described below, to determine protein homogeneity. In our experience, WT SW Mb does not aggregate even after a month at these conditions.

#### Spectroscopic experiments

A JASCO model J-810 CD spectropolarimeter equipped with a thermoelectric sample temperature controller (Peltier system) was used to record the CD spectra using experimental conditions previously described [22]. The data were collected from 260 to 200 nm and accumulated 10 times for spectral measurements, and at 222 nm for stability measurements. The plotted CD signal at 222 nm was collected at 25 °C and was the average of 300 s recordings. All measurements were made in cuvettes with a 1 cm pathlength and with protein concentration of 1–2  $\mu\text{M}$ . Absorbance measurements were performed with a Jasco model 530 UV-Vis spectrophotometer using a 1 cm  $\times$  1 cm quartz cell, with 1–4  $\mu\text{M}$  protein concentration, and at 25 °C.

#### Unfolding experiments

Urea-induced unfolding of apoMb was studied at 4 °C using 10 mM Mes buffer, pH 7.8, with 20 min equilibration, and urea-induced unfolding of cyanoMb was performed as described elsewhere [22]. The urea solutions were prepared freshly and their concentration in solution was measured using the refractive index [29]. ApoMb unfolding induced by pH was studied at 4 °C in 5 mM citrate buffer, with 20 min equilibration, and the pH of each sample was confirmed before and after the experiment. The average of at least three unfolding

experiments was used to build each curve profile and the cyanoMb urea-induced unfolding curves were fitted to a two-state equation [30]. The heat denaturation of SW and horse cyanoMbs was studied microcalorimetrically using a MicroCal Ultrasensitive VP-DSC apparatus and standard software for data acquisition and analysis. The proteins, 20  $\mu\text{M}$ , in 10 mM acetate buffer, pH 5.0, with 0.1 mM KCN, were degassed for 30 min before loading into the calorimeter. The scans were recorded at scan rates of 30, 60, and 90 °C/h with no observable difference between them, and refolding was not reversible. The data obtained were subtracted from a baseline of buffer against buffer before normalization of the protein concentration. Curve fitting was carried out using Origin (Microcal) and unless stated otherwise the experimental errors were less than 5%.

#### Analytical ultracentrifugation

AUC sedimentation equilibrium experiments were performed with a Beckman Optima XL-A analytical ultracentrifuge. The cyanoMbs were tested at concentrations from 3 to 40  $\mu\text{M}$  in 20 mM Tris-HCl, pH 7.2, and 50 mM NaCl, at 20 °C, with speeds of 9000, 10,000, and 11,000 rpm (AN-60Ti rotor), and scan data acquisition at 280 and 423 nm for high and low protein concentrations, respectively. Analysis of the data involved the fitting of a model of absorbance versus cell radius data using nonlinear regression. All fittings were performed using the Origin software package (Microcal) supplied with the instrument. The Self-Association method was used to analyze the sedimentation equilibrium experiments using several models of association to fit the data. The distribution of the protein throughout the cell, obtained in the equilibrium sedimentation experiments, was fitted with the following equation [31]:

$$C = C_0 \exp \left[ \frac{M(1 - V_{\text{sw}}\rho)\omega^2(r^2 - r_0^2)}{2RT} \right], \quad (1)$$

where  $C$  is the protein concentration at radial position  $r$ ,  $C_0$  is the protein concentration at radial position  $r_0$ ,  $M$  is the molecular mass,  $V_{\text{sw}}$  is the partial specific volume,  $\omega$  is the centrifugal angular velocity,  $R$  is the gas constant, and  $T$  is the absolute temperature. The Sednterp software ([www.jphilo.mailway.com/download.htm](http://www.jphilo.mailway.com/download.htm)) was used to estimate each protein partial specific volume at 20 °C (SW Mb WT and mutants = 0.750 ml/g, horse Mb = 0.747 ml/g), the buffer density and the buffer viscosity.

## Results

#### Stability measurements of the apoMbs

The purity and folding of the proteins were confirmed by SDS-PAGE and CD, respectively (data not shown).

The stabilities of the apoMb were studied to investigate whether or not the difference in stability was related to heme binding. Neither the urea-induced unfolding at pH 7.8 nor the acid-induced unfolding of apoMb, Mb without heme bound, follows a two-state transition as showed by either loss of the sigmoidal unfolding profile or dissimilarity among the transition curves followed by different probes [12,22]. However, the urea concentration or the pH value at the middle of the transition can be used to compare the stability of SW and horse apoMbs. At pH 7.8, SW apoMb started to unfold at about 2.6 M urea with complete denaturation at about 4.7 M urea (Fig. 2) and horse apoMb started to unfold at about 2.1 M urea with complete denaturation at about 4.2 M urea (Fig. 2). The urea concentration at the middle of the transition was 3.4 M for SW apoMb and 2.7 M for horse apoMb (Table 1). SW apoMb was also more resistant to the acid-induced unfolding than Hr apoMb (Fig. 3); the midpoint of the acid-induced transition from native to intermediate was 4.8 for SW apoMb and 5.3 for horse apoMb (Table 1). Together, these results showed that the higher stability of the SW Mb is a phenomenon that occurs whether the protein is bound to heme or not, indicating that the source of the difference in stability is connected to the primary sequence.

#### Stability measurements of the cyanoMbs

The urea-induced unfolding of the cyanoMbs at pH 5.0 was two-state and more than 90% reversible, and showed that horse cyanoMb unfolded in a lower urea concentration than SW cyanoMb (Fig. 4). At pH 5.0, the  $C_m$  for horse Mb was equal to 2.9 M whilst the  $C_m$  for SW Mb was equal to 4.2 M (Fig. 4 and Table 2).

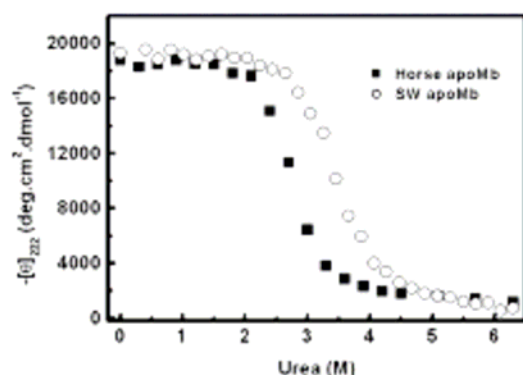


Fig. 2. Urea-induced unfolding of sperm whale (SW, circles) and horse (squares) apoMbs followed by circular dichroism at 222 nm. The urea-induced unfolding curves are the average of at least three independent experiments at 10 mM Hepes, pH 7.8, and at 25 °C. The urea concentration at the midpoint of the transition is 3.4 M for SW apoMb and 2.7 M for horse Mb.

Table 1

Urea concentration ( $C_m$ ) and pH value ( $pH_m$ ) at the middle of the unfolding transition of sperm whale (SW) and horse apoMbs

| ApoMb <sup>a</sup> | $C_m$ (urea, M) | $pH_m$ <sup>b</sup> |
|--------------------|-----------------|---------------------|
| SW                 | 3.4             | 4.8                 |
| Horse              | 2.7             | 5.3                 |

<sup>a</sup> The unfolding of apoMb is not two-state (see text).

<sup>b</sup> The  $pH_m$  refers to the native to intermediate transition. Errors are less than 5%.

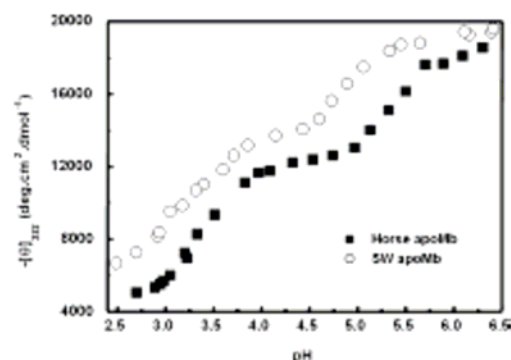


Fig. 3. Acid-induced unfolding of sperm whale (SW, circles) and horse (squares) apoMbs followed by circular dichroism at 222 nm. The acid-induced unfolding curves are the average of at least three independent experiments. The midpoint of the acid-induced transition from native to intermediate was 4.8 for SW apoMb and 5.3 for horse apoMb.

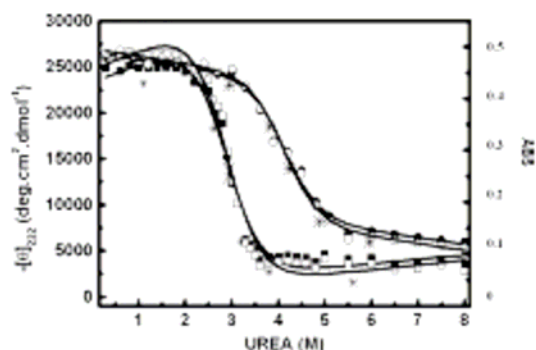


Fig. 4. Urea-induced unfolding of sperm whale (SW, circles) and horse (squares) cyanoMbs followed by circular dichroism at 222 nm (open symbols, unfolding; crosses, refolding) and absorbance at 423 nm (closed symbols). The urea-induced unfolding curves are the average of at least three independent experiments and were fitted to a two-state equation as described elsewhere [30]. The fitting is represented by lines.

Considering a value for  $m$  of  $-1.6$  kcal/(mol.M) determined for SW Mb [22], the fitting resulted in a  $\Delta G_{unf} = -6.7$  kcal/mol for SW Mb and a  $\Delta G_{unf} = -4.6$  kcal/mol for horse Mb (Table 3), corresponding to a  $\Delta\Delta G_{unf}$  of about  $-2.1$  kcal/mol. The



Table 2

Urea concentration ( $C_m$ ) for the unfolding of sperm whale and horse cyanoMbs

| Conditions          | Sperm whale (urea, M) | Horse (urea, M) |
|---------------------|-----------------------|-----------------|
| pH 5.0              | 4.2                   | 2.9             |
| pH 5.5              | 5.1                   | 4.0             |
| pH 6.0              | —                     | 5.2             |
| pH 5.0 + 50 mM NaCl | 3.5                   | 2.5             |
| pH 5.5 + 50 mM NaCl | 4.5                   | 3.6             |
| pH 6.0 + 50 mM NaCl | 5.6                   | 4.8             |

—, not two-state. Errors are less than 3%.

urea-induced unfolding at pH 5.0 of SW mutants A15G/A74G and K140A were also two-state and reversible (data not shown), and resulted in  $\Delta G_{\text{mgs}}$  of  $-5.7$  and  $-6.8$  kcal/mol, respectively (Table 3). The difference in stability between SW and horse Mbs was also detected by DSC. At pH 5.0, the maximum at the temperature-induced transition was  $85^\circ\text{C}$  for SW cyanoMb and  $80^\circ\text{C}$  for horse cyanoMb (Fig. 5). Although the areas under the curves were quite similar, further thermodynamic analyses were difficult because the temperature-induced unfolding of these proteins was only partially reversible. Nonetheless, these experiments also detected a large difference in stability between horse and SW Mbs, supporting the urea-induced unfolding results.

The stabilities of both SW and horse Mbs have an electrostatic component. The increase in stability of these proteins with pH and salt was quite similar. Both proteins showed a  $\Delta C_m$  of about 1 M when the urea-induced unfolding transition at pH 6.0 was compared to the transition at pH 5.5 and pH 5.5 was compared to pH 5.0 (Table 2), both in the presence and absence of salt (see below). The method for studying the unfolding of Mb has a limited pH range due to formation of an intermediate at low pH and too large stability at high pH [22]. We also looked at the contribution of the electrostatic interactions for the stability and folding pathway of the Mbs by studying their urea-induced unfolding transitions in the presence and absence of added sodium chloride at different pHs. The  $C_m$ s of both SW and horse cyanoMbs decreased by about 0.5 M in

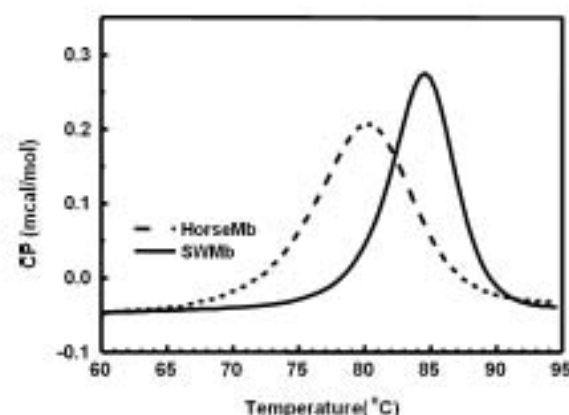


Fig. 5. Temperature-induced unfolding of sperm whale (SW, continuous line) and horse (dashed line) cyanoMbs. The temperature at the maximum of the transition is  $85^\circ\text{C}$  for SW Mb and  $80^\circ\text{C}$  for horse Mb. The temperature-induced unfolding of both SW and horse Mbs was only partially reversible (data not shown) and further thermodynamic analyses are difficult.

the presence of 50 mM NaCl, independent of the pH studied (Table 2).

#### The homogeneity of the cyanoMbs

The homogeneity of the Mbs was checked by SEC and AUC. When loaded at high concentrations (200  $\mu\text{M}$ ), WT SW Mb had a SEC profile of monomer species, while the horse Mb profile showed an additional dimer peak (about 2% of the monomer peak as defined by the area integer) (Fig. 6 and Table 3). It is worth noting that a horse Mb monomer peak concentrated back to 200  $\mu\text{M}$  and reanalyzed by SEC gave the same monomer-dimer profile. Similar results were obtained with the AUC equilibrium sedimentation experiments at high protein concentrations (Fig. 7 and Table 3). The equilibrium sedimentation profiles of SW Mb were fitted as a single ideal species even at 40  $\mu\text{M}$  (Fig. 7A and Table 3). The equilibrium sedimentation profiles of horse Mb were fitted as a single ideal species up to 20  $\mu\text{M}$

Table 3

Biophysical parameters measured for horse, and sperm whale (SW) wild-type (WT) and mutants cyanoMbs

| CyanoMb      | $\Delta G_{\text{fold}}^a$ (kcal/mol) | Self-association <sup>b</sup> | Analytical ultracentrifugation <sup>c</sup> |
|--------------|---------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------------------|
| SW WT        | -6.7                                  | No                            | Single noninteracting species               |
| Horse        | -4.6                                  | Yes                           | Monomer-dimer model                         |
| SW A15G/A74G | -5.7                                  | No                            | Single noninteracting species               |
| SW E04A      | -6.2 <sup>d</sup>                     | No                            | Single noninteracting species               |
| SW R118A     | -6.1 <sup>d</sup>                     | No                            | Single noninteracting species               |
| SW K140A     | -6.8                                  | —                             | —                                           |

<sup>a</sup> Measured at pH 5.0 and  $25^\circ\text{C}$ .<sup>b</sup> Measured by gel filtration chromatography.<sup>c</sup> Best fitting of the equilibrium sedimentation experiments at 40  $\mu\text{M}$ .<sup>d</sup> From [22]. —, experiment not performed. Errors are less than 3%.

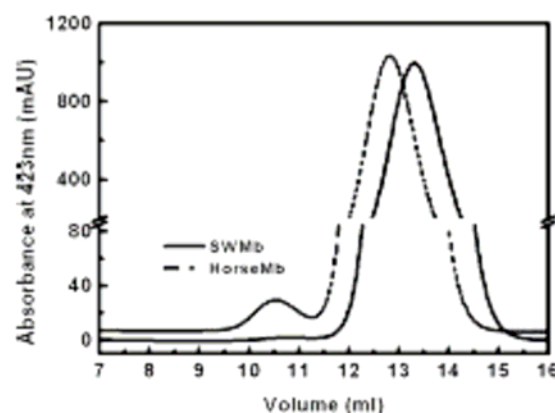


Fig. 6. Size exclusion chromatography of sperm whale (SW, continuous line) and horse (dash line) cyanoMb. The elution was monitored at 423 nm (Soret band). The elution of SW Mb shows only a monomer species, whereas the elution of horse Mb shows two species, one corresponding to a monomer (about 98% of the mass) and another corresponding to a dimer (about 2% of the mass).

(Fig. 7B). However, a single ideal species fitting of the sedimentation curve of horse Mb at 40  $\mu$ M yielded poor residuals (Fig. 7C, middle panel), indicating that the model was an inaccurate description of the macromolecular species present. A monomer–dimer equilibrium model of horse Mb at 40  $\mu$ M yielded good residuals (Fig. 7C,

upper panel), when the fitting was allowed for self-association. Together, these results showed that horse Mb oligomerizes at high concentrations. SW Mb mutants A15G/A74G, E64A, and R118A were also investigated by SEC and AUC showing that these mutants were single ideal species as the WT protein (Table 3).

## Discussion

### Perspectives of the difference in stability

The unfolding of apoMb does not involve a two-state transition; it presents an intermediate at mildly acid conditions [12] and its unfolding transition curves monitored by CD, and emission fluorescence are not coincident [22]. However, the analysis of either the urea concentration or the pH value at the midpoint of the unfolding transition is valid for stability comparison. The measured difference in stability between the apo forms of SW and horse Mbs was of the same order of magnitude as that measured for the holo forms:  $\Delta C_m = 0.7$  M urea for the apo forms versus  $\Delta C_m = 1$  M for the holo forms. The  $\Delta$ pH of native to intermediate apoMbs was about 0.5, related to results found for the holo forms; the stabilities of horse Mb at pHs 5.5 and 6.0 were similar to the stabilities of SW Mb at pHs 5.0

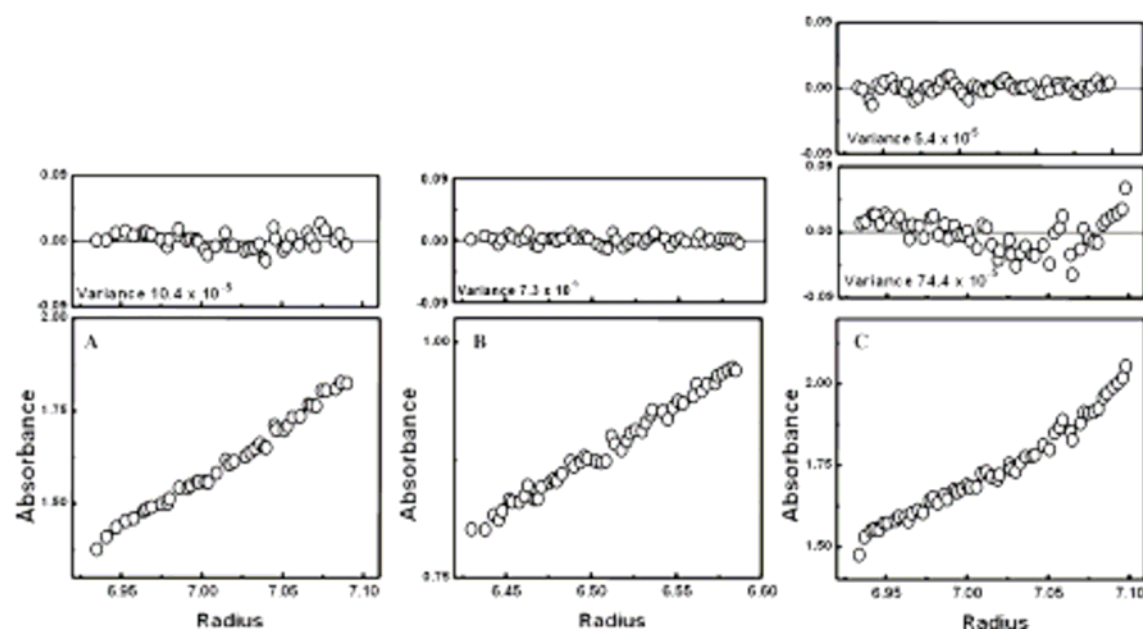


Fig. 7. Analytical ultracentrifugation of sperm whale (SW) and horse cyanoMbs. The sedimentation equilibrium analyses were performed from 3 to 40  $\mu$ M and the best fit was determined by the randomness of the distribution of the residuals and by minimization of the variation of the variance. (A) The SW Mb sedimentation equilibrium profile at 40  $\mu$ M fits well to a single ideal noninteracting species (see the residuals plot in the top panel). (B) The horse Mb sedimentation equilibrium profile at 20  $\mu$ M fits well to a single ideal noninteracting species (see the residuals plot in the top panel). (C) The horse Mb sedimentation equilibrium profile at 40  $\mu$ M fits well to a monomer–dimer equilibrium model (top panel) but not to a single ideal noninteracting species (see the residuals plot in the middle panel).



and 5.5, respectively. We found no difference in stability measuring urea-induced unfolding at pH 4.2 (data not shown), therefore our data at equilibrium suggest that the main difference in stability may be restricted to the native state. Kinetic experiments are underway to compare the folding pathway of these proteins and may shed light on this question.

The findings obtained from the comparison of the apo forms of the Mbs indicate that the difference in stability between SW and horse Mbs is unlikely to be purely associated with heme binding. Besides, SW and horse Mbs have similar heme rate loss [32], indicating that they may have similar affinity for heme. Although heme affinity has a major contribution to the stability of Mb [33], an alternative explanation for the difference in stability between SW and horse Mbs, based only on divergences in heme affinity, is not sufficient to explain the data obtained here. Together, our results pointed that the higher stability of the SW Mb is due to differences in amino acid sequence.

Until recently, it was not possible to measure the stability of holoMb in a reversible unfolding-refolding reaction due to the low solubility of heme. Therefore, we used the reversible urea-induced unfolding at pH 5.0 of the cyanomet derivative method, which gives a more reliable measurement of the free energy of unfolding, to quantify accurately the difference in stability between horse and SW Mbs. At the conditions tested here, we found that the unfolding of horse cyanoMb was reversible and two-state, as showed for the unfolding of SW cyanoMb [22]. The two-state unfolding of SW and horse cyanoMbs at a limited pH range was based on several observations. The superimposition of the unfolding transition curves of monitored probes of different structural aspects, one of the secondary structure (far-UV CD at 222 nm) and one of the tertiary structure (absorbance at the Soret band), was very good, as well as the reversibility at these conditions. Other indications that the unfolding of cyanoMb was two-state in the conditions tested here were the highly cooperative format of the transition curves as evaluated by their steepness and the fact that apoMb is almost completely unfolded, at the same pH, in the urea concentration than the cyano form starts to unfold [22]. Thus, we analyzed the urea-induced unfolding using a two-state equation with linear baselines for the folded and unfolded states [30] and a fixed  $m$  value of  $-1.6 \text{ kcal/ (mol.M)}$ , as previously determined [22], to fit the curves. The use of a fixed  $m$  value, generally understood as proportional to the amount of accessible surface area exposed upon denaturation [34,35], is justified by the very high structural similarity between horse and SW Mbs, and between WT and mutants SW Mbs. As pointed out [36],  $m$  values are not expected to vary significantly when only small changes in the amino acid sequence are present.

Despite sharing high identity, from primary to tertiary structures, horse and SW Mbs had a considerable difference in stability. The SW Mb unfolded at a higher temperature than horse Mb and the  $\Delta\Delta G_{\text{unf}}$  at pH 5.0 was about  $-2.1 \text{ kcal/mol}$ . The reversible urea-induced unfolding study of the cyanomet derivative of SW and horse Mbs was performed at a limited pH range due to formation of an intermediate at low pH and too large stability at high pH [22]. At these extremes of pH, deviations from two-state folding can be observed as loss of sigmoid shape as well as by lack of superimposition of the unfolding curves measured by CD and by absorbance at the Soret band. The difference in stability between horse and SW Mbs was identified in all the conditions reported here, from pH 5.0 to 6.0 and in the presence and absence of sodium chloride. At the same conditions of pH and ionic strength, the  $C_m$  measured for SW Mb was about  $1.3\times$  higher than the  $C_m$  measured for horse Mb. The experiment at pHs higher than six was only possible with the apo form of the proteins, in this condition the urea concentration at the midpoint of the unfolding transition of SW apoMb was also about  $1.3\times$  higher than that measured for horse apoMb. These results increased the confidence that horse Mb was indeed less stable than SW Mb due to divergences in the amino acid sequence and not to distinctions in heme binding affinity.

The results indicated that the stabilities of SW and horse Mbs had an electrostatic component since their stabilities increased from pH 5.0 to 6.0, and decreased in the presence of 50 mM NaCl. For each 0.5 unit increase in pH, the  $C_m$ s calculated for SW and horse Mbs increased by about 1 M, and the stability of the proteins decreased by about 10% when NaCl was added. The decrease in stability at acid pH is predicted by electrostatic calculations [37] and is observed for almost all proteins. Direct measurements of the stability of RNase A versus pH confirmed the decrease in stability at acid pH [38,39]. The decrease in stability caused by the increase in NaCl concentration indicates that favorable electrostatic interactions contribute, likely at the same manner, to the stability of both SW and horse Mbs. These proteins have equal amounts (20) of Asp + Glu residues and similar amounts (35 in SW Mb and 30 in horse Mb) of His + Arg + Lys residues, suggesting that they may experience equivalent global electrostatic effects. Of course, this basic analysis does not account for charged groups that are buried in the folding state and may have anomalous  $pK_a$ s. Nevertheless, it is worth mentioning that the mutants studied in [22] are each a deletion of either a positive or a negative charge in SW Mb. If the larger number of charged groups present in SW Mb was the origin of the protein higher stability, the charged deletion mutants should have had large effects on the stability. However, opposing this theory, the mutants have only a minor effect in  $\Delta G_{\text{unf}}$  [22].

### Potential sources for the difference in stability

A close inspection of the amino acid sequences of SW and horse Mbs (Fig. 1) showed that only 19 residues, of which at least 11 are conservative substitutions, were not similar between these proteins. Three of the nonconservative substitutions are the residues at positions 15, 35, and 74, which are Ala, Ser, and Ala, respectively, in SW Mb, and are all Gly in horse Mb. It is well established that Ala is one of the most frequently found residues in  $\alpha$ -helix [40] and that a substitution Gly to Ala stabilizes the  $\alpha$ -helix [41–43]. Therefore, the presence of Ala instead of Gly in specific positions may contribute to the higher stability of SW Mb over horse Mb. Gly35 is the C-terminal residue of horse Mb B-helix, in this position the choice of amino acid has only a small effect on peptide helix stability [44] and its substitution by either Ala or Ser has nearly no effect in the helix content [44,45]. In protein helices, statistical and experimental works showed that Gly is a better stabilizer in the C-cap than in a central position [45], and that Ser (or Ala) is not the most frequent residue at the C-terminus [46]. Hence, we assume that it is unlikely that Gly35 contributes for the lower stability of horse Mb. On the other hand, positions 15 and 74 are localized near the mid region of A and E helices, respectively. At this position, a substitution Gly to Ala has a large impact in the stability because Ala is a much better stabilizer than Gly at internal positions [44,47]. We decided to test this hypothesis, and constructed and measured the stability of a SW double-mutant A15G/A74G, and as a matter of fact, this double-mutant had a much lower stability than the SW protein as expected if these residues were contributing to its higher stability compared to horse Mb. The double-mutant decreased the stability of SW Mb by about 1.0 kcal/mol, a result which agrees with the values found by Serrano et al. [43], showing a destabilization of up to 0.4 kcal/mol for each Ala to Gly substitution in helix internal positions in barnase. However, the SW double-mutant per se accounted for only about half of the difference in stability between SW and horse Mbs, and did not show aggregation at high concentrations. These results indicate that in addition to the residues at positions 15 and 74, one or more residues are involved in the difference in stability between SW and horse Mbs.

A previous study [22] showed that disruption of salt-bridge Glu04-Lys79 destabilizes SW Mb by about 0.5 kcal/mol, and disruption of salt-bridge Asp20-Arg18 destabilizes SW Mb by about 0.6 kcal/mol. However, SW Mb mutants E04A and R118A did not show any sign of aggregation in the conditions tested here. The  $\Delta\Delta G_{\text{unf}}$  measured for these mutants are of about -0.5 kcal/mol [22], which is near the  $kT$  and consequently we cannot be positive that these mutations do interfere with the stability, although together with the

A15G/A74G mutation they could count for the  $\Delta\Delta G_{\text{unf}}$  of -2.1 kcal/mol measured for horse Mb. Worth mentioning is that the potential salt-bridges formed by Glu04-Lys79 and Asp20-Arg18 in SW Mb are unlikely to be formed in horse Mb because the latter has Asp04 and Lys118.

Another residue that is dissimilar between SW (Leu9) and horse (His9) Mbs was mutated for Ala in the first by other authors without a variation in the stability when compared to the WT [48]. The dwarf sperm whale Mb has the same stability as the SW Mb [49], and its primary sequence is very similar to that of SW, with the exception of residues 35, Ser in SW and His in dwarf whale, and 132, Lys in SW and Ser in dwarf whale, which are also dissimilar among SW and Hr Mb. The mutant R140A had no effect in the stability of the SW Mb (this work). These findings suggest that residues at positions 9, 35, 132, and 140 are not involved in the difference in stability between SW and horse Mbs. Most likely, one other or several other residues are involved in the difference in stability between SW and horse Mbs, and a multiple-mutant approach may be necessary to identify exactly which residues are those.

### Physiological relevance

The higher stability of the SW protein was confirmed for holoMb at pH 6.0 in the presence of NaCl (the results with NaCl vary little from 50 to 200 mM [22]) and for apoMb at pH 7.8, conditions which resemble the cell environment. Thus, we feel confident that the difference in stability between SW and horse Mbs exists also at physiological conditions. A possible explanation for the physiological relevance of the SW Mb high stability and no tendency to aggregate may be related to the high concentration of this protein in the whale muscle. A whale spends long periods of time without breathing when deep diving in the ocean and therefore its muscles need the oxygen stocked in the Mb to work. Such situation can lead to accumulation of lactic acid and possible acidosis because the muscles during long diving work anaerobically, from which one concludes that whale Mb may experience more severe conditions than experienced for the Mb of terrestrial mammals. Thereby, maintenance of stability at high concentrations and in acidic environment conditions, as studied here, is important for SW Mb to bear physiological variations caused by long periods of diving. Past studies have reported that SW Mb is more stable than Mbs from terrestrial organisms [50,51] and herein we define with accuracy the stabilities of SW and horse Mbs based on a two-state unfolding analysis, the pH-dependence of these stabilities, and the state of association of these proteins at high concentration.

To have further insights into the difference in stability between whales and terrestrial mammals Mbs, we ana-



lyzed the amino acid sequences of Mb from several organisms available at the Entrez/NCBI databank (see Materials and methods). We found that like SW Mb, several whale Mbs have alanine at positions 15 and 74, while several terrestrial mammal Mbs, like Hr Mb, have glycine at positions 15 and 74. We compared the Mb sequences from 10 whale species, 5 porpoise and dolphin species, and 32 other mammals, and found that 8 whale Mbs have alanine at position 15 and 4 have alanine at position 74, and none have simultaneously glycine at the two positions. Contrary to that, the Mbs of the other 37 species have glycine at position 15, and 35 species have glycine at position 74. These findings reinforce the data presented here showing that these residues are important to keep the stability of SW Mb. Other strong conserved residue among diver mammals is Arg at position 118 (9 out of 10 whale Mbs and 5 out of 5 porpoise and dolphin Mbs), which is Lys in the other mammal Mbs (32 species). However, the fact that both the SW Mb double-mutant A15G/A74G and the mutant R118A were monomers at the concentrations tested was an indication that one other or several other residues were also involved in keeping the stability and homogeneity of SW Mb, as discussed above. For instance, five concurrent mutations are necessary to make pig Mb, which has stability similar to that of horse Mb, to be as stable as SW Mb in guanidine-induced unfolding experiments [51], a result that points to multiple interactions in SW Mb summing up to maintain stability and homogeneity at high concentrations.

## Conclusion

Here, we show studies which compare the stability of SW and horse Mbs, two proteins in which folding studies have been extensively studied. We found that: (1) There was a large difference in stability between SW and horse Mbs at pH 5.0 in the order of 2.1 kcal/mol. (2) SW Mb was a monomer at concentrations up to 40  $\mu$ M but horse Mb had a tendency to aggregate at concentrations >20  $\mu$ M. (3) The stability of these proteins increased with pH from 5.0 to 6.0 and decreased in the presence of sodium chloride. (4) The mutation of alanines 15 and 74 in SW Mb by glycines caused a decrease in stability of about 1.0 kcal/mol. (5) The difference in stability between SW and horse Mbs was also identified among the apo forms of these proteins.

## Acknowledgments

We thank Fundação de Amparo de Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), PEW Charitable Trusts, and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico for financial support. We thank Dr.

R.L. Baldwin for helpful discussion and S.L. Silva and V.M. Soares for technical assistance. W.C.B.R. and J.F. are FAPESP fellows.

## References

- [1] P.S. Kim, R.L. Baldwin, *Annu. Rev. Biochem.* 51 (1982) 499–489.
- [2] S.T. Ferreira, F.G. De Felice, *FEBS Lett.* 498 (2001) 129–134.
- [3] C.M. Dobson, *Nature* 426 (2003) 884–890.
- [4] C.H.I. Ramos, S.T. Ferreira, *Protein Pept. Lett.* 12 (2005) 213–222.
- [5] T. Takano, *J. Mol. Biol.* 110 (1977) 537–568.
- [6] P.E. Wright, R.L. Baldwin, in: *Mechanisms of Protein Folding*, second ed., Oxford University Press, 2000, pp. 309–329.
- [7] M. Brunori, *Biophys. Chem.* 86 (2000) 221–230.
- [8] M. Jamin, *Protein Pept. Lett.* 12 (2005) 229–234.
- [9] D. Ellixer, P.E. Wright, *J. Mol. Biol.* 263 (1996) 531–538.
- [10] D. Ellixer, J. Yao, H.J. Dyson, P.E. Wright, *Nat. Struct. Biol.* 5 (1998) 148–155.
- [11] J.T. Leconte, S.F. Salts, S. Bhattacharya, C.J. Falzone, *Protein Sci.* 8 (1999) 1484–1491.
- [12] Y.V. Griko, P.L. Privalov, S.Y. Vasyaninov, V.P. Kutysenko, *J. Mol. Biol.* 202 (1988) 127–138.
- [13] F.M. Hughson, P.E. Wright, R.L. Baldwin, *Science* 249 (1990) 1544–1548.
- [14] P.A. Jennings, P.E. Wright, *Science* 262 (1993) 892–896.
- [15] Y. Goto, A.L. Fink, *Methods Enzymol.* 232 (1994) 3–15.
- [16] R. Gilmanovich, S. Williams, R.H. Callender, W.H. Woodruff, R.B. Dyer, *Biochemistry* 36 (1997) 15006–15012.
- [17] T. Uozawa, S. Akiyama, T. Kimura, S. Takahashi, K. Ishimori, I. Morishima, T. Fujisawa, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (2004) 1171–1176.
- [18] D. Barrick, R.L. Baldwin, *Protein Sci.* 2 (1993) 869–876.
- [19] C. Nishimura, H.J. Dyson, P.E. Wright, *J. Mol. Biol.* 322 (2002) 483–489.
- [20] B.A. Springer, S.G. Sligar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987) 8961–8965.
- [21] E.A. Ribeiro-Junior, W.C.B. Regis, L. Tasic, C.H.I. Ramos, *Protein Expr. Purif.* 28 (2003) 202–208.
- [22] C.H.I. Ramos, M.S. Kay, R.L. Baldwin, *Biochemistry* 38 (1999) 9783–9790.
- [23] Y. Luo, R.L. Baldwin, *Biochemistry* 40 (2001) 5283–5289.
- [24] E.A. Ribeiro-Junior, C.H.I. Ramos, *Anal. Biochem.* 329 (2004) 300–306.
- [25] U.K. Laemmli, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [26] H. Edelhoch, *Biochemistry* 6 (1967) 1948–1954.
- [27] C.H.I. Ramos, *Biochem. Mol. Biol. Educ.* 32 (2004) 31–34.
- [28] E. Antonini, M. Brunori, *Hemoglobin and Myoglobin in Their Reactions with Ligands*, American Elsevier Publishing Company, New York, 1971.
- [29] C.N. Pace, *Methods Enzymol.* 131 (1986) 266–280.
- [30] M.M. Santoro, D.W. Bolen, *Biochemistry* 27 (1988) 8063–8068.
- [31] M.L. Johnson, J.J. Correia, D.A. Yphantis, H.R. Halvorson, *Biophys. J.* 36 (1981) 575–588.
- [32] M.S. Hagrove, A.J. Wilkinson, J.S. Olson, *Biochemistry* 35 (1996) 11300–11309.
- [33] M.S. Hagrove, J.S. Olson, *Biochemistry* 35 (1996) 11310–11318.
- [34] J.A. Schellman, *Biopolymers* 17 (1978) 1305–1322.
- [35] J.K. Myers, C.N. Pace, J.M. Scholtz, *Protein Sci.* 4 (1995) 2138–2148.
- [36] C.M. Johnson, A.R. Fersht, *Biochemistry* 34 (1995) 6795–6804.
- [37] C. Tanford, J.G. Kirkwood, *J. Am. Chem. Soc.* 70 (1957) 5333–5339.
- [38] C.N. Pace, D.V. Laurentz, J.A. Thomson, *Biochemistry* 29 (1990) 2564–2572.

- [39] C.H.I. Ramos, R.L. Baldwin, *Protein Sci.* 11 (2002) 1771–1778.
- [40] J. Richardson, D.C. Richardson, *Science* 240 (1988) 1648–1652.
- [41] P.C. Lys, M.I. Liff, L.A. Maskey, N.R. Kallenbach, *Science* 250 (1990) 669–673.
- [42] S. Padmanabhan, S. Marqusee, T. Ridgeway, R.L. Baldwin, T.M. Laze, *Nature* 344 (1990) 268–270.
- [43] L. Serrano, J.L. Neira, J. Sanchez, A.R. Fersht, *Nature* 356 (1992) 453–455.
- [44] R.L. Baldwin, *Biophys. Chem.* 1,2 (1995) 127–135.
- [45] M. Petukhov, K. Uegaki, N. Yamoto, L. Serrano, *Protein Sci.* 11 (2002) 766–777.
- [46] D.E. Fagel, W.F. DeGand, *J. Mol. Biol.* 337 (2004) 1195–1205.
- [47] J.K. Myers, C.N. Pace, J.M. Scholtz, *Biochemistry* 36 (1997) 10923–10929.
- [48] R.J. Piker, L. Lin, G.D. Rose, N.R. Kallenbach, *Protein Sci.* 2 (1993) 1099–1105.
- [49] M.A. Flanagan, B. Garcia-Moreno, S.H. Friend, R.J. Feldmann, H. Soulezou, F.R. Guad, *Biochemistry* 22 (1983) 6027–6037.
- [50] M.S. Hargrove, S. Krzywicki, A.J. Wilkinson, Y. Dou, M. Ikeda-Saito, J.S. Olson, *Biochemistry* 33 (1994) 11767–11775.
- [51] E.E. Scott, E.V. Pater, J.S. Olson, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 27129–27136.

**Tabela 4. Comparação do tipo de aminoácido presente em algumas posições na sequência de aminoácidos de mioglobina de diversos mamíferos.**

| ORGANISMO                                                                    | IDENTIFI<br>CAÇÃO<br>NCBI | POSI<br>ÇÃO<br>04 | POSI<br>ÇÃO<br>20 | POSI<br>ÇÃO<br>79 | POSI<br>ÇÃO<br>118 | POSI<br>ÇÃO<br>15 | POSI<br>ÇÃO<br>74 |
|------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|
| <i>Espermacete</i><br>( <i>Physeter catodon</i> )                            | <u>MYWHP</u>              | E                 | D                 | K                 | R                  | A                 | A                 |
| <i>espermacete dwarf</i><br>( <i>Kogia simus</i> )                           | <u>MYWHW</u>              | E                 | D                 | K                 | R                  | A                 | A                 |
| <i>Baleia Goose beaked</i>                                                   | <u>MYWHZ</u>              | E                 | D                 | K                 | R                  | A                 | G                 |
| <i>Baleia Hubb's beaked</i>                                                  | <u>MYWHU</u>              | E                 | D                 | K                 | K                  | A                 | G                 |
| <i>Baleia Dall porpoise</i><br>( <i>Phocoenoides dalli</i><br><i>dalli</i> ) | <u>MYPED</u>              | E                 | D                 | K                 | R                  | G                 | G                 |
| <i>Baleia Harbor</i><br><i>porpoise</i>                                      | <u>MYPE</u>               | E                 | D                 | K                 | R                  | G                 | G                 |
| <i>Baleia Finback</i>                                                        | <u>MYWHF</u>              | D                 | D                 | K                 | R                  | A                 | G                 |
| <i>Baleia Minke</i>                                                          | <u>MYWHK</u>              | D                 | D                 | K                 | R                  | A                 | G                 |
| <i>Baleia Humpback</i>                                                       | <u>MYWHH</u>              | D                 | D                 | K                 | R                  | A                 | G                 |
| <i>Baleia California gray</i>                                                | <u>MYWHC</u>              | D                 | D                 | K                 | R                  | A                 | G                 |
| <i>Baleia Pilot</i>                                                          | <u>MYWHT</u>              | D                 | D                 | K                 | R                  | G                 | A                 |
| <i>Baleia Killer</i>                                                         | <u>MYWHL</u>              | D                 | D                 | K                 | R                  | G                 | A                 |
| Golfinho Bottle-nose                                                         | <u>MYDD</u>               | D                 | D                 | K                 | R                  | G                 | A                 |
| Golfinho Saddleback                                                          | <u>MYDDBS</u>             | D                 | D                 | K                 | R                  | G                 | A                 |
| Golfinho Amazon                                                              | <u>MYDDAR</u>             | D                 | D                 | K                 | R                  | G                 | G                 |
| Harbor seal                                                                  | <u>MYSLH</u>              | D                 | D                 | K                 | K                  | G                 | G                 |
| sealion                                                                      | <u>MYZC</u>               | D                 | D                 | K                 | K                  | G                 | G                 |
| Baikal seal                                                                  | <u>JN0344</u>             | D                 | D                 | K                 | K                  | G                 | G                 |
| river otter                                                                  | <u>MYOT</u>               | D                 | D                 | K                 | K                  | G                 | G                 |
| Halichoerus grypus<br>(gray seal)                                            | <u>P02162</u>             | D                 | D                 | K                 | K                  | G                 | G                 |
| Cavalo                                                                       | <u>MYHO</u>               | D                 | D                 | K                 | K                  | G                 | G                 |
| <i>Bos taurus</i>                                                            | <u>NP_776306</u>          | D                 | D                 | K                 | K                  | G                 | G                 |
| <i>Mus musculus</i>                                                          | <u>NP_038621</u>          | D                 | D                 | K                 | R                  | G                 | T                 |
| <i>Rattus norvegicus</i>                                                     | <u>NP_067599</u>          | D                 | D                 | K                 | R                  | G                 | G                 |
| <i>Homo sapiens</i>                                                          | <u>NP_005359</u>          | D                 | D                 | K                 | K                  | G                 | G                 |
| Macaco: <i>Symphalangus</i><br><i>syndactylus</i>                            | <u>A61366</u>             | D                 | D                 | K                 | K                  | G                 | G                 |
| Zebra                                                                        | <u>MYHOZ</u>              | D                 | D                 | K                 | K                  | G                 | G                 |
| Castor (European<br>beaver)                                                  | <u>JN0410</u>             | D                 | D                 | K                 | K                  | G                 | G                 |
| Morcedo (Bat-eared)                                                          | <u>MYFXBE</u>             | D                 | D                 | K                 | K                  | G                 | G                 |
| muskrat                                                                      | <u>PN0126</u>             | D                 | D                 | K                 | K                  | G                 | G                 |

|                                            |               |   |   |   |   |   |   |
|--------------------------------------------|---------------|---|---|---|---|---|---|
| Veado                                      | <u>MYDE</u>   | D | D | K | K | G | G |
| Ovelha                                     | <u>MYSH</u>   | D | D | K | K | G | G |
| Elefante indiano                           | <u>MYELI</u>  | D | D | K | K | G | G |
| Elefante africano                          | <u>MYELA</u>  | D | D | K | K | G | G |
| Panda gigante                              | <u>JC1086</u> | D | D |   |   | A |   |
| Coelho (pika)                              | <u>MYOI</u>   | D | D | K | K | G | G |
| Coelho (tentative)                         | <u>MYRB</u>   | D | D | K | K | G | A |
| <i>Lagostomus maximus</i><br>(roedor)      | <u>MYVJ</u>   | D | D | R | K | G | G |
| <i>Proechimys guairae</i><br>(roedor)      | <u>MYKS</u>   | D | D | K | K | G | G |
| <i>(Ctenodactylus gundi,</i><br>Roedor)    | <u>MYRTNG</u> | D | D | K | K | G | G |
| tamanduá                                   | <u>MYOY</u>   | D | D | K | K | G | G |
| cachorro                                   | <u>MYDG</u>   | D | D | K | K | G | G |
| (porco espinho)                            | <u>MYHH</u>   | D | D | K | K | G | G |
| Macaco: <i>Aotes</i><br><i>trivirgatus</i> | <u>MYMQN</u>  | D | D | K | K | G | G |
| chipanzé                                   | <u>MYCZ</u>   | D | D | K | K | G | G |
| orangotango                                | <u>MYOG</u>   | D | D | K | K | G | G |
| Porco: <i>Sus scrofa</i>                   | <u>P02189</u> | D | D | K | K | G | G |

## 5.DISCUSSÃO:

### 5.1-Expressão e purificação de SWMb:

A maioria dos procedimentos de purificação de mioglobina no geral são executados em função da grande estabilidade dessa proteína em sua forma holo, com boa expressão e solubilidade. Contudo, muitas vezes o grupo heme precipita durante a cromatografia, principalmente quando a proteína é um mutante com baixa estabilidade, tornando complexa a recuperação das resinas cromatográficas. Um outro problema com os métodos de purificação da holomioglobina é quando o objetivo é obter a forma apo da proteína. A remoção do grupo heme é trabalhosa e requer etapas drásticas que envolvem solventes orgânicos e diálises por longos períodos de tempo. Desta forma, desenvolvemos um protocolo mais simples que nos permitisse obter a proteína diretamente na sua forma apo, melhorando a utilização das resinas de cromatografia e evitando o passo adicional de remoção



do grupo heme. A primeira modificação que fizemos foi alterar a temperatura de 37 °C para 42 °C após a indução. Desta forma, as proteínas foram produzidas na forma de corpos de inclusão sem que se ligassem ao grupo heme. Uma vez em corpos de inclusão a proteína é recolhida no precipitado após a lise celular e após algumas lavagens para a remoção completa da parede celular e de outros contaminantes, destacando uma outra vantagem da produção de corpos de inclusão, o baixo conteúdo de contaminantes presentes após estas lavagens.

Para a ressolubilização destes corpos de inclusão é importante salientar que não se devem usar detergentes, apesar de vários protocolos disponíveis na literatura recomendá-los. Nossa experiência mostrou que detergentes como SDS ou Triton X-100 podem se ligar na proteína e permanecer mesmo após a conclusão da purificação. Isto de fato não é desejável, pois pode atrapalhar enormemente nas aferições de concentração e posteriores análises com a proteína. O protocolo aqui descrito com a utilização de cloreto de guanidina 8M para solubilizar a proteína e etapas mais suaves de diálise (diluição para 4M) mostrou-se bem eficaz. Após a diálise para a retirada do cloreto de guanidina, parte da proteína e dos contaminantes precipitam (estes últimos numa proporção bem mais considerável) e a proteína está pronta para a cromatografia de troca iônica com um numero bem mais reduzido de contaminantes. Isto torna a regeneração das resinas muito mais fácil. Pode ocorrer, algumas vezes, que apenas a cromatografia em DEAE seja suficiente para a purificação da proteína. Após a purificação, a proteína mostrou-se estruturada e corretamente enovelada através de experimentos que verificaram sua capacidade de ligação ao heme e sua elipticidade residual molar. A utilização deste protocolo pode ser útil também

na purificação de mutantes mais drásticos que não tem expressão significativa e/ou não se ligam ao heme ou ainda apenas não são solúveis após a lise bacteriana.

Um outro fator importante a se destacar nessa etapa inicial do trabalho foi a eliminação de ácidos nucléicos. Este problema foi resolvido inserindo-se uma cromatografia de troca iônica em pH 2 no qual a proteína pode ser separada desses contaminantes que causam erros no cálculo de sua concentração assim como nas etapas posteriores.

A expressão e purificação das proteínas mutantes não foram apresentadas nos resultados uma vez que se comportaram de forma idêntica a proteína selvagem. Maiores informações e uma discussão mais detalhada sobre esse protocolo e sua utilização em mutantes mais drásticos podem ser encontradas em Ribeiro *et al.* (2003) e Ribeiro & Ramos (2004).

## **5.2. Medidas de estabilidade de SWMb e HrMb**

Os ensaios calorimétricos foram realizados com a forma ciano-holomioglobina, pois esta forma apresenta reversibilidade ao desenovelamento químico, como descrito em Ramos *et al.*, 1999. A reversibilidade é alcançada com a forma ciano-holomioglobina, pois o grupo heme ligado ao íon cianeto mostra-se solúvel e não precipita em solução. Deste modo, esperávamos obter a reversibilidade também por desenovelamento térmico. Os experimentos de desenovelamento térmico revelaram que a ciano-holomioglobina de espermacete apresentou uma reversibilidade em torno de apenas 10% e a ciano-holomioglobina de cavalo apresentou uma reversibilidade em torno de 65%. Estes valores não são

adequados para se fazer uma análise quantitativa do processo de desenovelamento térmico, pois não se sabe os eventos ocorridos na fase de pós-transição do desenovelamento térmico. Estes eventos podem ser modificações químicas, formação de núcleos de agregação, hidrólise das ligações peptídicas e precipitação do grupo heme. A reversibilidade acima de 95% é necessária para uma análise quantitativa do processo de desenovelamento térmico. A possível causa da irreversibilidade das mioglobinas de espermacete e de cavalo pode ser a alta temperatura de transição que pode causar outras alterações químicas nas cadeias laterais impedindo o reenovelamento. Desta forma utilizamos apenas o  $T_m$  para comparar as duas proteínas. A diferença de  $T_m$  entre as proteínas, nas mesmas condições, é coerente com a diferença de estabilidade observada pela técnica de desenovelamento químico.

Os experimentos de desenovelamento por uréia seguidos pela espectroscopia de absorção na região de soret e por dicroísmo circular a 222 nm confirmaram a diferença de estabilidade das mioglobinas de cavalo e espermacete. A caracterização do desenovelamento das mioglobinas, em diferentes pHs, na presença e na ausência de NaCl, revelou a sensibilidade destas proteínas à componentes que alteram as propriedades eletrostáticas do meio. Confirmamos que a estabilidade da holoMb de cavalo, assim como a holoMb de espermacete (Ramos *et al.*, 1999), aumenta com o aumento de pH e diminui, com a adição de cloreto de sódio.

Os valores de  $\Delta G_{unf}$  foram calculados fixando-se o  $m_{value}$  em 1600 Kcal/mol.M<sup>-1</sup> para uma melhor comparação entre as curvas. O  $m_{value}$  está

correlacionado com a área hidrofóbica exposta, e como se acredita que mutações pontuais não costumam afetar esta propriedade, utilizamos o mesmo valor para a mioglobina de cavalo e para o mutante A15G-A74G, pois a diferença de estrutura primária é mínima (Tabela 3 – artigo anexo). A mioglobina de cavalo apresentou um enovelamento reversível e com superposição das transições medidas por duas sondas diferentes, a absorção na região de Soret que mede a correta coordenação do grupo heme no bolsão hidrofóbico da proteína, ou seja uma sonda da estrutura terciária, e o dicróismo circulas em 222 nm que mede a quantidade de alfa-hélice da proteína, ou seja uma sonda da estrutura secundária. Portanto, aparentemente a perda de estrutura secundária e terciária das mioglobinas ocorre concomitantemente, demonstrando um comportamento típico de uma reação do tipo dois estados. Isto nos permite então obter dados confiáveis de energia livre, permitindo comparar os resultados obtidos com as mioglobinas e seus mutantes.

Nossos resultados mostram que, em pH 5,0, 25 °C na ausência de cloreto de sódio, a mioglobina de espermacete tem uma estabilidade de 6,7 kcal/mol e a mioglobina de cavalo tem uma estabilidade de 4,6 kcal/mol. Portanto, a diferença de estabilidade entre estas proteínas é de aproximadamente 2 kcal/mol (Tabela 3 – artigo anexo). Os ensaios de desenovelamento ácido sugerem que qualquer que seja a fonte de estabilidade, ela está presente tanto na forma apo quanto na forma holo (Figura 3 – artigo anexo). Estes experimentos confirmaram também a maior sensibilidade da holomioglobina de cavalo a estas condições ácidas.

### 5.3. Origens da diferença de estabilidade entre SWMb e HrMb

Uma análise da Tabela 1 mostra que 11 das 19 diferenças na estrutura primária entre as mioglobinas de cavalo e espermacete são conservadas. As posições 15, 35 e 74 são ocupadas por Ala, Ser e Ala, respectivamente na mioglobina de espermacete e por Gly nas três posições na mioglobina de cavalo. Alanina é um resíduo que estabiliza alfa-hélices e sua substituição por Gly desestabiliza este tipo de estrutura (Chreighton, 1996; Richardson & Richardson, 1988). Portanto, a presença de Gly nestas posições pode explicar a menor estabilidade da mioglobina de cavalo frente a mioglobina de espermacete. As posições 15 e 74 são encontradas próximo ao centro das hélices A e E e portanto devem estar participando na estabilidade destas estruturas. Contudo, a posição 35 está localizado no C-terminal da hélice B, uma posição em que resíduos de Gly são mais freqüentes e na verdade auxiliam na estabilização da porção terminal (Petukhov et al, 2002). Portanto, um duplo-mutante construído em nosso laboratório, onde os resíduos de Ala15 e Ala74 são ambos trocados por Gly deu importantes informações sobre a diferença de estabilidade entre as mioglobinas de cavalo e espermacete. A estabilidade deste duplo-mutante foi inferior em 1,0 kcal/mol em relação a proteína selvagem, um resultado que está de acordo ao determinado de desestabilização de 0,4 kcal/mol para cada substituição de Ala por Gly da proteína barnase (Serrano *et al*, 1992), outra proteína bastante estudada do ponto de vista da estabilidade e da via de enovelamento. Contudo, como estas mutações diminuem a estabilidade da mioglobina de espermacete em apenas 1 kcal/mol, metade da diferença entre esta proteína e a proteína de cavalo,

podemos inferir que outros resíduos devem estar envolvidos na diferença de estabilidade entre estas mioglobinas.

Um estudo feito por Ramos *et al* (1999) demonstrou que o rompimento por mutação das pontes salinas Glu04-Lys79 e Asp20-arg118 desestabilizavam a mioglobina de espermacete em 0,5 kcal/mol cada uma. Porém, esta estabilidade está muito próxima do  $kT$  e portanto seu efeito pode não ser real. Contudo, é interessante apontar que a soma das desestabilizações causadas por estes mutantes e pelo duplo-mutante discutido acima parecem ser suficientes para responder pela diferença de aproximadamente 2kcal/mol existente entre as mioglobinas de cavalo e espermacete.

#### **5.4. Implicações fisiológicas:**

Todos os resultados mostrados indicaram uma diferença de estabilidade entre as mioglobinas de cavalo e espermacete, sendo que esta última é mais estável. A alta concentração celular ao qual a mioglobina de baleia é submetida, em condições fisiológicas, pode ter exercido algum efeito evolutivo no sentido de aumentar a estabilidade destas proteínas. Das evidências que temos, como a maior resistência à pHs ácidos, podemos inferir como uma resposta natural às situações de anaerobiose causadas pelo mergulho prolongado de mamíferos como a baleia (Noren & Williams, 2000). Mamíferos que mergulham em grandes profundidades, como a baleia, são expostos a anaeróbiose prolongada e conseqüente condições de acidose (Kooyman & Ponganis, 1998; Snyder, 1983; Zapol *et al.*, 1979). Isto pode levar a uma série de acúmulos de mutações que

promoverão resistência ao desenovelamento e a perda do grupo heme, fenômenos que podem ocorrer durante a acidose (Tang *et al.*, 1998).

Os experimentos de cromatografia de exclusão molecular mostraram que a mioglobina de cavalo possui uma maior tendência à agregação do que a mioglobina de baleia. O mais interessante é que em baixas concentrações esse fenômeno não é observado. As apoproteínas de mamíferos que mergulham são significativamente mais estáveis do que as apoproteínas de mamíferos terrestres. O conteúdo intracelular de mioglobina em uma baleia é 10 vezes maior que em mamíferos terrestres. Isto pode ser facilmente observado pela cor mais escura dos tecidos musculares de mamíferos mergulhadores. Durante um mergulho, através do sangue, o oxigênio que fica limitado no organismo é desviado aos órgãos vitais, como o coração e o cérebro. Mesmo assim, os músculos continuam trabalhando e usando, como fonte de oxigênio, o conteúdo armazenado pela mioglobina. Acreditamos que a necessidade de uma alta concentração intracelular de mioglobina pode levar ao acúmulo de mutações que confeririam uma maior estabilidade nas proteínas que são armazenadas nestas condições.

Ao analisarmos as seqüências de várias mioglobinas (item 4.3 dos resultados) concluímos que aparentemente, um conjunto maior de mutações devem ser necessárias para que a mioglobina de espermacete passe a agregar como a mioglobina de cavalo em altas concentrações. O evento de mutações múltiplas é menos provável que mutações únicas e desta forma protegeria o organismo do efeito deletério causado pela agregação de proteínas no meio celular (Ramos & Ferreira, 2005).

## 6.CONCLUSÕES

- Os experimentos de desenovelamento ácido e químico mostraram que a apomioglobina de espermacete é mais estável que a apomioglobina de cavalo.
- A energia livre de desenovelamento da holomioglobina de cavalo é igual a -4,6 kcal/mol em pH 5,0, 25 °C e na ausência de cloreto de sódio.
- Nestas condições, a holomioglobina de espermacete é aproximadamente 2 kcal/mol mais estável que a holomioglobina de cavalo (Tabela 2, Regis *et al.*2005).
- A presença de cloreto de sódio e a diminuição do pH de 6,0 para 5,0 diminuem a estabilidade da holomioglobina de cavalo, um resultado similar ao medido para a holomioglobina de espermacete (Tabela 2, Regis *et al.*2005).
- A holomioglobina de cavalo tende a agregar em concentrações maiores que 40 micromolar, enquanto a holomioglobina de espermacete se mantém como monômero nesta mesma concentração (Figura 7, Regis *et al.*2005).
- O duplo-mutante A15G/A74G de holomioglobina de espermacete tem a estabilidade reduzida em aproximadamente 1 kcal/mol quando comparado com a proteína selvagem (Tabela 3, Regis *et al.*2005).
- O duplo-mutante A15G/A74G e os mutantes simples E04A e R118A de holomioglobina de espermacete se comportaram como monômeros nas concentrações testadas (Tabela 3, Regis *et al.*2005).



## 7. REFERÊNCIAS

1. ANFINSEN, C.B (1973). Principles that govern the folding of the protein chains. *Science* 181, 223-230.
2. ANFINSEN, C.B. & SHERAGA, H.A. (1975). Experimental and theoretical aspects of protein folding. *Ad. Protein Chem.* **29**, 205-300.
3. ANTONINI, E. & BRUNORI, M. (1971). Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands. New York: American Elsevier Publishing Company.
4. AWENIUS, C., HANKELN, T. & BURMESTER, T. (2001). Full-length cDNA cloning of human neuroglobin and tissue expression of rat neuroglobin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **287**, 418–421.
5. BARRICK, D. & BALDWIN, R.L. (1993). Stein and Moore Award address. The molten globule intermediate of apomyoglobin and the process of protein folding. *Prot. Sci.* **2**, 869-876.
6. BASHFORD, D., CHOTHIA, C. & LESK, A.M. (1987). Determinants of a protein fold. Unique features of the globin amino acid sequence. *J. Mol. Biol.* **196**, 199-216.
7. BURMESTER, T., WEICH, B., REINHARDT, S. & HANKELN, T. (2000) A vertebrate globin expressed in the brain. *Nature* **407**, 520–523
8. CARTER, P.J., WINTER, G., WILKINSON, A.J. & FERSHT, A.R. (1984). The use of double mutants to detect structural changes in the active site of the tyrosinyl-tRNA synthetase. *Cell* **38**, 835-840.
9. CHEN, Y. H., YANG, J. T. & CHAU, K. H. (1974). Determination of the helix and b-form of proteins in aqueous solution by circular dichroism. *Biochemistry* **13**: 3350 - 3359.

10. CREIGHTON, (1971) Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands.  
New York: American Elsevier Publishing Company.
11. DEWILDE, S., KIGER, L., BURMESTER, T., HANKELN, T., BAUDIN-CREUZA, V., AERTS, T., MARDEN, M. C., CAUBERGS, R. & MOENS, L. (2001). Biochemical Characterization and Ligand Binding Properties of Neuroglobin, a Novel Member of the Globin Family. *J. Biol. Chem.* **276**, 38949–38955
12. DICKERSON, R. E. & GEIS, I. (1983). In *Hemoglobin: Structure, Function, Evolution and Pathology*, Benjamin/Cummings, Menlo Park, CA
13. DOLGIKH, D.A., GILMANSHIN R.I., BRAZHNIKOV, E.V., BYCHKOVA, V.E., SEMISOTNOV, G.V, VENYAMINOV, S.Y.U. & PTITSYN, O.B., (1981). Alpha-Lactalbumin: compact state with fluctuating tertiary structure? *FEBS Lett.* **136**, 311-5.
14. DORDAS, C. RIVOAL J. & HILL, R.D. (2003). Plant haemoglobins, nitric oxide and hypoxic stress. *Ann. Bot.* **91**, 173–178.
15. DORIT, R.L., SCHOENBACH, L., & GILBERT, W., (1990). How big is the universe of exons? *Science* **250**, 1377-82.
16. EDELHOCH, H. (1967). Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry* **6**, 1948 - 1954.
17. EMILY E. SCOTT, EDEN V. PASTER, & JOHN S. OLSON, (2000). The Stabilities of Mammalian Apomyoglobins Vary over a 600-Fold Range and Can Be Enhanced by Comparative Mutagenesis. *J. Biol. Chem.*, Vol. **275**, 27129-27136.
18. ERECIŃSKA, M. & SILVER, I. A. (2001). Tissue oxygen tension and brain sensitivity to hypoxia. *Respir. Physiol.* **128**, 263–276.

19. GILMANSHIN, R., WILLIAMS, S., CALLENDER, R.H., WOODRUFF, W.H. & DYER, R.B. (1997). Fast events in protein folding: relaxation dynamics and structure of the I form of apomyoglobin. *Biochemistry* **36**, 15006-15012.
20. GINSBURG, A. & CARROLL, W.R. (1965). Some specific ion effects on the conformation and thermal stability of ribonuclease. *Biochemistry* **4**, 2159-2174.
21. GOTO, Y. & FINK, A.L. (1994). Acid-induced folding of heme proteins. *Methods Enzymol.* **232**, 3-15.
22. GREENFIELD, N. J. (1996). Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data. *Anal. Biochem.* **235**, 1-10.
23. HARDISON, R. C. (1996). A brief history of hemoglobins: Plant, animal, protist, and bacteria *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 5675–5679
24. HARGROVE, M. S., BARRICK, D. & OLSON, J. S. (1996A). The association rate constant for heme binding to globin is independent of protein structure. *Biochemistry* **35**, 11293–11299.
25. HARGROVE, M.S. & OLSON, J. S. (1996). The stability of holomyoglobin is determined by heme affinity. *Biochemistry* **35**, 11310-11318.
26. HARGROVE, M.S. BRUCKER, E.A. STEC, B. SARATH, G. ARREDONDO-PETER, R. LUCAS, R.V. K., OLSON, J.S. & PHILIPS-JR., G.N. (2000). Crystal structure of a nonsymbiotic plant hemoglobin. *Structure* **8**, 1005–1014
27. HOLLECKER, M. & CREIGHTON, T.E. (1983). Evolutionary conservation and variation of protein folding pathways. *J. Mol. Biol.* **168**, 409-437.
28. IKAI, A. & TANFORD C. (1971). Kinetic evidence for incorrectly folded intermediate states in the refolding of denatured proteins. *Nature* **12**;100-102.

29. JAENICKE, R., (1987). Folding and association of proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **49**, 117-237.
30. KELLY, S. M & PRICE, N. C., (1997). The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding. *Biochimica et Biophysica Acta* **1338**, 161–185
31. KOOYMAN, G. L., & PONGANIS, P. J. (1998). The physiological basis of diving to depth: birds and mammals. *Annu. Rev. Physiol.* **60**, 19-32.
32. KREBS, H., SCHMID, F.X. & JAENICKE, R. (1983). Folding of homologous proteins. *J. Mol. Biol.* **169**, 619-635.
33. KUWAJIMA, K. (1989). The molten globule state as a clue for understanding the folding and cooperativity of globular-protein structure. *Proteins* **6**, 87-103.
34. LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
35. LANDT, O., GRUNERT, H-P. & HAHN, U. (1990). A general method for rapid site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction. *Gen.* **96**: 125-128.
36. LESK, A.M. & CHOTHIA, C. (1980). How different amino acid sequences determine similar protein structures: the structure and evolutionary dynamics of the globins. *J. Mol. Biol.* **136**, 225-270.
37. LEVITT, M. & CHOTHIA, C. (1976). Structural Patterns in Globular Proteins *Nature* **261**: 552 - 558.
38. LUMRY, R. & BILTONEN R. (1966). Validity of the "two-state" hypothesis for conformational transitions of proteins. *Biopolymers.* **4**, 917-44.

39. LUO, Y. & BALDWIN, R.L., (2001). How Ala/Gly Mutations in Different Helices Affect the Stability of the Apomyoglobin Molten Globule. *Biochemistry*, **40**, 5283-5289,
40. PACE, C. N. (1986). Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Methods in enzymology* **131**, 266 – 280.
41. PACE, C. N. & SCHMID, F. X. (1997). How to determine the molar absorbance coefficient of a protein. In: Protein Structure: A practical approach. Creighton, T. E. (Ed.) second edition. Oxford University Press, New York, U.S.A.
42. PESCE, A. COUTURE, M. DEWILDE, S. GUERTIN, M. YAMAUCHI, K. ASCENZI, P. MOENS, L. & BOLOGNESI, M. (2000). A novel two-over-two alpha-helical sandwich fold is characteristic of the truncated hemoglobin family. *EMBO J.* **19**, 2424–2434.
43. PETUKHOV M, UEGAKI K, YUMOTO N, SERRANO L. (2002) Amino acid intrinsic alpha-helical propensities III: positional dependence at several positions of C terminus. *Protein Sci.* **11**, 766-77.
44. PLAXCO, K.W., SPITZFADEN, C., CAMPBELL, I.D. & DOBSON, C.M. (1997). A comparison of the folding kinetics and thermodynamics of two homologous fibronectin type III modules. *J. Mol. Biol.* **270**, 763-770.
45. PRESNELL, S.R., COHEN, B.I. & COHEN, F.E. (1992). A segment-based approach to protein secondary structure prediction. *Biochemistry*, **31**, 983-93.
46. PTITSYN, O.B. & TING, K.L. (1999). Non-functional conserved residues in globins and their possible role as a folding nucleus. *J. Mol. Biol.* **291**, 671-682.
47. PTITSYN, O.B. (1991). How does protein synthesis give rise to the 3D-structure. *FEBS* **285**, 176-181.

48. RAMOS, C.H.I., KAY, M. S. & BALDWIN, R.L. (1999). Putative salt-bridges involved in myoglobin stability. *Biochemistry* **38**, 9783-9790.
49. RAMOS, C.H.I., FERREIRA, S.T. (2005). Protein folding, misfolding and aggregation: evolving concepts and conformational diseases. (Revisão) *Protein Pept. Lett.* **12**, 213-222.
50. REUSS, S., SAALER-REINHARDT, S., WEICH, B., WYSTUB, S., REUSS, M. H., BURMESTER, T. & HANKELN, T. (2002). Expression analysis of neuroglobin mRNA in rodent tissues. *Neuroscience* **115**, 645–656.
51. RICHARDSON, J. & RICHARDSON, D.C. (1988). Amino acid preferences for specific locations at the end of helices. *Science* **240**, 1648-1652.
52. RIBEIRO-JR, E. A. & RAMOS, C. H. I. (2004). Origin of the anomalous circular dichroism spectra of many apomyoglobin mutants. *Anal. Biochem.* **329**, 300-306.
53. RIBEIRO-JR, A. E., 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 Expression and Purification* **28**, 202-208.
54. RIDDLE, D.S., GRANTCHAROVA, V.P., SANTIAGO, J.V., ALM, E., RUCZINSKI, I. & BAKER, D. (1999). Experiment and theory highlight role of native state topology in SH3 folding. *Nature Struct. Biol.* **6**, 1016-1024
55. RÖDER H, ELOVE GA, ENGLANDER SW. (1988). Structural characterization of folding intermediates in cytochrome c by H-exchange labelling and proton NMR. *Nature*; **335**, 700-4.

56. ROSS, E.J.H. LIRA-RUAN, V. ARREDONDO-PETER, R. KLUCAS, R.V. & SARATH, C. (2002). Recent insights into plant hemoglobins. *Rev. Plant Biochem. Biotechnol.* **1**, pp. 173–189.
57. SANTORO, M.M. & 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.
58. SCHMID, F.X. & BALDWIN, R.L. (1979). Detection of an early intermediate in the folding of ribonuclease A by protection of amide protons against exchange. *J Mol Biol*, **135**, 199-215.
59. SCHMIDT, M., GIESSL, A., LAUFS, T., HANKELN, T., WOLFRUM, U., & BURMESTER, T. (2003). How Does the Eye Breathe? *J. Biol. Chem.* **278**, 1932–1935.
60. SERRANO L, NEIRA JL, SANCHO J, FERSHT AR. (1992) Effect of alanine versus glycine in alpha-helices on protein stability. *Nature* **356**, 453-545.
61. SIRANGELO, I, MALMO, C. CASILLO, M.T., 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.
62. SNYDER, G. K. (1983) Respiratory adaptations in diving mammals *Respir. Physiol.* **54**, 269-294.
63. STACKHOUSE, T.M., ONUFFER, J.J., MATTHEWS, C.R., AHMED, S.A. & MILES, E.W. (1988). Folding of homologous proteins: conservation of the folding mechanism of the  $\alpha$  subunit of tryptophan synthase from *Escherichia*

- coli*, *Salmonella typhimurium*, and five interspecies hybrids. *Biochemistry* **27**, 824-832.
64. SUN, Y., JIN, K., MAO, X. O., ZHU, Y., & GREENBERG, D. A. (2001). Neuroglobin is up-regulated by and protects neurons from hypoxic-ischemic injury *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 15306–15311
65. SUN, Y., JIN, K., PEEL, A., MAO, X. O., XIE, L., & GREENBERG, D. A. (2003). Neuroglobin protects the brain from experimental stroke *in vivo* *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 3497–3500
66. TANG, Q., KALSBECK WA, OLSON J.S. & BOCIAN; D.F., (1998). Disruption of the heme iron-proximal histidine bond requires unfolding of deoxymyoglobin. *Biochemistry.* **37**, 7047-56.
67. TRENT, J. T., III, WATTS, R. A., & HARGROVE, M. S. (2001). Human Neuroglobin, a Hexacoordinate Hemoglobin That Reversibly Binds Oxygen. *J. Biol. Chem.* **276**, 30106–30110
68. TSONG, T.Y., BALDWIN, R.L. & ELSON, E.L., (1971). The sequential unfolding of ribonuclease A: detection of a fast initial phase in the kinetics of unfolding. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **68**, 2712-5.
69. UDGAONKAR, J.B., & BALDWIN, R.L. (1988). NMR evidence for an early framework intermediate on the folding pathway of ribonuclease A. *Nature* **335**, 694-699.
70. WATTS, R.A.; HUNT, P.W.; HVITVED, A.N.; HARGROVE, M.S; PEACOCK, W.J. & DENNIS, E.S. (2001). A hemoglobin from plants homologous to truncated hemoglobins of microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 10119–10124.



71. WITTENBERG, B. A., & WITTENBERG, J. B. (1989) Transport of oxygen in muscle. *Annu. Rev. Physiol.* **51**, 857–878
72. ZAPOL, W. M., LIGGINS, G. C., SCHNEIDER, R. C., QVIST, J., SNIDER, M. T., CREASY, R. K., & HOCHACHKA, P. W. (1979). Regional blood flow during simulated diving in the conscious Weddell seal *J. Appl. Physiol.* **47**, 968-973
73. ZHANG, C., WANG, C., DENG, M., LI, L., WANG, H., FAN, M., XU, W., MENG, F., QIAN, L., & HE, F. (2002). Full-length cDNA cloning of human neuroglobin and tissue expression of rat neuroglobin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **290**, 1411–1419
74. NOREN, S. R. & WILLIAMS, T. M. (2000). Body size and skeletal muscle myoglobin of cetaceans: adaptations for maximizing dive duration. *Comparative Biochem and Physiol Part A* **126**, 181-191,

## **8 – CURRICULUM VITAE**

William César Bento Régis (REGIS, W. C.)

### **Formação Acadêmica/Titulação**

2002-2005 Doutorado em Biologia Funcional e Molecular.

Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil

Título: CARACTERIZAÇÃO DAS FORÇAS ENVOLVIDAS NA ESTABILIDADE E  
NA VIA DE ENOVELAMENTO DE GLOBINAS

Orientador: Carlos Henrique Inacio Ramos

Bolsista: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

2000 - 2001 Especialização em Biofísica Molecular.

Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, LNLS, Brasil

Bolsista: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

1996 - 2000 Graduação em Ciências Biológicas.

Universidade do Estado de Minas Gerais, UEMG, Belo Horizonte, Brasil

Bolsista: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

---

### **Prêmios e Títulos**

2001 Premio Eppendorf/BioResearch do Brasil para Estudantes de Iniciação  
Científica, SBBq-Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular

### **Artigos completos publicados em periódicos**

1. REGIS, W. C. B., FATTORI, J., SANTORO, M. M., JAMIN, M., RAMOS, C. H. I. On the difference in stability between horse and sperm whale myoglobins.. Arch Biochem Biophys. , v.436, p.168 - 177, 2005.

2. RAMOS, C. H. I., LIMA JÚNIOR, M. V., BORIN, P. F., SILVA, S. L., REGIS, W. C. B., SANTORO, M. M. Stability and folding studies of the N-domain of troponin C. Evidence for the formation of an intermediate. Arch Biochem Biophys.. , v.427, n.2, p.135 - 142, 2004.

3. PRATES, M. V., SFORCA, M. L., REGIS, W. C. B., LEITE, J. R., SILVA, L. P., PERTINHEZ, T. A., ARAUJO, A. L., SPISINI, A., BLOCH C Jr. The NMR-derived solution structure of a new cationic antimicrobial peptide from the skin secretion of the anuran *Hyla punctata*. J Biol Chem. 2004. , v.279, n.13, p.13018 - 13026, 2004.

4. RIBEIRO E A Jr, REGIS, W. C. B., TASIC, L., RAMOS, C. H. I. Fast purification of the Apo form and of a non-binding heme mutant of recombinant sperm whale myoglobin.. Protein Expr Purif. , v.28, n.1, p.202 - 208, 2003.

5. ARNDT, M. H. L., OLIVEIRA, C. L. P., REGIS, W. C. B., TORRIANI, I., SANTORO, M. M. Small angle x-ray scattering of the hemoglobin from *Biomphalaria glabrata*. Biopolymers. 2003. , v.69, n.4, p.470 - 479, 2003.

6. REGIS, W. C. B., GONÇALVES, M. L. G. S., SANTORO, M. M. Avaliação das potencialidades de um curso prático de bioquímica como ferramenta auxiliar ao ensino teórico em cursos profissionalizantes.. Revista Brasileira de Ensino Em Bioquímica e Biologia Molecular. [www.sbbq.org.br/revista](http://www.sbbq.org.br/revista): , 2001.

### **Outras produções bibliográficas (Apostila):**

1. REGIS, W. C. B., GONÇALVES, M. L. G. E. S.

Curso Prático de Purificação e Análise de Proteínas. Apostila. , 1999.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

---

### **Outras produções**

1. REGIS, W. C. B. ON THE STABILITY AND FOLDING PATHWAY OF HORSE AND SPERM WHALE MYOGLOBINS , 2002. (Apresentação Oral – Reunião Anual de Usuários do LNLS)

2. REGIS, W. C. B., ELISA - Métodos e Análises , 2000. (Simpósio, II Congresso de Patologia Clínica de Contagem)

---

### **Indicadores de produção**

#### **Produção bibliográfica**

Material didático (apostila) 1

Artigos completos publicados em periódicos 6

Trabalhos publicados em anais de eventos 16

Resumos 15 (13 nacionais e 2 internacionais)

Resumos expandidos 1

#### **Apresentações Orais**

Apresentações de Trabalhos 1

Palestra 1