

Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Física “Gleb Wataghin”

Estudo de mudanças conformacionais de macromoléculas em solução usando espalhamento de raio-X

por

JÚLIO CÉSAR DA SILVA

Bacharel em Física (Universidade Estadual de Campinas – 2005)

Orientadora:

Professora Dra. Iris Torriani

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Apresentada no

Instituto de Física “Gleb Wataghin”

da Universidade Estadual de Campinas

como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de

MESTRE EM FÍSICA.

CAMPINAS – SÃO PAULO

FEVEREIRO – 2007

A presente pesquisa foi desenvolvida no Instituto de Física “Gleb Wataghin” da UNICAMP e no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, com recursos próprios e do CNPq.

Documento elaborado com o sistema L^AT_EX

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO IFGW - UNICAMP**

Si38e	<p>Silva, Júlio César da Estudo de mudanças conformacionais de macromoléculas em solução usando espalhamento de raio-X / Júlio César da Silva. -- Campinas, SP : [s.n.], 2007.</p> <p>Orientador: Iris Concepción Linares de Torriani. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Física “Gleb Wataghin”.</p> <p>1. Raios X – Espalhamento a baixo ângulo. 2. Proteínas. 3. Mudanças conformacionais. I. Torriani, Iris Concepción Linares de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Física “Gleb Wataghin”. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">(vsv/ifgw)</p>
-------	--

- **Título em inglês:** Study of conformational changes of macromolecules in solution using X-ray scattering
- **Palavras-chave em inglês (Keywords):**
 1. Small-angle X-ray scattering
 2. Proteins
 3. Conformational changes
- **Área de concentração:** Física
- **Titulação:** Mestre em Física
- **Banca examinadora:**
Prof^a Iris Concepción Linares de Torriani
Prof. Fernando Cerdeira
Prof. Marcelo Matos Santoro
- **Data da defesa:** 26.02.2007
- **Programa de Pós Graduação em:** Física



MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA TESE DE MESTRADO DE JÚLIO CÉSAR DA SILVA – RA 009027 APRESENTADA E APROVADA AO INSTITUTO DE FÍSICA “GLEB WATAGHIN”, DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, EM 26 / 02 / 2007.

COMISSÃO JULGADORA:

Profa. Dra. Iris Concepción Linares de Torriani (Orientadora do Candidato) –
DFMC/IFGW/UNICAMP

Prof. Dr. Marcelo Matos Santoro – ICB - UFMG

Prof. Dr. Fernando Cerdeira – DFMC/IFGW/UNICAMP

Agradecimentos

- À Professora Dra. Íris Torriani pela orientação, ensino, muita paciência e dedicação com o quais foi possível a realização deste trabalho.
- Ao Tomas S. Plivelic e ao Dr. Fernando Queiruga Rey pelo apoio, amizade e ajuda na realização das experiências deste trabalho.
- Ao Dr. Cristiano Luis Pinto de Oliveira pelo apoio, auxílio com os programas computacionais, pelas importantes dicas de trabalhos e pela amizade.
- À minha família que sempre me apoiou em cada passo deste trabalho.
- Aos meus amigos, cujos nomes não estão aqui porque eu precisaria de muitas folhas para caber todos eles, porém saibam que sou extremamente grato a todos.
- À professora Dra. Mônica Alonso Cotta pela participação na banca examinadora de meu Exame de Qualificação de Mestrado e, também, na banca examinadora de meu Seminário de Pré-requisito de Defesa de Tese de Mestrado.
- Ao professor Dr. Douglas Soares Galvão pela participação na banca examinadora de meu Exame de Qualificação de Mestrado.
- Ao professor Dr. Mario Noboru Tamashiro pela participação na banca de meu Seminário de Pré-requisito de Defesa de Tese de Mestrado e, também, pelas correções do texto desta dissertação de mestrado.
- Ao professor Dr. Marcelo Santoro (ICB / UFMG) e ao professor Dr. Fernando Cerdeira (IFGW / UNICAMP), pela participação na banca examinadora do meu seminário de Defesa de Tese de Mestrado.
- Aos funcionários do LCARX, Ana Carolina, Carlos Leite e José Luis.
- Às assistentes sociais Cibele, Patrícia e Sônia, além dos demais funcionários do SAE / UNICAMP pelo apoio durante a realização deste trabalho.

- Aos funcionários da secretaria de pós-graduação do IFGW, funcionários do LNLS, e aos funcionários da biblioteca do IFGW e do LNLS.
- À Dra. Lucia de la Hoz e Dra. Flávia M. Netto, ambas da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp, pela colaboração no trabalho com a proteína β -Lactoglobulina.
- Ao CNPq pelo apoio financeiro.
- Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron pelo uso das instalações experimentais na realização das experiências.
- A todas as pessoas que colaboraram de maneira direta ou indireta para a realização deste trabalho e confecção desta dissertação.

A Deus por tudo.

À minha família pelo apoio, em especial
ao meu pai (*in memoriam*)
e à minha mãe.

À Camila Queiróz pela amizade
incondicional com a qual me
incentivou e me apoiou nos
momentos bons e ruins.

Dedico.

“O que sabemos é uma gota, o que não
sabemos é um oceano”
(Sir Isaac Newton)

Resumo

Durante as últimas décadas, o estudo de mudanças conformacionais de macromoléculas biológicas tem se tornado um grande desafio para os cientistas, além de ser um tema de interesse biotecnológico e de engenharia de proteínas. O processo de enovelamento (desenovelamento) de proteínas tem sido intensivamente estudado, pois isso pode contribuir para o conhecimento do processo de síntese de proteínas, além de ajudar a entender o desenvolvimento de algumas doenças associadas ao mau enovelamento ou agregação de certas proteínas. Nesse contexto, o Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo (SAXS) aparece como uma técnica valiosa para esse estudo, pois ela permite obter informações estruturais da molécula em solução. Além de permitir estudos dinâmicos, as experiências de SAXS possibilitam a observação das moléculas em condições fisiológicas. Neste trabalho, a potencialidade da técnica de SAXS foi evidenciada no estudo de mudanças conformacionais de biomoléculas.

O processo de desnaturação da proteína lisozima em solução foi estudado através de experiências em equilíbrio. Mudanças conformacionais foram observadas durante o processo de desnaturação por ação de uréia na solução e por altas temperaturas. Os resultados mostraram que a lisozima é uma proteína com certa resistência para se desenovelar completamente, mesmo em condições extremas de concentração de uréia e de altas temperaturas. A molécula tende a não perder totalmente sua compacidade. Além disso, foram observados somente dois estados conformacionais (enovelado e desenovelado). Um estado intermediário reportado na literatura, mas contestado por vários autores, não foi observado. Isso mostra a alta cooperatividade dessa proteína no processo de desnaturação.

Outro processo estudado foi a oligomerização da proteína β -Lactoglobulina sob ação de irradiação com radiação gama. A proteína foi estudada na forma sólida, com diferentes atividades de água, e em solução, em diferentes concentrações. As amostras foram irradiadas com radiação gama em diferentes doses e as mudanças foram registradas através de experiências de SAXS. Os dados experimentais foram usados para o cálculo de modelos dos oligômeros formados por ação da radiação.

Concluindo, este estudo mostrou que a técnica de SAXS é uma ferramenta versátil e muito útil para o estudo de processos de mudanças nas estruturas terciária e quaternária de proteínas em solução.

Abstract

During the last decades, the study of conformational changes in biological macromolecules has been a great challenge for the scientists, and continues to be an important subject of biotechnological interest and protein engineering. The process of folding (unfolding) of protein molecules has been intensively studied, because this investigation can contribute to the knowledge of the process of protein synthesis, thus helping to understand the development of some illnesses associated with misfolding or aggregation processes of certain proteins. In this context, the technique of Small Angle X-ray Scattering (SAXS) appears as a valuable technique, because it provides structural information of the molecules in solution. This technique allows dynamical studies and makes possible the study of the protein in physiological conditions. In this work the potentiality of the SAXS technique was evidenced in the study of conformational changes of biological molecules.

The process of denaturation of the protein lysozyme in solution was studied using SAXS measurements in equilibrium conditions. Conformational changes were observed during the process of denaturation by the action of urea in the solution and for high temperatures. The results showed that lysozyme is a protein with certain resistance to unfold completely. Even in extreme conditions of high concentration of urea and high temperatures, this protein does not totally lose its compactness. Moreover, only two conformational states (folded and unfolded) were observed. An intermediate state was not observed. This study showed the high cooperativity of the unfolding process of this protein during its denaturation process.

Another process studied was the oligomerization of the protein β -Lactoglobulin under the effect of gamma irradiation. The protein was studied in the solid form, in different water activities, and in solution, in different concentrations. The samples were exposed to several doses of γ -radiation. The SAXS technique was used to obtain dimensional parameters of the proteins and models were calculated from the experimental scattering data.

Finally, this study showed that the SAXS technique as a versatile and very useful tool for the study of changes in the tertiary and quaternary structures of proteins in solution.

Índice

Agradecimentos	v
Resumo	xi
Abstract	xiii
Índice	xv
Índice de Tabelas	xix
Índice de Figuras	xxi
Introdução	1
1 Revisão Bibliográfica	7
1.1 Teoria de Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo	7
1.1.1 Espalhamento de raios-X por uma partícula	7
1.1.2 Espalhamento de raios-X por partículas em solução	10
1.1.3 Sistemas monodispersos	11
1.1.4 Aproximação de Guinier	11
1.1.5 Aproximação de Porod	13
1.1.6 Formas especiais de partículas (cilíndricas e lamelares)	14
1.1.7 Estimativa do Peso Molecular da partícula	15
1.1.8 Utilizando água como padrão	18
1.1.9 Utilizando uma proteína secundária como padrão	19
1.1.10 Kratky Plot	20
1.1.11 Sistemas polidispersos	20
1.2 Tratamentos dos dados de SAXS	22
1.3 Proteínas	23
1.3.1 Estrutura de proteínas	24
1.3.2 Processos de enovelamento e desenovelamento	25

1.3.3	Escala de tempo do enovelamento de proteínas e o Paradoxo de Levinthal	26
1.3.4	Modelos para o enovelamento de proteínas	26
1.3.5	Equilíbrio entre dois estados globais	30
1.3.6	Transformações induzidas por temperatura	31
2	Desnaturação da lisozima	33
2.1	Introdução	33
2.2	Objetivos	35
2.3	Materiais e métodos	35
2.3.1	Materiais e preparação das amostras	35
2.3.2	SAXS	36
2.4	Análise dos dados	37
2.4.1	Mudanças dos parâmetros estruturais	37
2.4.2	Análise termodinâmica da curva de desnaturação	38
2.5	Resultados	41
2.5.1	Estado nativo da lisozima usado como referência	41
2.5.2	Desnaturação por ação de um desnaturante químico (Uréia)	42
2.5.3	Desnaturação por ação de altas temperaturas	53
2.6	Discussões	64
2.7	Conclusões	67
3	Oligomerização e agregação da β-Lactoglobulina	69
3.1	Introdução	69
3.2	Objetivos	71
3.3	Materiais e Métodos	71
3.3.1	Materiais e Preparação da proteína	71
3.3.2	Tratamento com a radiação gama	72
3.3.3	SAXS	73
3.4	Resultados	73
3.4.1	Proteína irradiada no estado sólido	73
3.4.2	Proteína irradiada em solução	74
3.4.3	Modelando os oligômeros através de elipsóides	75
3.4.4	Modelando os oligômeros com as subunidades da estrutura cristalina da β -Lactoglobulina	76
3.5	Discussões	77
3.6	Conclusões	80
4	Considerações Finais e Sugestão para Futuros Trabalhos	85

Referências 87

Índice de Tabelas

1	Vantagens e limitações dos principais métodos para análise de estruturas de macromoléculas biológicas [Svergun & Koch, 2003].	5
2.1	Resultado dos ajustes termodinâmicos dos dados experimentais da desnaturação da lisozima por uréia na solução sem <i>NaCl</i> em <i>pH</i> 2,9.	47
2.2	Resultado dos ajustes termodinâmicos dos dados experimentais da desnaturação da lisozima por uréia na solução com 50 <i>mM</i> de <i>NaCl</i> em <i>pH</i> 2,9.	53
2.3	Resultado dos ajustes termodinâmicos dos dados experimentais da desnaturação da lisozima por altas temperaturas na solução sem <i>NaCl</i> em <i>pH</i> 2,9.	55
2.4	Resultado dos ajustes termodinâmicos dos dados experimentais da desnaturação da lisozima por altas temperaturas na solução com 50 <i>mM</i> de <i>NaCl</i> em <i>pH</i> 7,0.	64
3.1	Condições experimentais para a preparação das diferentes amostras de β -LG irradiada no estado sólido.	72
3.2	Condições experimentais para a preparação das diferentes amostras de β -LG irradiada em solução.	73
3.3	Resultados de SAXS: Amostras irradiadas no estado sólido.	74
3.4	Resultados de SAXS: Amostras irradiadas solução.	75
3.5	Ajuste dos dados experimentais usando elipsóides elípticos.	75
3.6	Ajuste dos dados experimentais usando modelagem de corpo rígido.	76

Índice de Figuras

1.1	Espalhamento por uma partícula fixa no espaço.	8
1.2	Representação da função $p(r)$ de uma partícula.	10
1.3	Organização hierárquica das estruturas de proteínas.	25
1.4	Processo de enovelamento de dois estados.	27
1.5	Superfície de energia teórica de um funil de enovelamento construída a partir dos dados experimentais para o enovelamento da lisozima.	29
2.1	Estrutura de alta resolução da proteína lisozima obtida através da técnica de cristalografia de raios-X e registrada no Protein Data Bank com o código pdb 6lyz.	35
2.2	Curva de intensidade de espalhamento $I(q)$ e função $p(r)$ calculada a partir da estrutura cristalina da lisozima.	43
2.3	Gráficos mostrando a linearidade das curvas de espalhamento na região de Guinier para os estados nativo e desenovelado da lisozima.	44
2.4	Estado nativo em 0M de uréia e estado desenovelado por 8M de uréia na solução sem NaCl em pH 2,9.	45
2.5	Mudanças conformacionais da lisozima acompanhadas para cada concentração de uréia em solução sem NaCl.	46
2.6	Curva de desnaturação R_g^2 vs. $C_{uréia}$ da lisozima por adição de uréia	48
2.7	Estado nativo em 0 M de uréia e estado desenovelado por 8 M de uréia na solução com 50 mM de NaCl em pH 2,9.	50
2.8	Mudanças conformacionais da lisozima acompanhadas para cada concentração de uréia, em solução com 50 mM de NaCl.	51
2.9	Curva de desnaturação R_g^2 vs. $C_{uréia}$ da lisozima por adição de uréia	52
2.10	Fração de moléculas nos estados nativo e desenovelado durante desnaturação por uréia da lisozima.	54
2.11	Gráficos mostrando a linearidade das curvas de espalhamento na região de Guinier para os estados nativo e desenovelado da lisozima.	56

2.12	Estado nativo a $25^{\circ}C$ e estado desenovelado a $80^{\circ}C$ da lisozima na solução sem $NaCl$ em pH 2,9.	57
2.13	Mudanças conformacionais da lisozima acompanhadas para cada temperatura, em solução a pH 2,9	58
2.14	Curva de desnaturação R_g^2 vs. T da lisozima por ação de altas temperaturas	59
2.15	Estado nativo a $25^{\circ}C$ e estado desenovelado a $80^{\circ}C$ da lisozima na solução com $NaCl$ em pH 7,0.	61
2.16	Mudanças conformacionais da lisozima acompanhadas para cada temperatura, em solução a pH 7,0 com 50 mM de $NaCl$	62
2.17	Curva de desnaturação R_g^2 vs. T da lisozima por ação de altas temperaturas.	63
2.18	Fração de moléculas nos estados nativo e desenovelado durante desnaturação da lisozima por ação de altas temperaturas.	65
3.1	Estrutura de alta resolução da proteína β -Lactoglobulina obtida através da técnica de cristalografia de proteína e registrada no Protein Data Bank com o código PDB 1beb.	71
3.2	Intensidades de SAXS, ajustes teóricos e funções de distribuição de pares de distância para as amostras de β -Lactoglobulina irradiadas no estado sólido. .	81
3.3	Intensidades de SAXS, ajustes teóricos e funções de distribuição de pares de distância para as amostras de β -Lactoglobulina irradiadas em solução. . . .	82
3.4	Curvas de espalhamento calculadas para os modelos oligoméricos das amostras de β -Lactoglobulina irradiadas em solução.	83

Introdução

O estudo de aglomerados, mudanças conformacionais de larga escala ou enovelamento de macromoléculas biológicas são parte de um amplo campo de pesquisa em biofísica [Laughlin *et al.*, 2000]. O mecanismo de enovelamento de proteínas é um dos maiores problemas e um dos maiores desafios na área da biologia estrutural. Numerosos estudos para entender o enovelamento de proteínas têm sido realizados com sucesso usando métodos experimentais e teóricos [Pain, 2000]. Especialmente o modelo do “funil de enovelamento” (“folding funnel”) ou superfície de energia (“energy landscape”), que resultou de estudos teóricos, contribuiu com importantes idéias físicas sobre o processo cinético de enovelamento e estabilidade de proteínas [Pain, 2000; Dill & Chan, 1997; Dinner *et al.*, 2000; Svergun & Koch, 2003]. Para descrever o mecanismo pelo qual as proteínas realmente se enovelam em suas estruturas nativas, é importante observar a natureza detalhada dos processos de enovelamento e desenovelamento sofridos por elas. Hoje em dia, a resolução espacial e temporal dos experimentos tem sido melhorada continuamente. Uma dessas melhorias foi devida ao uso das fontes de radiação síncrotron que abriram um novo horizonte não somente em cristalografia de proteínas, mas também na análise de estrutura de proteínas em solução. As cinéticas de transformação da matéria durante processos biologicamente relevantes de auto-organização, como enovelamento de proteínas, podem proveitosamente ser investigadas pela técnica de Espalhamento a Baixo Ângulo (SAS), tanto de raios-X (SAXS) quanto de nêutrons (SANS) [Svergun & Koch, 2003].

O entendimento do enovelamento de proteínas não tem proporcionado somente um desafio intelectual nas áreas que vão da bioquímica física à mecânica estatística nas últimas décadas, mas obviamente proporciona um imenso potencial de aplicações. Em particular, a solução do problema de enovelamento de proteínas é visto como um importante passo na engenharia de proteínas e no entendimento de algumas doenças associadas com o mau enovelamento de proteínas, como é o caso de algumas doenças neurodegenerativas, ou a formação de placas e fibras amilóides [Rochet & Lansbury, 2000].

No nível fundamental, o interesse considerável que o enovelamento de proteínas está atraindo tem sido freqüentemente justificado pelo paradoxo de Levinthal [Levinthal, 1969],

expressando que o estado enovelado de uma proteína não pode ser alcançado de maneira aleatória nos tempos típicos de enovelamento. Uma descrição dos caminhos seguidos por uma proteína durante o processo de enovelamento foi recentemente apresentado por Doniach [2001] usando experiências de SAXS. Nos trabalhos deste autor, o tratamento dos dados experimentais foi realizado aplicando a análise de “Singular Value Decomposition” (SVD) [Golub & Reinsh, 1970; Press *et al.*, 1992], a qual fornece características dos diferentes estados. Em geral, existe uma limitação experimental para a detecção dos estados de enovelamento. Dados de SAXS somente podem ser coletados em intervalos de tempo maiores que 0,1 ms. Vários sistemas para estudar a amostra com fluxo contínuo ($>0,1\text{ms}$) [Pollack *et al.*, 2001; Akiyama *et al.*, 2002], stopped-flow ($>20\text{ms}$) [Tsuruta *et al.*, 1989] e de mistura manual têm sido usados. Os aparelhos de mistura rápida usados para resoluções temporais menores de 20 ms são aparelhos de fluxo contínuo microfabricados [Tsuruta *et al.*, 1989; Pollack *et al.*, 1999; Pollack *et al.*, 2001; Akiyama *et al.*, 2002], que são transladados em relação ao feixe de raios-X fixo para coletar padrões de espalhamento em diferentes pontos ao longo da coordenada de reação. A maioria das experiências lentas ($>50\text{ms}$) tem sido feita com detectores a gás. Os detectores usados em experiências de cinética rápida são CCD [Pollack *et al.*, 1999] ou sistemas de CCD/intensificador de imagem [Amemiya *et al.*, 1995]. No primeiro caso, correções devem ser feitas pela resposta não uniforme e distorção da imagem, enquanto que, no segundo caso, uma correção adicional pela redução de contraste é necessária. A validade das correções pode ser verificada pela comparação destes dados com aqueles obtidos com um detector a gás sensível à posição, corrigidas por suas inomogeneidades [Fujisawa *et al.*, 1999; Arai *et al.*, 2002; Pontoni *et al.*, 2002].

A atual visão do enovelamento *in vitro* é que as proteínas e ácidos nucléicos enovelam seguindo um caminho contido numa superfície afunilada de energia (“funnelled landscape”) [Plotkin & Onuchic, 2002; Plotkin & Wolynes, 2003]. O enovelamento é visto como começando de estados desenovelados no topo de um funil de energia seguidos por um colapso inicial até estados intermediários e uma busca restrita pelo estado nativo no fundo do funil. O atual modelo para os intermediários “molten globule” é aquele que, não somente mantém algumas características estruturais da estrutura secundária do estado nativo, mas também preserva o padrão de enovelamento da conformação nativa, entretanto, faltaria o empacotamento das cadeias polipeptídicas e não chegariam a possuir a compacidade da conformação do estado nativo [Ptitsyn, 1993].

O enovelamento de proteínas e RNA é claramente uma área onde algum trabalho sistemático ainda é requerido antes de se tornar possível, mesmo qualitativamente, relacionar as observações experimentais a modelos teóricos. Deveria também ser mantido em mente que o significado fisiológico dos estudos *in vitro*, especialmente para proteínas, é limitado

pelo fato de que o enovelamento in vivo e as condições de processamento diferem significativamente das condições in vitro devido, entre outros, ao fato que as cadeias polipeptídicas se enovelam durante suas sínteses no ribossomo e/ou com a intervenção de outras proteínas (as chaperonas) [Svergun & Koch, 2003].

As chaperonas são, em biologia, proteínas cuja função é auxiliar outras proteínas a alcançar o enovelamento adequado. Muitas chaperonas são do tipo "Heat Shock Protein" (Hsp), isto é, proteínas que atuam em resposta às temperaturas elevadas ou outros estresses celulares [Mayer & Bukau, 2005]. A razão para esse comportamento é que o enovelamento de proteínas é severamente afetado pelo calor e, portanto, algumas chaperonas atuam para reparar os possíveis danos causados pelo mau-enovelamento ("misfolding"). Outras chaperonas estão envolvidas no enovelamento tão logo as proteínas são sintetizadas no ribossomo. Apesar da maioria das proteínas recém sintetizadas poderem se enovelar na ausência de chaperonas, uma minoria requer a presença delas [Fenton & Horwich, 2003; Mayer & Bukay, 2005]. Devido ao alto peso molecular dessas chaperonas a técnica de SAXS se torna uma valiosa ferramenta para o estudo das conformações e da estrutura dessas proteínas. Inclusive, é uma técnica singular para estudar os complexos formados entre as próprias chaperonas e delas com outras proteínas que necessitam de sua ajuda para atingir o enovelamento adequado. Muitos trabalhos estão sendo feitos nos estudos das chaperonas e co-chaperonas utilizando várias técnicas biofísicas [Fan *et al.*, 2003; Song & Masison, 2005; Carrigan *et al.*, 2006] e alguns já usando a técnica de SAXS [Borges *et al.*, 2005].

Durante as últimas décadas, SAXS e SANS têm se tornado ferramentas crescentemente importantes no estudo de macromoléculas biológicas. Esse processo tem sido acelerado pela ampla acessibilidade aos instrumentos de pesquisa em instalações de larga escala, além dos recentes e poderosos programas de computador para análise de dados de SAXS disponíveis para os pesquisadores da área [Svergun & Koch, 2003]. Várias fontes síncrotron de terceira geração, onde os padrões de espalhamento podem ser coletados em menos de um segundo, tem se tornado disponíveis recentemente (ESRF, Grenoble; Spring-8; Himeji; APS, Argonne), e várias outras fontes síncrotron de baixa emitância também estão disponíveis (Petra, Alemanha; LNLS, Brasil; Diamond, Reino Unido). Todas essas fontes possuem linhas de luz Síncrotron dedicadas à técnica de SAXS para o estudo de matéria condensada mole ou biológica. A maioria das instalações de larga escala mantém programa de suporte ao usuário para ajudá-los a coletar e, algumas vezes, analisar seus dados, enquanto que muitos programas de modelagem estão publicamente disponíveis na WEB [Svergun, <http://www.embl-hamburg.de/ExternalInfo/Research/Sax/software.html>]. Métodos para a análise de estruturas em equilíbrio, especialmente para soluções monodispersas e misturas, estão agora bem desenvolvidos. Entretanto, há ainda muito mais para ser feito antes das rotinas de aplicação

incorporarem casos mais complicados envolvendo soluções para os estudos resolvidos no tempo e de partículas interagentes.

SAXS é freqüentemente empregada em combinação com outros métodos bioquímicos e estruturais para gerar modelos consistentes. Mesmo sem uma análise avançada, padrões de SAXS podem ser usados para corrigir as amplitudes de Fourier em crio-ME (microscopia eletrônica) [Thuman-Commike, 1999; Gabashvili, 2000; Saad, 2001] e para restringir os modelos de proteínas enoveladas construídas por algoritmos de predição da estrutura [Zheng & Doniach, 2002]. Envelopes ab initio têm sido empregados para sincronizar a fase de reflexões de baixa resolução na cristalografia de proteínas [Hao *et al.*, 1999; Hao, 2001], e modelos "Dummy Residues" mais detalhados deveriam ser ainda mais úteis para essa finalidade [Aparício *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2003].

Finalizando, o mais importante aspecto da técnica de SAS é que ela permite o estudo de proteínas em seu estado nativo em soluções quase fisiológicas e analisar mudanças estruturais em resposta a variações das condições externas. Desse modo, ela fornece informações valiosas sobre a relação entre essas mudanças estruturais e o funcionamento desses sistemas. Uma comparação de SAXS/SANS com outros métodos principais empregados na análise de estruturas macromoleculares (tabela 1) indica que, apesar de sua baixa resolução, o método é uma ferramenta geral para estudo de estruturas, processos cinéticos e interações de macromoléculas em solução.

Tabela 1: Vantagens e limitações dos principais métodos para análise de estruturas de macromoléculas biológicas [Svergun & Koch, 2003].

Método	Amostras	Vantagens	Limitações
Cristalografia	Cristais	Muito alta resolução (até 1 Å) revelando detalhes finos da estrutura atômica (por exemplo, dos centros ativos).	Cristais são necessários. Porções flexíveis não são vistas e a estrutura pode ser influenciada pelas forças de empacotamento do cristal.
Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	Soluções diluídas (de ~ 5 a 10 mg/mL).	Alta resolução (2 a 3 Å) em solução.	Difícilmente aplicável para moléculas de peso molecular excedendo a ~ 50 kDa.
Crio-ME	Soluções congeladas muito diluídas (<1 mg/mL).	Pequena quantidade de amostra. Visualização direta da forma e simetria da partícula.	Baixa resolução (~ 10 Å). Difícilmente aplicável para molécula de peso molecular menor que ~200 kDa.
Viscosidade [Karplus & Weaver, 1976]	Soluções diluídas e semi-diluídas.	Não destrutiva. Análise dinâmica das mudanças conformacionais.	Não fornece parâmetros estruturais diretamente.
Espalhamento de luz dinâmico e estático, ultra centrifugação.	Soluções muito diluídas (<1 mg/mL).	Não destrutiva. Pequena quantidade de material. Simplicidade de experiências.	Fornecer parâmetros gerais somente.
SAXS/SANS	Soluções diluídas ou semi-diluídas (de ~ 1 a 100 mg/mL).	Análise de estrutura, cinética e interações entre partículas em condições quase fisiológicas. Estudo de misturas e sistemas em condições de não-equilíbrio. Amplo intervalo de peso molecular (poucos kDa a centenas de MDa).	Baixa resolução (~ 10 a 20 Å). Requer informação adicional para resolver ambigüidades na construção dos modelos.

1

Revisão Bibliográfica

1.1 Teoria de Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo

1.1.1 Espalhamento de raios-X por uma partícula

Aqui é apresentado um resumo da teoria de SAXS (Small Angle X-ray Scattering) com as principais equações, entretanto, maiores detalhes podem ser encontrados nas referências Guinier & Fournet [1955], Glatter & Kratky [1982], Feigin & Svergun [1987] e Svergun & Koch [2003]. O espalhamento de raios-X pela matéria é quase inteiramente determinado pela interação da radiação incidente com os elétrons. Considerando o enorme número de elétrons e o fato de que um simples elétron não pode ser exatamente localizado, é conveniente introduzir o conceito de densidade de elétrons, $\rho(\vec{r})$, definida como o número de elétrons por unidade de volume na partícula espalhadora. Dessa forma, considerando o espalhamento de uma partícula em uma posição fixa no espaço, como na figura 1.1, temos o seguinte formalismo. A amplitude de espalhamento dessa partícula é uma função complexa definida pela equação:

$$F(\vec{q}) = \iiint_V \rho(\vec{r}) e^{-i\vec{q}\cdot\vec{r}} dV \quad (1.1)$$

onde aparece o vetor de espalhamento \vec{q} . Esse vetor de espalhamento fornece a direção do feixe espalhado pela partícula e é definido pela equação:

$$\vec{q} = \frac{2\pi}{\lambda} (\vec{s} - \vec{s}_0) \quad (1.2)$$

onde \vec{s} e \vec{s}_0 são os versores que definem a direção do feixe espalhado e incidente, respectivamente, como mostrado na figura 1.1.

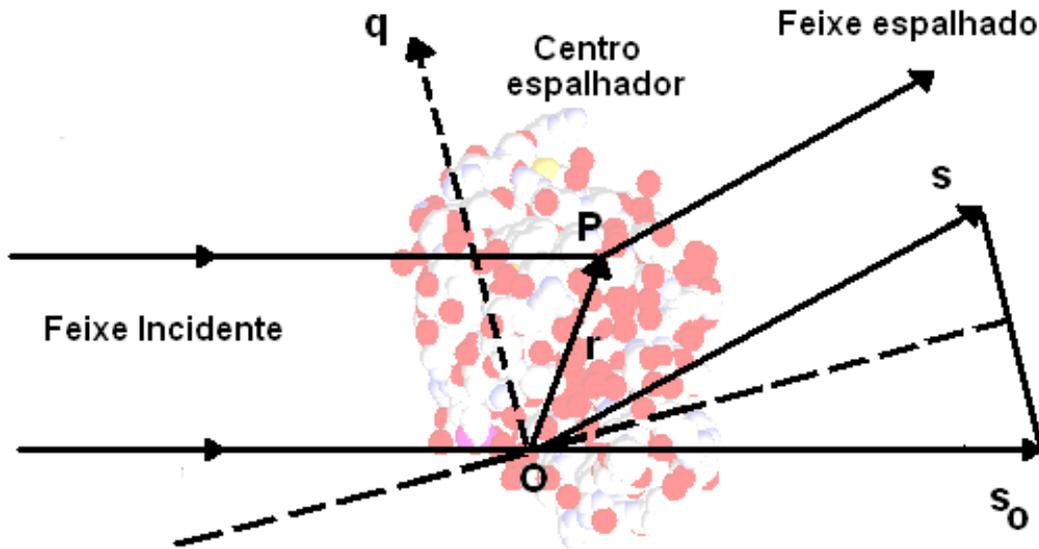


Figura 1.1: Espalhamento por uma partícula fixa no espaço.

Segundo a definição feita na equação (1.1), a amplitude de espalhamento em função do vetor transferência de momento é a transformada de Fourier da distribuição de densidade eletrônica. A intensidade de espalhamento é, então, dada por $I(\vec{q}) = F(\vec{q})F^*(\vec{q})$. Utilizando a equação (1.1) da amplitude de espalhamento temos:

$$I(\vec{q}) = F(\vec{q})F^*(\vec{q}) = \iiint_V \gamma(\vec{r})e^{-i\vec{q}\cdot\vec{r}} dV \quad (1.3)$$

onde o sinal * denota conjugação complexa. Na equação (1.3) aparece a função de autocorrelação definida por [Glatter & Kratky, 1982]:

$$\gamma(\vec{r}) = \iiint_{V_1} \rho(\vec{r}_1)\rho(\vec{r}-\vec{r}_1) dV_1 \quad (1.4)$$

onde \vec{r}_1 é um vetor posição que percorre o elemento de volume dV_1 dentro da partícula.

Esse resultado nos fornece o espalhamento por uma partícula fixa no espaço. Entretanto, no estudo de partículas em solução elas estão aleatoriamente orientadas. Dessa forma, podemos reescrever a intensidade de espalhamento de uma partícula aleatoriamente orientada no espaço calculando a média da intensidade na equação (1.3) em um ângulo sólido

$d\Omega = \text{sen}\theta' d\theta' d\varphi'$ no espaço recíproco [Feigin & Svergun, 1987]:

$$I(\vec{q}) = \langle I(\vec{q}) \rangle_{\Omega} = 4\pi \int_0^{\infty} r^2 \gamma(r) \frac{\sin(qr)}{qr} dr \quad (1.5)$$

onde $\gamma(r)$ é a função de correlação média calculada em um ângulo sólido $d\varpi = \text{sen}\theta d\theta d\varphi$ no espaço real:

$$\gamma(\vec{q}) = \langle \gamma(\vec{q}) \rangle_{\varpi} = \frac{1}{2\pi^2} \int_0^{\infty} q^2 I(q) \frac{\sin(qr)}{qr} dq. \quad (1.6)$$

A função $\gamma(r)$ é comumente chamada de função característica da partícula e representa a probabilidade de encontrar um ponto dentro da partícula em uma distância r de um dado outro ponto. Dessa forma, podemos definir uma nova função chamada função distribuição de pares de distâncias, $p(r)$, dentro da partícula:

$$p(r) = r^2 \gamma(\vec{q}) = \frac{1}{2\pi^2} \int_0^{\infty} r^2 q^2 I(q) \frac{\sin(qr)}{qr} dq. \quad (1.7)$$

Essa função $p(r)$ representa um histograma de pares de distâncias dentro de uma partícula. Se dividirmos a partícula em um número muito grande de elementos idênticos e infinitesimais de volume, a função $p(r)$ é proporcional ao número de linhas com comprimento r e $r + dr$ que são encontradas na combinação de qualquer elemento de volume i e qualquer outro elemento de volume j da partícula, como está exemplificada na figura (1.2) [Glatter & Kratky, 1982].

Podemos reescrever as equações (1.5) e (1.7) para $I(q)$ e $p(r)$, respectivamente, da seguinte forma:

$$I(\vec{q}) = \langle I(\vec{q}) \rangle_{\Omega} = 4\pi \int_0^{\infty} p(r) \frac{\sin(qr)}{qr} dr \quad (1.8)$$

$$p(r) = r^2 \gamma(\vec{q}) = \frac{1}{2\pi^2} \int_0^{\infty} r q I(q) \sin(qr) dq \quad (1.9)$$

que nos revela uma importante relação entre essas duas funções. Notamos que a função $p(r)$ é a transformada de Fourier inversa da função intensidade $I(q)$ e, obviamente, $I(q)$ é a transformada de Fourier direta de $p(r)$. A importância dessa relação é que tendo uma das duas, a outra é obtida por uma transformada de Fourier (direta ou inversa). A função $p(r)$ está no espaço real e nos fornece uma noção mais intuitiva da forma da partícula que a

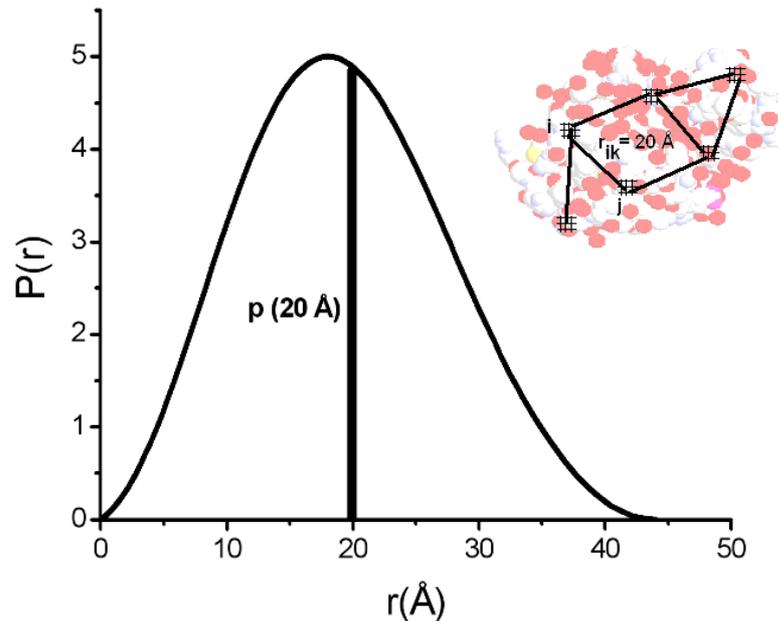


Figura 1.2: Representação da função $p(r)$ de uma partícula. A probabilidade de encontrar pares de distâncias com $r = 20 \text{ \AA}$ entre elementos i e j (unidades arbitrárias) dentro da molécula é mostrada

função $I(q)$, que está no espaço recíproco. Entretanto, o que obtemos experimentalmente é a função $I(q)$.

1.1.2 Espalhamento de raios-X por partículas em solução

Agora é preciso impor condições que permitam usar as equações (1.8) e (1.9) para o estudo de partículas em solução por SAXS. Em primeiro lugar percebemos que em solução a partícula possui uma orientação aleatória e em segundo lugar que, geralmente, não temos somente uma partícula em solução, mas sim N partículas aleatoriamente orientadas. Outro aspecto importante é que as partículas estão imersas em um líquido (um solvente) que também possui sua densidade eletrônica. Então, para uma solução de N partículas idênticas não interagentes por unidade de volume, a intensidade de espalhamento pode ser expressa como:

$$I(q) = N \left\langle \left| \int_V (\rho(\vec{r}) - \rho_s) e^{-i\vec{q}\cdot\vec{r}} dV \right|^2 \right\rangle_{\Omega} \quad (1.10)$$

onde ν é o volume da partícula, $\rho(\vec{r})$ é sua densidade eletrônica e ρ_s é a densidade eletrônica do solvente considerada constante. Portanto, o que realmente contribui para o espalhamento

é o contraste de densidade eletrônica $\rho(\vec{r}) - \rho_s$. A representação $\langle \rangle_\Omega$ significa uma média sobre ângulos no espaço recíproco.

1.1.3 Sistemas monodispersos

Se o sistema de partículas em solução for um sistema monodisperso, ou seja, todas as partículas têm a mesma forma e tamanho, podemos escrever a intensidade espalhada por um conjunto de partículas em solução como [Feigin & Svergun, 1987; Glatter & Kratky, 1982]:

$$I(q) = NF^2(q)S(q) \quad (1.11)$$

onde $F^2(q) = \langle F^2(\vec{q}) \rangle_\Omega$ é o fator de forma da partícula, obviamente relacionado com sua forma, e $S(q) = \langle S(\vec{q}) \rangle_\Omega$ é o fator de estrutura do sistema, relacionado com as interações entre as partículas em solução.

Se tratamos o caso de uma solução suficientemente diluída podemos fazer a aproximação $S(q) \approx 1$ e escrever a intensidade espalhada pelo sistema como:

$$I(q) = NF^2(q), \quad (1.12)$$

ou seja, a intensidade $I(q)$ é proporcional ao fator de forma médio de cada partícula $F^2(q)$, que por sua vez, é a intensidade espalhada por uma partícula, $i_1(q) = F^2(q)$.

1.1.4 Aproximação de Guinier

Para pequenos valores de q , a equação (1.8) pode ser expandida em potências de q , o que dá origem à bem conhecida aproximação de Guinier [Guinier & Fournet, 1955]:

$$I(q) = I(0) \exp\left(-\frac{q^2 R_g^2}{3}\right) \quad (1.13)$$

ou, na forma linearizada,

$$\ln I(q) = \ln I(0) - \frac{q^2 R_g^2}{3} \quad (1.14)$$

onde o raio de giro R_g de uma partícula é dado por:

$$R_g^2 = \frac{\int_V r^2 (\rho(\vec{r}) - \rho_s) dV}{\int_V (\rho(\vec{r}) - \rho_s) dV} \quad (1.15)$$

e a intensidade em $q = 0$ pode ser expressa como [Feigin & Svergun, 1987; Glatter & Kratky, 1982]:

$$I(0) = \frac{cM}{N_A} \left(\frac{m_p N_A}{M} - \rho_s \bar{v}_p \right)^2 \quad (1.16)$$

onde N_A é o número de Avogadro, c é a concentração das partículas (massa/volume) em solução, M é a massa molar de cada partícula, m_p é o número de elétrons da partícula seca e \bar{v}_p é o volume específico parcial da partícula, isto é, o volume por unidade de massa ocupado pela partícula dentro do solvente.

A aproximação de Guinier na equação (1.13) é válida somente quando a contribuição do próximo termo na expansão de potências de $I(q)$ é desprezível. O coeficiente do termo em q^4 envolve momentos de mais alta ordem do contraste de densidade eletrônica $\Delta\rho = \rho(\vec{r}) - \rho_s$. Quando uma partícula tem uma estrutura compacta, o domínio de valores de q no qual essa lei é válida deve ser observado. Na prática, $\ln(I(q))$ é ajustado por uma reta como função de q^2 para valores de q tais que $qR_g < 1$, rendendo valores de $I(0)$ e R_g de maneira direta da equação (1.14). Essa parte linear no início das curvas experimentais de espalhamento é um indicativo de monodispersidade das partículas espalhadoras. Essa análise é realizada em todos os estudos para verificar a monodispersidade do sistema em estudo.

A função $p(r)$ também permite obter o raio de giro e a intensidade na origem utilizando as seguintes expressões:

$$R_g^2 = \frac{\int_0^{D_{máx}} r^2 p(r) dr}{2 \int_0^{D_{máx}} p(r) dr} \quad (1.17)$$

e

$$I(0) = \int_0^{D_{máx}} p(r) dr \quad (1.18)$$

onde $D_{máx}$ é a máxima dimensão da partícula obtida para o valor de r tal que $p(r) = 0$. Esses cálculos alternativos de R_g e $I(0)$ são de interesse porque são independentes de qualquer

modelo. A comparação dos valores resultantes das aproximações obtidas a partir da lei de Guinier fornece uma validação dos resultados.

Entretanto, se as partículas espalhadoras contêm distâncias internas grandes, o termo em q^4 da expansão em série de potências de q da equação (1.8) se torna significativo para valores pequenos de q , o que é suficiente para tornar a aproximação de Guinier uma aproximação sem uso prático. Tem sido mostrado [Calmettes et al., 1994] nesse caso, que a função de espalhamento é bem descrita no domínio $qR_g < 3$ pela equação de Debye [Debye, 1947]:

$$\frac{I(q)}{I(0)} = \frac{2}{x^2}(x - 1 - e^{-x}) \quad (1.19)$$

onde $x = q^2 R_g^2$. Essa relação é a expressão analítica correta para uma cadeia Gaussiana infinitamente fina, sem comprimento de persistência (isto é, sem rigidez devido às interações de curto alcance entre os monômeros). Entretanto, essa relação permanece válida em uma região restrita de valores de q no caso de uma cadeia de volume excluído ou com comprimento de persistência.

1.1.5 Aproximação de Porod

Nós agora consideramos o comportamento de $I(q)$ quando q tende a infinito. Integrando duas vezes por partes a equação (1.8) e lembrando que $\gamma(r) = 0$ se $r \geq D_{max}$, temos:

$$I(q) = -\frac{8\pi}{q^4}\gamma'(0) + \frac{O_1}{q^3} + \frac{O_2}{q^4} + O(q^{-5}) \quad (1.20)$$

onde $\gamma'(0)$ é a derivada de $\gamma(r)$ para $r = 0$ e O_1 e O_2 são termos trigonométricos oscilantes da forma $\sin(qD_{max})$ [Svergun & Koch, 2003]. Todos os termos proporcionais a q^{-3} e q^{-4} , exceto o primeiro, são oscilatórios de tal forma que o termo principal responsável pelo decaimento de intensidade em altos valores de q é dado por:

$$I(q) \approx -\frac{8\pi}{q^4}\gamma'(0). \quad (1.21)$$

Além disso, para partículas homogêneas, $\gamma'(0)$ é igual a $-[(\Delta\rho)^2 S/4]$ onde S é a superfície da partícula [Feigin & Svergun, 1987]. Sendo assim, substituindo $\gamma'(0)$ na equação (1.21), temos:

$$I(q) \approx -\frac{2\pi}{q^4}(\Delta\rho)^2 S. \quad (1.22)$$

Essa relação é conhecida como Lei de Porod e foi obtida independentemente por Debye & Bueche [1949] e por Porod [1951]. Outra função importante denominada invariante de Porod [Svergun & Koch, 2003] é definida como:

$$Q = \int_0^\infty q^2 I(q) dq = 2\pi^2 \int_V (\Delta\rho(\vec{r}))^2 dV \quad (1.23)$$

onde as integrais do espaço real e recíproco são iguais devido ao Teorema de Parseval aplicado à equação (1.10). Para partículas homogêneas:

$$Q = 2\pi^2(\Delta\rho)^2 V \quad (1.24)$$

e levando em conta que $I(0) = (\Delta\rho)^2 V^2$, o volume excluído da partícula (Volume de Porod) é:

$$V = 2\pi^2 \frac{I(0)}{Q}. \quad (1.25)$$

Conseqüentemente, o comportamento assintótico da curva de intensidade normalizada também permite estimar a superfície específica da partícula como:

$$\frac{s}{V} = \left(-\frac{\pi}{Q} \right) \lim_{q \rightarrow \infty} (q^4 I(q)). \quad (1.26)$$

Note que, graças ao invariante de Porod, ambos os parâmetros podem ser obtidos dos dados em escala relativa.

1.1.6 Formas especiais de partículas (cilíndricas e lamelares)

Formas cilíndricas

Espalhamento de partículas com dimensões L consideravelmente maiores ao longo de uma direção particular, digamos o eixo z , têm características específicas [Feigin & Svergun, 1987]. Nós podemos considerar que a distribuição de densidade eletrônica em uma seção transversal perpendicular ao eixo z não depende de z , isto é, $\rho(x, y, z) = \rho(x, y)f(z, L)$. Dessa forma podemos separar a intensidade de espalhamento em dois fatores tal que:

$$I(q) = L \frac{\pi}{q} I_c(q) \quad (1.27)$$

onde $I_c(q)$ corresponde ao espalhamento da seção transversal cilíndrica da partícula. Sendo assim, para partículas alongadas, o raio de giro da seção transversal R_c pode ser obtido usando a lei de Guinier graficando $\ln[qI(q)]$ vs. q^2 onde, para pequenos valores de q , temos:

$$qI(q) \cong I_c(0) \exp\left(-\frac{q^2 R_c^2}{2}\right). \quad (1.28)$$

Formas lamelares

Da mesma forma, a intensidade de espalhamento de partículas com forma lamelar pode ser separada em duas componentes devidas às seções transversais, que são muito maiores que a terceira [Feigin & Svergun, 1987] e se nós escrevemos a densidade na forma

$\rho(x, y, z) = \rho(x)f(y, L_y)f(z, L_z)$, então nós teremos:

$$I(q) = \frac{2\pi S_l}{q^2} I_t(q) \quad (1.29)$$

onde S_l corresponde à área da seção transversal da lamela. Assim como feito antes para partículas alongadas, o raio de giro da seção transversal R_t de partículas achatadas pode ser obtido usando a representação gráfica $\ln[q^2 I(q)]$ vs. q^2 onde, para pequenos valores de q , temos:

$$q^2 I(q) \cong I_t(0) \exp\left(-q^2 R_t^2\right). \quad (1.30)$$

1.1.7 Estimativa do Peso Molecular da partícula

Outro importante parâmetro para o estudo de partículas em solução que pode ser obtido dos dados de SAXS é o peso molecular da partícula. Ele é obtido utilizando o valor da intensidade de espalhamento para $q = 0$. Entretanto, $I(0)$ é um valor que não pode ser medido experimentalmente de uma maneira direta, tal que uma extrapolação dos dados experimentais para o valor nulo de q deve ser feita.

O comprimento de espalhamento b de um átomo é uma função estocástica que, para espalhamento de raios-X, depende linearmente do número total de elétrons, isto é, do número

atômico. O comprimento de espalhamento de um elétron é dado pelo raio clássico do elétron r_0 :

$$r_0 = \frac{e^2}{m_e c^2} = 0.28179 \times 10^{-12} \text{ cm}. \quad (1.31)$$

onde $e^2 = \frac{q^2}{4\pi\epsilon_0}$ [Glatter, 1990] (q é a carga eletrônica).

O valor da intensidade na origem, $I(0)$, é determinado pelo comprimento de espalhamento total da partícula, isto é, pela soma dos comprimentos de espalhamento de todos os átomos dentro da partícula. Portanto, conhecendo a composição química de uma molécula, o cálculo de $I(0)$ permite determinar a massa molecular M [Orthaber et al., 2000].

Para conhecer a relação entre $I(0)$ e a massa molecular da partícula é preciso introduzir a seção de choque de espalhamento de um espalhador que é definida por [Orthaber *et al.*, 2000]:

$$\sigma = \frac{\text{Energia espalhada}}{\text{Energia incidente por unidade de área}}. \quad (1.32)$$

É conveniente também definir uma seção de choque macroscópica de espalhamento Σ , que é obtida multiplicando σ pela densidade de partículas $n = N/V$:

$$\frac{d\Sigma}{d\Omega} = n \frac{d\sigma}{d\Omega}. \quad (1.33)$$

onde $d\Sigma/d\Omega$ é dada em unidades de cm^{-1} , que resulta das dimensões de σ (cm^2), sendo o quadrado do comprimento de espalhamento (cm), e de n (cm^{-3}). Quando estudamos o espalhamento de soluções de macromoléculas ou outros agregados coloidais podemos introduzir a densidade de comprimento de espalhamento ρ (cm^{-2}):

$$\rho = \left(\frac{1}{V_1}\right) \sum_j b_j \quad (1.34)$$

onde V_1 é o volume da partícula b_j é o comprimento de espalhamento do átomo j . Nas equações (1.1) e (1.4), ρ está expressa em unidades de número de elétrons por unidade de volume, já aqui a função ρ é expressa, por conveniência, em unidades de comprimento de espalhamento por unidade de volume da partícula, porém essas funções são conceitualmente as mesmas. A seção de choque total de um conjunto de partículas é dada por:

$$\frac{d\Sigma(q)}{d\Omega} = n \left(\sum_j b_j \right)^2 P(q) \quad (1.35)$$

onde $P(q)$ é o fator de forma normalizado. Introduzindo a massa de uma partícula M_1 , nós podemos expressar a densidade de partículas n em função de c/M_1 , onde c é a concentração do soluto em massa por unidade de volume. Definindo o volume específico parcial \bar{v} (cm^3g^{-1}) como $\bar{v} = V_1/M_1$, nós obtemos:

$$\frac{d\Sigma(q)}{d\Omega} = n\rho^2\bar{v}^2 M_1 P(q). \quad (1.36)$$

Conseqüentemente, o contraste de densidade de comprimento de espalhamento da molécula com o solvente resulta em:

$$\Delta\rho = \left(\frac{1}{V_1} \right) \left(\sum_j b_j \right) - \rho_{solv.} = \left(\frac{1}{M_1\bar{v}} \right) \left(\sum_j b_j \right) - \rho_{solv.} \quad (1.37)$$

Considerando o contraste de espalhamento por massa, $\Delta\rho_M = \bar{v}\Delta\rho$ (cm/g), nós finalmente chegamos a:

$$\frac{d\Sigma(q)}{d\Omega} = c\Delta\rho_M^2 M_1 P(q) = c\Delta\rho_M^2 \frac{M}{N_A} P(q) \quad (1.38)$$

e

$$\Delta\rho_M = \left(\frac{1}{M_1} \right) \left(\sum_j b_j \right) - \rho_{M,solv} \quad (1.39)$$

onde M é a massa molar e N_A é o número de Avogadro. Portanto, uma vez que os dados de espalhamento estão na chamada escala absoluta e considerando que o fator de forma $P(q)$ esteja normalizado, isto é, $P(0) = 1$, é bastante fácil obter a massa de uma partícula M_1 ou o peso molecular M a partir da expressão:

$$M = \frac{d\Sigma(0)}{d\Omega} \left(\frac{N_A}{c\Delta\rho_M^2} \right) = M_1 N_A. \quad (1.40)$$

Como foi mencionada, a medida dos dados em escala absoluta é a principal tarefa para a determinação do valor de M [Orthaber *et al.*, 2000]. Todavia, a medida da intensidade absoluta, que é a razão da intensidade de espalhamento da molécula pela intensidade espalhada por um elétron, não é tarefa fácil. Portanto, existem dois métodos diferentes para

obter a escala absoluta. O primeiro deles é um método direto, consistindo de um mecanismo de atenuação do feixe primário por discos rotatórios [Kratky & Wawra, 1963] ou uma fenda móvel [Stabinger & Kratky, 1978]. Entretanto, essa atenuação mecânica não é muito útil com detectores sensíveis à posição [Russell, 1983].

A segunda maneira é o método indireto, usando padrões secundários calibrados como Lupolen, carvão vítreo, água e outros. A água é especialmente útil como padrão de calibração porque seu espalhamento é independente do ângulo de espalhamento, dependendo somente da temperatura. Ainda podemos utilizar uma proteína estável e já bem caracterizada, cujo peso molecular é conhecido, como padrão secundário para a determinação direta do valor de M , sem precisar calibrar a intensidade para uma escala absoluta antes. Detalhes serão discutidos a seguir.

1.1.8 Utilizando água como padrão

A essencial vantagem da água é que seu espalhamento, além de independe do ângulo, depende somente da propriedade física de compressibilidade isotérmica. Isso pode ser muito útil na calibração da escala de intensidade. Entretanto, o espalhamento da água é muito fraco e, portanto, uma consideração cuidadosa da absorção e do espalhamento do branco da câmara é necessária [Orthaber *et al.*, 2000].

A dependência da seção de choque da água com a compressibilidade isotérmica aparece para maiores valores de ângulos de espalhamento como:

$$\frac{d\Sigma}{d\Omega} = \rho^2 kT \chi_T \quad (1.41)$$

onde ρ é a densidade de comprimento de espalhamento e χ_T é a compressibilidade isotérmica. A intensidade de espalhamento constante da água é $1,632 \times 10^{-12} \text{ cm}^{-1}$ em 20°C (293 K), com $\chi_T = 4,58 \times 10^{-10} \text{ Pa}^{-1}$. É importante notar que a compressibilidade da água é uma função da temperatura T [Bosio *et al.*, 1989; Fritz *et al.*, 2000]. Tabelas com os valores para a compressibilidade da água e $I(0)_{\text{água}}$ podem ser encontradas em <http://PhysChem.kfunigraz.ac.at>. Com esses valores é possível obter o espalhamento da amostra em relação ao espalhamento da água e transformar a escala dos dados de espalhamento da amostra para a escala absoluta. Sendo assim, para obter $d\Sigma/d\Omega$ da amostra em escala absoluta fazemos [Orthaber *et al.*, 2000]:

$$\left[\frac{d\Sigma}{d\Omega} \right]_{amostra} = \frac{I(0)_{amostra}}{I(0)_{\acute{a}gua}} \left[\frac{d\Sigma}{d\Omega} \right]_{\acute{a}gua}. \quad (1.42)$$

Tendo estimado o valor da intensidade em escala absoluta e determinado $I(0)$ nessa escala, é possível calcular o peso molecular da amostra pela equação (1.42). A densidade de comprimento de espalhamento é calculada a partir da composição química da amostra e do solvente.

1.1.9 Utilizando uma proteína secundária como padrão

Outra maneira de obter o peso molecular (MW) de uma partícula através dos dados de espalhamento a baixo ângulo é utilizando os dados de espalhamento de uma proteína conhecida. Isso é muito usado para estimar o peso molecular de proteínas, pois a água espalha muito pouco e uma curva de espalhamento da água leva mais tempo para ser obtida, ao passo que a curva de espalhamento de uma proteína pode ser obtida mais rapidamente. Essa proteína-padrão precisa ser estável o suficiente para não alterar suas propriedades estruturais e estar bem caracterizada, inclusive com o peso molecular determinado. Duas proteínas muito utilizadas são a lisozima e a albumina, proteínas cujas estruturas já estão bem caracterizadas.

Dessa forma, vemos da discussão desta seção 1.1.7 e da equação (1.16) que MW está diretamente relacionado com a intensidade de espalhamento para $q = 0$, pois $I(0) \propto cMW$, onde c é a concentração (g/L) das partículas em solução e M é o peso molecular de cada partícula. O valor de $I(0)$ pode ser determinado da aproximação de Guinier da equação (1.13) ou da função $p(r)$ como na equação (1.18). Sendo assim, para estimar o peso molecular de uma molécula, a amostra de proteína-padrão é usada como padrão de calibração dos dados de espalhamento da molécula em estudo. Fazendo isso podemos relacionar as intensidades em $q = 0$ e MW das duas proteínas da seguinte forma:

$$\frac{\left(\frac{I(0)_{amostra}}{c} \right)}{\left(\frac{I(0)_{\acute{a}gua}}{c} \right)} \left[\frac{d\Sigma}{d\Omega} \right]_{\acute{a}gua} \quad (1.43)$$

onde $(I(0)/c)_{amostra}$ e $(I(0)/c)_{padr\~{a}o}$ são as intensidades de espalhamento em $q = 0$, normalizadas pela respectiva concentração, da molécula em estudo e da proteína padrão.

1.1.10 Kratky Plot

Outra análise que pode ser feita é com respeito à compacidade das proteínas através da intensidade espalhada na qual representamos como $q^2 I(q)$ vs. q . Estes gráficos, chamados “Kratky Plot”, estão baseados na teoria de espalhamento por polímeros lineares em solução, e são muito úteis no estudo do enovelamento de proteínas. De fato, cada tipo de conformação (esferoidal, cadeia Gaussiana ideal, cadeia enovelada compacta, etc.) pode ser identificado pelo perfil característico do “Kratky Plot” associado. Assim, a intensidade espalhada por uma proteína globular comporta-se aproximadamente como $1/q^4$ no domínio de altos valores de q , dando lugar a um “Kratky Plot” com forma de sino e com um máximo bem definido. Por outro lado, a representação de Kratky de uma cadeia Gaussiana ideal apresenta um *plateau* em altos valores de q , devido a que $I(q)$ varia com $1/q^2$ num intervalo específico de q seguido de um crescimento monotônico característico do espalhamento de um cilindro em valores maiores de q [Glatter & Kratky, 1982; Feigin & Svergun, 1987; Perez *et al.*, 2001].

Com base nessas observações, podem ser feitas afirmações de que a intensidade espalhada por uma proteína completamente desenovelada deve exibir esse último tipo de comportamento. Em particular, a ausência de um aumento na intensidade em altos valores de q em uma representação de Kratky é uma prova de um desenovelamento incompleto. Na verdade, a relação entre a forma geral do “Kratky Plot” e a natureza de uma cadeia desenovelada é complexa. Dentro dessa estrutura do modelo de cadeia de Kratky-Porod, uma variedade de formas pode ser observada: nenhum aumento de intensidade em altos valores de q , ausência de um *plateau*, ou até mesmo uma diminuição de intensidade em altos valores de q , todas elas descrevendo uma cadeia completamente desenovelada. Em suma, a aparência do “Kratky Plot” de uma cadeia de Kratky-Porod de seção finita depende das características da cadeia que descreve a proteína, do raio de giro da seção transversal R_c e do intervalo de q explorado [Glatter & Kratky, 1982; Feigin & Svergun, 1987; Perez *et al.*, 2001].

1.1.11 Sistemas polidispersos

Geralmente, uma solução monodispersa de partículas é um pré-requisito para estudos de SAXS. De soluções polidispersas somente parâmetros moleculares médios podem ser obtidos. Entretanto, há circunstâncias especiais nas quais algumas informações valiosas de sistemas polidispersos podem ser obtidas. A precisão dos parâmetros obtidos é, obviamente, mais baixa que aqueles obtidos de soluções monodispersas. Além disso, se as partículas do sistema polidisperso tiverem a mesma forma, mas diferenças somente de tamanho, uma distribuição de tamanhos das partículas, $D(R)$, pode ser calculada analiticamente [Glatter & Kratky,

1982].

Muitas proteínas mostram uma forte tendência a formarem agregados em solução e, freqüentemente, informações do tipo de processo de agregação podem ser obtidas por SAXS. Pode acontecer, por exemplo, do processo de agregação levar a um arranjo linear das moléculas, onde a seção transversal dos agregados é sempre a mesma e somente o comprimento das moléculas aumenta com o peso molecular. Dessa forma é possível realizar uma simulação do modelo de agregação assumido [Glatter & Kratky, 1982; Oliveira *et al.*, 2007].

Uma grande variedade de enzimas existe em estados diferentes de agregação. Muito freqüentemente, somente um desses estados de agregação pode ser obtido em uma forma pura em solução. Os outros componentes podem somente ser estudados em um sistema paucidisperso (de baixa polidispersidade) contendo vários estados de agregação. Se os parâmetros estruturais suficientemente apurados de um dos componentes são obtidos dos estudos de sistemas monodispersos, será possível calcular os parâmetros estruturais dos outros componentes da curva de espalhamento de sistemas paucidispersos. Isso foi feito por Puchwein *et al.*, [1970] para os agregados de glicogênio-fosforilase, por Witz *et al.* [1964] e Oliveira *et al.* [2007] para a proteína β -Lactoglobulina.

Há também casos especiais nos quais é possível obter dados de SAXS de sistemas em equilíbrio. A exatidão de tais resultados obtidos de soluções mais ou menos polidispersas é ainda mais limitada, mas pode ser suficiente, como mostrado por Österberg *et al.*, [1975], para decidir qual tipo de complexo é formado entre duas macromoléculas A e B , quando o equilíbrio do sistema é descrito pela reação geral:



à qual tem uma constante de equilíbrio associada. Sendo assim, para um sistema suficientemente diluído, a intensidade de espalhamento I em qualquer ângulo pode ser descrita como a soma das intensidades espalhadas por todos os tipos de partículas na solução, como por exemplo, para a solução hipotética acima de duas macromoléculas A e B , temos:

$$I = I_A + I_B + \sum_p \sum_q I_{pq} \quad (1.45)$$

onde I_A , I_B e I_{pq} são as intensidades espalhadas das moléculas A , B e do complexo A_pB_q , respectivamente. A contribuição de intensidade de cada tipo de partícula para um dado ângulo de espalhamento depende de sua concentração, seu peso molecular e dos elétrons

em excesso (contraste de densidade eletrônica). A intensidade espalhada aumenta com o aumento de qualquer um desses parâmetros.

Vamos comparar a intensidade espalhada $I(q)$ nos dois sistemas seguintes assumindo a mesma concentração total de A e B em ambos os casos. O primeiro sistema consiste de uma mistura de A e B sem qualquer complexo formado entre as duas macromoléculas. Os outros sistemas contêm partículas A e B livres mais os complexos do tipo A_pB_q . Como resultado do peso molecular maior dos complexos, o segundo sistema mostrará uma intensidade espalhada maior em ângulos suficientemente pequenos. A diferença de intensidade ΔI entre os dois sistemas depende somente dos complexos. É a diferença entre a intensidade I do sistema contendo as componentes mais os complexos (A , B e A_pB_q) e a intensidade $I_{Atot} + I_{Btot}$ do sistema contendo somente A e B (com a mesma concentração total de A e B). I_{Atot} e I_{Btot} devem ser obtidas separadamente para cada componente. Assim:

$$\Delta I = I - I_{Atot} - I_{Btot}. \quad (1.46)$$

Fazendo a hipótese de que somente um tipo de complexo A_pB_q predomina na solução, é possível determinar à partir de ΔI que tipo de complexo predomina.

1.2 Tratamentos dos dados de SAXS

Após a aquisição dos dados de espalhamento a baixo ângulo, algumas correções devem ser feitas antes que a curva de espalhamento possa ser usada para o estudo de interesse. Aqui será apresentada uma breve introdução de como isso é feito. Uma explicação mais detalhada e apurada do tratamento de dados de SAXS pode ser encontrada em Glatter & Kratky [1982].

Para as experiências de SAXS de soluções, é preciso coletar o espalhamento da solução contendo as proteínas e o espalhamento do solvente em que a proteína está imersa, para descontar a contribuição do solvente. Assim, espera-se que a curva resultante contenha somente informações das moléculas de proteína. Além disso, ainda que a medida tenha sido feita sob vácuo, existe sempre um espalhamento adicional causado pelos elementos ópticos inseridos no caminho do feixe após a amostra (fendas, janela etc.), conhecido como espalhamento parasita. Assim, a subtração do espalhamento do solvente também estará eliminando esses efeitos da curva de espalhamento da amostra de interesse.

Os dados experimentais devem também ser corrigidos por absorção tanto no caso da

solução quando do solvente. Para isso, medimos a atenuação das mesmas, definida como $At = \text{número de fótons incidentes dividido pelo número de fótons transmitidos}$, e a usamos como fator multiplicativo da intensidade. Além disso, em experiências realizadas com radiação síncrotron, a intensidade incidente na amostra não é constante no tempo e, para corrigir pela variação de intensidade no tempo, os dados são divididos pela contagem de fótons incidentes na amostra e integrada no tempo de medida, NI_o . Por outra parte, a resposta do detector sensível à posição não é homogênea em toda a região de detecção. Dessa forma é preciso corrigir os dados também por essa inomogeneidade. Isso é feito dividindo os dados coletados pela curva de resposta do detector. Dessa forma, temos:

$$I_{\text{corrigida}} = \frac{\left[\frac{I_a \cdot A_{ta}}{NI_{o,a}} - \frac{I_s \cdot A_{ts}}{NI_{o,s}} \right]}{\text{inomegeneidade}} \quad (1.47)$$

onde

A_{ta} = Atenuação da Amostra (sempre um fator > 1).

A_{ts} = Atenuação do Solvente.

$NI_{o,a}$ = Intensidade integrada no tempo total de medida da amostra.

$NI_{o,s}$ = Intensidade integrada no tempo total de medida do solvente.

1.3 Proteínas

O termo “proteínas” vem do grego “*protos*”, que significa “primário”, o que traduz bem a importância dessas moléculas nas células. As proteínas são compostos orgânicos complexos que consistem em um arranjo linear de aminoácidos ligados através de ligações peptídicas. A seqüência de aminoácidos em uma proteína é definida pelo código genético. Elas são essenciais para a estrutura e funcionamento de todas as células dos seres vivos. Cada uma é única do ponto de vista de sua estrutura primária. Sua forma, que é o arranjo tridimensional das cadeias polipeptídicas de aminoácidos no seu estado nativo, está intimamente relacionada à sua função [Lehninger *et al.*, 1995; Voet & Voet, 1995].

Como outras macromoléculas biológicas tais como polissacarídeos e ácidos nucléicos, as proteínas são partes essenciais de todos os organismos vivos e participam em todos os processos celulares. Muitas proteínas são enzimas que catalisam as reações bioquímicas e são vitais para o metabolismo. Outras proteínas possuem funções estruturais ou mecânicas, tais como as proteínas que formam o citoesqueleto das células [Voet & Voet, 1995]. As proteínas são também importantes na marcação de células, respostas de imunidade, adesão da célula

e no ciclo celular. Elas também formam um componente necessário em nossa dieta, desde que animais e seres humanos não podem sintetizar todos os aminoácidos essenciais e devem obtê-los através dos alimentos. Através do processo de digestão, os seres vivos quebram a proteína ingerida em aminoácidos livres que podem ser usados para a síntese de outras proteínas.

1.3.1 Estrutura de proteínas

As proteínas se enovelam em estruturas tridimensionais únicas, havendo quatro aspectos distintos em sua estrutura [Lehninger *et al.*, 1995; Voet & Voet, 1995]:

- *Estrutura Primária*: consiste da seqüência linear de resíduos de aminoácidos formando uma estrutura covalente.
- *Estrutura Secundária*: consiste de estruturas locais regularmente repetidas estabilizadas por pontes de hidrogênio. Os exemplos mais comuns são as alfa hélices e as folhas beta. As estruturas secundárias são locais e, devido a isso, muitas regiões com diferentes estruturas secundárias podem estar presentes na mesma proteína.
- *Estrutura Terciária*: corresponde à forma geral de uma única proteína. Essa estrutura exhibe a relação espacial entre as estruturas secundárias. Estruturas terciárias são geralmente estabilizadas por interações não locais, mais comumente a formação de um caroço hidrofóbico, mas também por pontes de NaCl, ligações de hidrogênio, ligações de dissulfeto, entre outras. O termo estrutura terciária é freqüentemente usado para se referir à proteína enovelada.
- *Estrutura Quaternária*: a forma ou estrutura que resulta da interação de mais de uma subunidade, iguais ou diferentes, de proteína para complementar sua função. É uma associação estável de múltiplas cadeias polipeptídicas que resulta em uma unidade ativa.

A figura (1.3) exemplifica bem esses quatro aspectos distintos da estrutura de uma proteína. No contexto desses arranjos estruturais, as estruturas terciárias e quaternárias são normalmente referidas como “conformações”, e transições entre elas são chamadas de “mudanças conformacionais”.

As proteínas podem ser divididas em três classes principais, que estão correlacionadas com as estruturas terciárias típicas, e que são: proteínas globulares, proteínas fibrosas e proteínas de membrana. Quase todas as proteínas globulares são solúveis em água e muitas

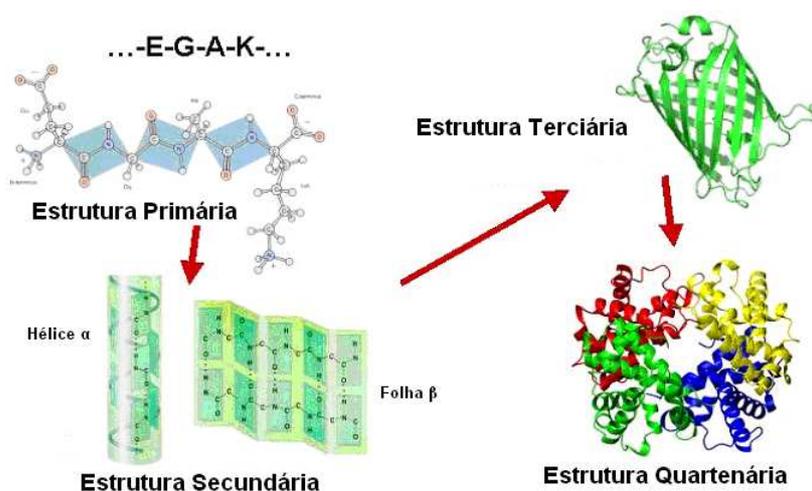


Figura 1.3: Organização hierárquica das estruturas de proteínas.

são enzimas. Já as proteínas fibrosas são freqüentemente estruturais e as proteínas de membrana geralmente servem como receptores ou como canais para moléculas carregadas ou polares passarem através da membrana celular.

1.3.2 Processos de enovelamento e desenovelamento

O processo de enovelamento de proteínas é um processo pelo qual a estrutura da proteína assume sua conformação ou forma funcional, também conhecida como forma nativa. Através desse enovelamento da cadeia de aminoácidos a proteína está apta a realizar suas funções. A grande maioria das proteínas somente pode realizar suas funções biológicas quando seu enovelamento está completo, porque a forma tridimensional das proteínas no estado nativo é crítica para sua função. Por exemplo, muitas enzimas possuem algumas entradas profundas nas suas superfícies que atuam como locais de ligação para substratos, e proteínas de membrana freqüentemente possuem canais centrais através dos quais elas permitem ou não a passagem de certos compostos orgânicos ou íons. A maior parte das proteínas enoveladas tem um interior no qual o empacotamento das cadeias laterais estabiliza o estado nativo e as cadeias polares ou carregadas ficam expostas ao solvente onde elas podem interagir com as moléculas de água [Lehninger *et al.*, 1995; Voet & Voet, 1995].

O processo inverso do processo de enovelamento é chamado desnaturação, no qual a proteína nativa perde sua conformação funcional e torna-se uma cadeia de aminoácidos amorfa e não funcional. A estrutura nativa é desestabilizada levando a estruturas desenoveladas do tipo “*random coils*”. O processo de desnaturação pode ser provocado quimicamente, pela adição de desnaturantes, ou termicamente, através do aumento de temperatura. Outros agentes também podem provocar desnaturação tais como valores extremos de pH do meio e

aumento de pressão. Muitas proteínas podem se agregar quando desnaturadas e precipitam em solução. Algumas proteínas desnaturadas podem, sob algumas condições, se enovelar novamente, entretanto, a desnaturação é irreversível em muitos casos [Lehninger *et al.*, 1995; Voet & Voet, 1995].

Em certas soluções e sob algumas condições as proteínas podem não se enovelar. Temperaturas acima ou abaixo do intervalo no qual as células conseguem suportar irão provocar desnaturação ou desenovelamento nas proteínas. Altas concentrações de solutos e valores extremos de pH também podem fazer o mesmo. As células algumas vezes protegem as proteínas contra a influência do calor, que pode provocar desnaturação, por meio de proteínas conhecidas como chaperonas ou “heat shock proteins” (HSP), que auxiliam outras proteínas a se enovelar e a permanecer nesse estado. Falhas no DNA (código genético) podem gerar proteínas com seqüências incorretas, o que por sua vez levam a um mau enovelamento. Essas proteínas enoveladas incorretamente são responsáveis pela existência de algumas doenças genéticas [Ramos & Ferreira, 2005].

1.3.3 Escala de tempo do enovelamento de proteínas e o Paradoxo de Levinthal

Estima-se que a duração de um processo de enovelamento completo varia dramaticamente dependendo de cada proteína. O enovelamento mais lento pode requerer muitos minutos ou horas, entretanto, proteínas pequenas (com comprimento de centenas de aminoácidos) tipicamente se enovelam em escalas de tempo de milisegundos. O Paradoxo de Levinthal, proposto por Cyrus Levinthal [Levinthal, 1969; Zwanzig *et al.*, 1992], estabelece que se uma proteína fosse se enovelar tentando seqüencialmente todas as conformações possíveis, ela levaria um intervalo enorme de tempo, mesmo que as conformações se sucedessem com uma taxa muito rápida. Baseado na observação de que as proteínas se enovelam muito mais rapidamente, Levinthal propôs que uma busca conformacional aleatória é muito improvável e que uma proteína deve, portanto, enovelar-se por um processo dirigido.

1.3.4 Modelos para o enovelamento de proteínas

Os modelos propostos para explicar o fenômeno de enovelamento de proteínas até alcançar a estrutura nativa devem, em geral, atender dois pressupostos importantes do processo: enovelamento de dois estados e de cooperatividade para proteínas pequenas, de domínio único. Estes não são mutuamente excludentes, pois um grau elevado de cooperatividade no processo de enovelamento de proteínas pequenas conduz frequentemente à

observação de dois estados. Um mecanismo de enovelamento de dois estados é explicado simplesmente como um equilíbrio químico entre uma conformação enovelada única e um estado desenovelado com nenhuma acumulação de intermediários estáveis. A coordenada de reação¹ de tal processo consistirá em dois mínimos de energia separados por uma única barreira energética (1.4) [Chan *et al.*, 1995]. É sabido que o enovelamento de muitas proteínas pequenas de domínio único segue essa aproximação de dois estados, mas as proteínas maiores tendem a enovelar-se através de intermediários estáveis [Privalov *et al.*, 1979].

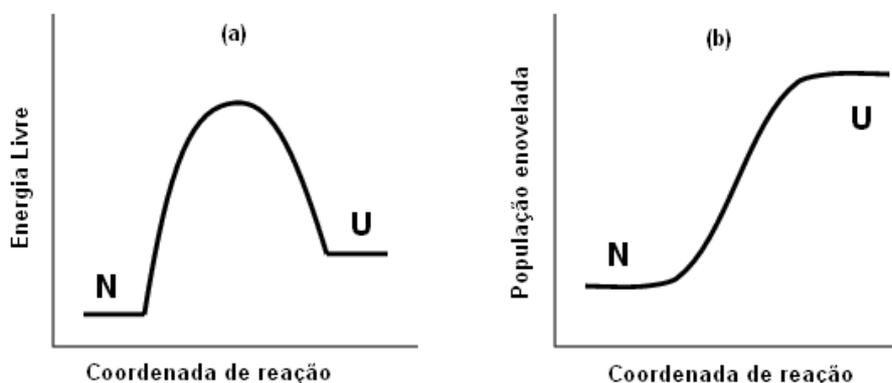


Figura 1.4: (a) Coordenada de reação de um processo de enovelamento de dois estados com estados enovelado (N) e desenovelado (U), separados por uma única barreira de energia; (b) A curva de transição sigmoideal característica de um processo de enovelamento cooperativo.

A segunda característica importante é aquela da cooperatividade ser determinada pela assinatura experimental de uma curva de transição sigmoideal (1.4). As estruturas das proteínas são mantidas estáveis puramente por interações moleculares de intensidade fraca – ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas, interações de van der Waals e interações hidrofóbicas. Uma única interação fraca contribui muito pouco à estabilidade da estrutura, contudo um número muito grande destas interações age cooperativamente para dar uma estabilidade elevada para a proteína se enovelar. A cooperatividade em um processo de enovelamento demonstra que a estabilidade do estado enovelado é maior do que a soma das energias das interações envolvidas [Plotkin & Onuchic, 2002; Plotkin & Wolynes, 2003].

O primeiro modelo proposto para explicar a cooperatividade nas transições de enovelamento de proteínas foi a teoria de “*helix-coil*” [Lifson & Roig, 1961]. Nessa teoria, Lifson representou a cooperatividade entre os vizinhos em uma cadeia polipeptídica e indicou que um resíduo tem uma propensão maior de estar em uma conformação helicoidal se seu vizinho na seqüência também estiver em uma conformação helicoidal. Assim, uma hélice pode se

¹Coordenada de reação é um parâmetro que se modifica durante a conversão de uma ou mais entidades moleculares reagentes em uma ou mais entidades moleculares produtos e cujo valor pode ser usado para medir o progresso de uma reação elementar [Muller, 1994; Laidler, 1996]

propagar rapidamente uma vez que alguns aminoácidos adjacentes adotem uma conformação helicoidal em um evento de nucleação. Embora obviamente limitada, essa teoria fornece uma base para muitos trabalhos de modelagem do processo do enovelamento de proteínas como um todo.

Subseqüentemente, muitos modelos foram propostos para explicar o problema de enovelamento de proteínas. O “modelo de estrutura” (“*Framework Model*”) descreve um mecanismo de passos para estreitar extremamente a busca conformacional [Ptitsyn, 1973; Kim & Baldwin, 1990; Dyson & Wright, 1993]. Isto envolve um conjunto hierárquico por meio do qual os elementos locais da estrutura secundária são formados de acordo com a seqüência primária, mas independente da estrutura terciária. Estes elementos então difundem até que eles se colidam e coalescem para dar forma à estrutura terciária. O “modelo de nucleação” sugere que a estrutura terciária se forma como uma conseqüência imediata da formação da estrutura secundária [Abkevich *et al.*, 1994; Wetlaufer, 1973]. A nucleação ocorre através da formação da estrutura secundária nativa por somente alguns resíduos e a estrutura se propaga para fora deste núcleo. O “modelo do colapso hidrofóbico” sugere que a conformação nativa da proteína se forma pelo rearranjo de uma estrutura colapsada compacta [Dill *et al.*, 1995; Ptitsyn, 1996]. O colapso hidrofóbico que dá forma a um “*Molten Globule*” constitui, portanto, uma etapa inicial no caminho de enovelamento. Os modelos de estrutura e de colapso hidrofóbico sugerem a formação de intermediários cinéticos, ao passo que o modelo de nucleação não [Fersht, 1997]. Modificações do modelo de nucleação, por meio do qual um núcleo de enovelamento difuso é formado e consolidado através de um estado de transição, concomitantes com a formação da estrutura terciária, conduzem ao “modelo de nucleação-condensação” proposto por Fersht [Jackson & Fersht, 1991a; Jackson & Fersht, 1991b; Fersht, 1995; Fersht, 1997].

É provável que os mecanismos de enovelamento variem significativamente de acordo com o tamanho, a estabilidade e a estrutura da proteína. O modelo de nucleação-condensação foi suportado pela evidência experimental de diversas proteínas pequenas [Jackson & Fersht, 1991a; Jackson & Fersht, 1991b]. Bychkova e Ptitsyn estudaram mais de 20 proteínas e encontraram que quase todas adotaram um estado “*emphMolten Globule*” sob certas circunstâncias de desnaturação [Bychkova & Ptitsyn, 1993]. Isto aponta para o modelo de colapso hidrofóbico, um modelo favorável para o caso de proteínas maiores.

Uma descrição mais geral dos caminhos de enovelamento de proteínas tem surgido da teoria do modelo do “funil de enovelamento” (“*funnel folding*”) [Leopold & Onuchic, 1992; Bryngelson *et al.*, 1995]. Nessa teoria, a superfície de energia de um caminho de enovelamento de proteínas aparece como um funil, com uma multidão diversa de conformações

desenoveladas na borda e um mínimo global único que representa a conformação do estado enovelado nativo. Isto conduz a uma “nova visão” do enovelamento de proteínas por meio da qual se estabelece que existam muitos trajetos entre o estado desenovelado e o estado nativo. Uma molécula da proteína pode seguir o trajeto mais rápido (o mais íngreme da superfície de enovelamento), ou uma rota que passa por diversos mínimos locais (intermediários) e máximos (estados de transição). A figura 1.5 mostra uma superfície de energia teórica para o enovelamento da lisozima, com diversos trajetos marcados representando um enovelamento

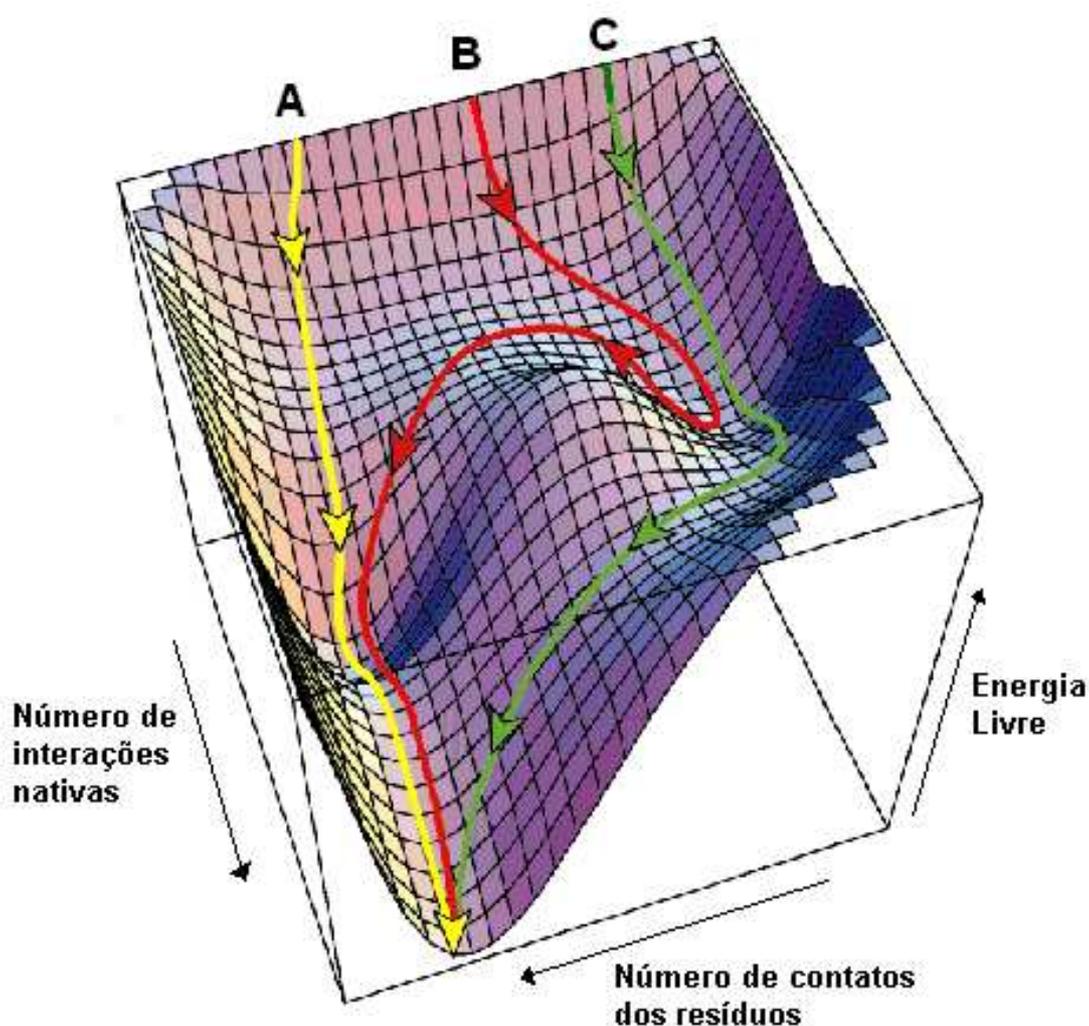
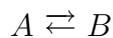


Figura 1.5: Superfície de energia teórica de um funil de enovelamento construída a partir dos dados experimentais para o enovelamento da lisozima. Três trajetos são mostrados correspondendo a um enovelamento rápido (A), lento que cruza a barreira da energia elevada (B), e um trajeto de enovelamento lento que retorna a um estado menos enovelado antes de seguir para o trajeto de enovelamento rápido (C).

rápido e um lento [Dobson *et al.*, 1998].

1.3.5 Equilíbrio entre dois estados globais

Geralmente pode ocorrer equilíbrio entre dois estados conformacionais de uma proteína durante seu processo de enovelamento ou desenovelamento. Aqui apresentamos uma breve introdução da interpretação termodinâmica desse equilíbrio [Jackson, 2006]. Considere um equilíbrio entre dois estados globais, denotados por A e B , como mostrado no esquema a seguir:



O estado global A tem uma energia livre molar G_a e o estado global B tem uma energia livre molar G_b . Assim, as energias livres molares das soluções com certas concentrações de A e B são então:

$$G_a = G_a^0 + RT \ln [A] \quad (1.48)$$

$$G_b = G_b^0 + RT \ln [B] \quad (1.49)$$

onde G_a e G_b são as energias livres molares do estado padrão (considerado por convenção em uma solução molar unitária e condições normais de temperatura e pressão). A mudança de energia livre para a conversão do estado A para o B é dada por:

$$\Delta G = G_b - G_a = G_b^0 - G_a^0 + RT \ln \frac{[B]}{[A]}. \quad (1.50)$$

No equilíbrio químico $\Delta G = 0$. Tomando as concentrações de equilíbrio como $[A]_{eq}$ e $[B]_{eq}$, nós podemos relacionar essa diferença de energia livre entre os dois estados padrões como:

$$\Delta G^0 = -RT \ln \frac{[B]_{eq}}{[A]_{eq}} = -RT \ln K_{eq} \quad (1.51)$$

onde $\Delta G^0 = G_a^0 - G_b^0$, e $K_{eq} \equiv [B]_{eq}/[A]_{eq}$ é a constante de equilíbrio para conversões entre A e B . Tomando a exponencial dessa equação temos:

$$K_{eq} = e^{-\frac{\Delta G^0}{RT}} = \frac{[B]_{eq}}{[A]_{eq}}. \quad (1.52)$$

Essa última equação se parece muito com uma distribuição de Boltzmann, que fornece a razão das propriedades relativas de dois microestados como uma função exponencial da diferença de suas energias. O equilíbrio representado por essa equação reflete a estabilidade relativa de duas coleções distintas de microestados.

1.3.6 Transformações induzidas por temperatura

A desnaturação térmica de uma proteína é um excelente exemplo de uma transformação global. Em baixas temperaturas um estado enovelado é favorecido no qual um número relativamente pequeno de microestados tem uma estrutura similar correspondendo a uma configuração compacta bem definida. Essa configuração é mantida por um grande número de contatos específicos entre os resíduos da proteína. Em altas temperaturas a proteína se desenova. Esse estado desenovelado tem um número muito grande de microestados, correspondendo a todas as diferentes configurações de uma cadeia desestruturada. A transformação pode ser reversível dentro de limites de temperatura tais que o resfriamento pode restaurar o estado enovelado. É sabido que a diferença no número de microestados entre esses estados globais é que provoca uma transformação sensível a temperatura.

Para entender como a temperatura influencia a desnaturação térmica, dividimos a mudança de energia livre em entalpia e entropia:

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0. \quad (1.53)$$

A entalpia pode ser facilmente relacionada com os contatos que estabilizam o estado enovelado nativo. A entropia representa a contribuição que aparece da grande desordem do estado desenovelado. Assumindo que ΔH^0 e ΔS^0 por si próprias são independentes da temperatura², isso nos permite focar no termo $T\Delta S^0$ como guia para um deslocamento induzido por temperatura no equilíbrio entre *A* e *B*. Dessa forma, haverá uma temperatura de transição, T^* , onde os estados enovelados e desenovelados estão presentes em concentrações iguais. Naquele ponto $\Delta G^0 = 0$ temos $\Delta H^0 = T^*\Delta S^0$. Abaixo de T^* , $\Delta H^0 > T^*\Delta S^0$ e ΔG^0 é positivo tal que *A* é mais estável. Abaixo de T^* , $\Delta H^0 < T^*\Delta S^0$ e ΔG^0 é negativo tal que *B* é mais estável. Isso é facilmente visto na combinação das equações (1.50) e (1.51):

²Deve-se lembrar aqui que isso é uma aproximação feita por uma questão de conveniência para os cálculos, pois na realidade existe uma variação positiva e diferente de zero do calor específico da molécula entre os estados enovelado e desenovelado que foi desprezada nessa aproximação.

$$\frac{[B]}{[A]} = e^{\left(\frac{-\Delta H^0 + T\Delta S^0}{RT}\right)} \quad (1.54)$$

onde foi omitido o subscrito “*eq*” associado ao equilíbrio.

As aplicações práticas freqüentemente utilizam a definição de uma variável, que chamaremos de x , definida como a fração de estados do tipo B ou, equivalentemente, o grau de conversão de A para B , dada pela relação:

$$x = \frac{[B]}{[B] + [A]}. \quad (1.55)$$

Com a ajuda da equação (1.54), x pode ser expresso em termos de ΔG^0 . Fatorando $[B]$ do numerador e denominador teremos:

$$x = \frac{1}{1 + \left(\frac{[A]}{[B]}\right)}. \quad (1.56)$$

Substituindo a equação (1.54) então temos:

$$x = \frac{1}{1 + e^{\left(\frac{\Delta H^0}{RT} - \frac{\Delta S^0}{T}\right)}}. \quad (1.57)$$

Em baixas temperaturas, o termo positivo de entalpia é maior, tal que a exponencial é grande e x é bem próximo de 0. Em altas temperaturas, o termo negativo de entropia domina, tal que a exponencial é pequena e x é bem próximo de 1.

2

Mudanças conformacionais da proteína lisozima durante processo de desnaturação estudadas através de experiências de SAXS

2.1 Introdução

Lisozima, representada na figura (2.1), é uma enzima descoberta pelo médico escocês Alexander Fleming. Esta proteína é um polipeptídeo linear extraído da gema de ovo de galinha, constituído por 129 aminoácidos. Ela é comumente referida como “antibiótico próprio do corpo”, visto que ela mata as bactérias. É encontrada nas lágrimas e no muco dos seres humanos, é também produzida por outros organismos. Ela digere certos carboidratos de alto peso molecular, assim, as bactérias que contêm esses carboidratos na estrutura de sua parede celular desintegram-se ou partem-se sob a ação da lisozima. No nível molecular, a lisozima destrói o esqueleto glicano do peptidoglicano, ou seja, destrói a camada protetora de muitas bactérias [Karlsen *et al.*, 1996].

Aspectos cinéticos e de equilíbrio do enovelamento da lisozima foram temas de extensiva investigação [Dobson *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1996; Tanford, 1970; Bradbury & King, 1969]. Para decifrar o caminho de enovelamento seguido pelas proteínas é preciso caracterizar seus intermediários de enovelamento. Para a lisozima, intermediários cinéticos têm sido identificados no estágio inicial (<100 ms) do caminho de reenovelamento [Kato *et al.*, 1981; Radford *et al.*, 1992]. O domínio α dos intermediários aparentemente possui características de um “Molten Globule”. Estudos estruturais desses intermediários são difíceis por causa

da ocorrência de estados transientes.

Uma alternativa é estudar estados parcialmente enovelados, já que é cada vez mais evidente que eles se assemelham aos intermediários cinéticos [Dobson, 1994; Ptitsyn, 1995]. Entretanto, as transições de desenovelamento em equilíbrio da lisozima, em sua maioria induzidas por desnaturação térmica ou por Uréia ou GdmHCl, têm sido tradicionalmente aproximadas por um modelo de dois estados decorrentes da alta cooperatividade de desenovelamento [Aune & Tanford, 1969]. Estados intermediários parcialmente enovelados não estavam visivelmente presentes sob aquelas circunstâncias. Em outros trabalhos, alguns intermediários estáveis da lisozima de outra procedência tem sido relatados [Dael *et al.*, 1993; Haezebrouck *et al.*, 1995] assim como a proteína homóloga α -Lactalbumina [Baum *et al.*, 1989], ou a lisozima do ovo de galinha usando o desnaturante suave trifluoroetanol (TFE) em pH 2,0 [Buck *et al.*, 1993, Dael *et al.*, 1993]. As estruturas desses estados parcialmente enovelados, determinados por Ressonância Magnética Nuclear (RMN), espectroscopias de fluorescência e de Dicroísmo Circular (CD) em UV próximo e distante, mostram características de “Molten Globule”. Eles apresentam um conteúdo substancial de hélice α e um enovelamento terciário distorcido no domínio α e pouca estrutura no domínio β , assemelhando-se à estrutura do intermediário cinético inicial da lisozima de ovo de galinha. Evidências adicionais para intermediários são também documentadas na literatura: curvas de desenovelamento térmicos da lisozima do ovo não são idênticas quando observadas por absorção em 292 nm e rotação óptica em 546 nm em pH 2,2 [Wetlaufer, 1962]. A partir de medidas de CD em 222 nm e 270 nm em pH 1,0 [Haezebrouck *et al.*, 1995], uma população de $\sim 25\%$ de um intermediários foi sugerido. Há evidências de que em pH acima de 4 a lisozima se desenovela seguindo um transição de dois estados devido à alta cooperatividade do processo [Hirai *et al.*, 1999].

Nos estudos estruturais, o grau de compacidade é uma das mais importantes propriedades pertinentes às estruturas das moléculas de proteínas em solução porque caracteriza o grau de enovelamento da mesma. A técnica de Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo (SAXS) é uma das poucas técnicas que oferecem uma medida direta da compacidade porque fornece informações geométricas gerais tais como o tamanho e forma da molécula. A potencialidade da aplicação de SAXS para o estudo de enovelamento de proteínas tem sido comprovada com sucesso [Eliezer *et al.*, 1993; Kataoka *et al.*, 1995; Lattman, 1994], e as informações fornecidas por tais estudos são complementares àquelas obtidas por outras técnicas, tais como CD, fluorescência e RMN.

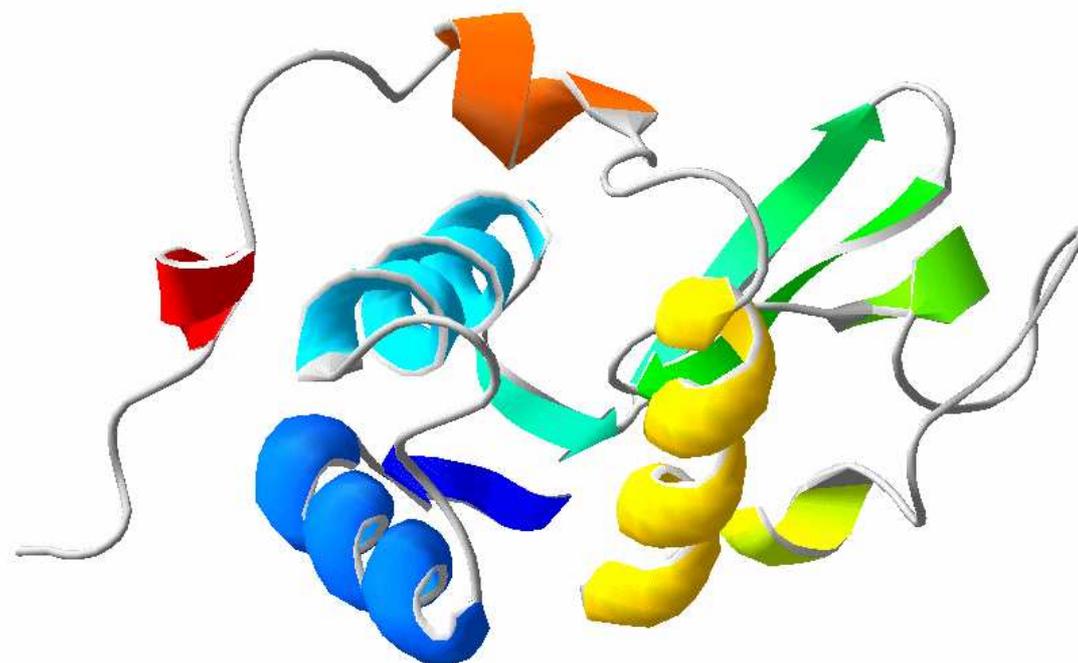


Figura 2.1: Estrutura de alta resolução da proteína lisozima obtida através da técnica de cristalografia de raios-X e registrada no Protein Data Bank com o código pdb 6lyz.

2.2 Objetivos

Esta parte do trabalho teve por objetivo o estudo de mudanças conformacionais de biomoléculas em solução através da técnica de SAXS. Foram estudados problemas de desnaturação da lisozima, uma proteína cuja estrutura de alta resolução já foi determinada por cristalografia de proteínas, através da adição de agente químico (uréia) e por temperatura.

2.3 Materiais e métodos

2.3.1 Materias e preparação das amostras

A proteína lisozima da clara de ovo de galinha foi obtida da empresa *Sigma Chemical Company, St. Louis, MO*. Ela foi comprada na forma de pó tal que pudesse ser solubilizada facilmente conforme fosse preciso. O grau de pureza era de aproximadamente 99%. Na preparação das amostras, 5 mg de lisozima foram pesados em uma balança analítica e logo após solubilizados em 1 mL de solução tamponante. Dois tampões diferentes foram utilizados conforme o valor de pH de interesse para o estudo. As condições das soluções foram selecionadas com base em trabalhos já realizados com a lisozima [Chen *et al.*, 1996; Hirai *et al.*,

1999; Doniach, 2001; Hirai *et al.*, 2004]. Foram usadas soluções com dois valores diferentes de pH, uma com pH = 2,9 (ao redor do qual tinha sido observada a presença de intermediários em outros estudos [Privalov *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1996; Doniach, 2001]) e outra com pH = 7,0, para o qual não existem dados na literatura sobre a existência de intermediários. Para a solução em pH ácido, foi utilizado Citrato de Sódio para tamponar a solução e ácido cítrico foi usado para ajustar o pH. Já para a solução em pH neutro foi utilizado o tampão Tris(hidroximetilaminometano), referenciado como Tris. Essas soluções tamponantes foram previamente preparadas antes de adicionar a proteína. Foram preparadas 10 mL de solução em pH neutro de Tris a 1 mM, sendo esta a primeira solução, e 10 mL de solução em pH ácido de Citrato de Sódio a 50 mM, sendo a segunda solução.

Para o estudo de desnaturação térmica foram utilizadas as soluções de lisozima em tampão Tris 1 mM, pH 7,0, e de lisozima em tampão Citrato 50 mM, pH 2,9. Logo após, a primeira experiência em pH neutro foi repetida com novas soluções preparadas igualmente, porém com a adição de 50 mM de NaCl na solução da proteína para evitar agregação. Para a desnaturação por efeito da adição de uréia, somente as soluções em pH 2,9 foram utilizadas. Para essa última, 8 diferentes soluções tamponantes de Citrato foram preparadas com diferentes concentrações de uréia (0, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 M de uréia) e, posteriormente, 5 mg de lisozima foram solubilizados em 1 mL de cada solução. Soluções com concentração de uréia maior que 8 M são difíceis de obter devido a pouca solubilidade da uréia em solução para essas concentrações. Essas últimas experiências foram também repetidas com novas soluções preparadas igualmente a essas, mas com a adição de 50 mM de NaCl na solução da proteína.

2.3.2 SAXS

Para obter os dados de SAXS foi usada radiação síncrotron nas experiências em equilíbrio. As experiências de SAXS foram realizadas nas duas linhas de luz dedicadas à técnica de SAXS no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS): *D11A – SAXS1* e *D02A – SAXS2*. O comprimento de onda utilizado em todas as experiências foi $\lambda = 1,488\text{\AA}$. Na linha *D11A – SAXS1*, uma distância amostra-detector de $D = 1032,5\text{mm}$ e um detector linear sensível a posição foram usados. Já na linha *D02A – SAXS2*, a distância amostra-detector foi de $D = 1074,65\text{mm}$ e um detector bidimensional com arranjo CCD (MARCCD, USA) foi utilizado. Os dados detectados com o detector 2D apresentam uma melhora substancial na curva em comparação com os dados adquiridos com o detector 1D.

Os dados foram tratados utilizando o procedimento apresentado na seção 1.2. Para tratar os dados bidimensionais e integrar as contagens sobre a região detectada para obter uma

curva de espalhamento unidimensional foi usado o programa FIT2D [Hammersley, copyright 1987 - 2005]. Para tratar os dados foi utilizado o programa PRIMUS [Konarev et al., 2003, Konarev *et al.*, 2006] e o programa TRAT1D [Oliveira, 2003; Oliveira, 2005]. Esse último programa já contém toda a rotina de tratamento dos dados automatizada e implementada em sua interface. O cálculo da função $p(r)$ para todas as curvas de intensidade de espalhamento foram obtidas utilizando o programa GNOM [Semenyuk & Svergun, 1991; Svergun, 1992]. Esse programa realiza uma transformada de Fourier dos dados experimentais de espalhamento e fornece a função $p(r)$ a partir de um ajuste da curva de espalhamento. Ele também fornece o valor do raio de giro, R_g , calculado para a curva toda utilizando a equação (1.17) e, através da curva $p(r)$, fornece também o valor da máxima dimensão da partícula, $D_{máx}$.

Para a realização das experiências as amostras foram acondicionadas em um porta-amostra dedicado a amostras líquidas nas linhas de SAXS [Cavalcanti *et al.*, 2004]. Esse porta-amostra possui uma pequena cela selada com duas janelas de mica formando um compartimento com espessura de 1 mm que é preenchida com a solução contendo a proteína. Um banho térmico foi conectado a esse porta-amostras para manter a temperatura constante em 25°C nas experiências de desnaturação por adição de uréia e, também, para controlar e alterar lentamente a temperatura no intervalo de 25°C a 80°C durante as experiências de desnaturação térmica. A temperatura era alterada no início em intervalos de 10°C, mas depois o intervalo foi reduzido conforme eram detectadas mudanças substanciais. O tempo de espera para o sistema entrar em equilíbrio térmico nos ensaios de desnaturação térmica foi de 10 minutos.

2.4 Análise dos dados

2.4.1 Mudanças dos parâmetros estruturais

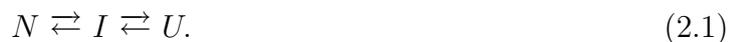
As mudanças conformacionais sofridas pela proteína durante o processo de desnaturação foram acompanhadas através das mudanças detectadas nos parâmetros gerais das proteínas extraídos das curvas de espalhamento. Para cada estado estrutural da proteína há uma curva $I(q)$ da qual é possível obter uma curva $p(r)$ através de uma transformada de Fourier como nas equações (1.8) e (1.9). Tanto pela região de Guinier quanto da curva $p(r)$ foi possível acompanhar as mudanças do raio de giro da proteína durante seu desenovelamento. Também da $p(r)$ é possível extrair o valor da máxima dimensão da molécula, $D_{máx}$, para cada estado estrutural da proteína. Dessa forma, foi possível construir gráficos das mudanças desses parâmetros em função da temperatura, para o caso da desnaturação térmica, e da

concentração de uréia, para a desnaturação por efeito de agente químico. Outra verificação feita foi da mudança no peso molecular da molécula durante o processo de desnaturação. Em caso de haver mudança do peso molecular, isso indicaria que houve agregação da molécula além de desnaturação.

Outra análise estrutural realizada foi o acompanhamento da mudança de compacidade da molécula em solução durante seu desenovelamento. Isso foi feito com base no aspecto da curva na representação de Kratky (“*Kratky Plot*”). Já que a lisozima é uma proteína globular, espera-se que o perfil da representação de Kratky tenha uma forma de sino no estado nativo e que vá perdendo essa forma à medida que a molécula vai perdendo a sua compacidade quando ela se afasta do estado nativo em direção ao estado desnaturado. Por fim, na tentativa de detectar indícios da formação de estados intermediários, uma análise termodinâmica dos dados foi realizada como descrita na próxima seção.

2.4.2 Análise termodinâmica da curva de desnaturação

O estado termodinâmico de uma proteína depende sensivelmente das condições ambiente incluindo temperatura, pressão, pH, concentração de NaCl e concentração de desnaturantes, tais como uréia ou hidrocloreto de guanidina (Gdn-HCl). Quando essas condições são variadas, duas ou mais populações com conformações diferentes de uma proteína podem coexistir. A seguinte análise é baseada no modelo de enovelamento de três estados e pode facilmente ser aplicada para o modelo de dois estados [Chen et al., 1996; Doniach, 2001]. Um sistema ternário em equilíbrio consistindo de moléculas no estado nativo (N), intermediário (I) e desenovelado (U), pode ser descrito pelo esquema geral:



Pensando dessa forma, os valores de raio de giro (R_g) e intensidade de espalhamento a baixo ângulo podem ser decompostos de acordo com as equações seguintes:

$$I_k = f_N^k I_N + f_I^k I_I + f_U^k I_U \quad (2.2)$$

$$R_{g,k}^2 = f_N^k R_{g,N}^2 + f_I^k R_{g,I}^2 + f_U^k R_{g,U}^2 \quad (2.3)$$

onde f_N^k , f_I^k e f_U^k são frações das moléculas de proteínas no estado nativo, intermediário e

desenovelado, respectivamente. Em equilíbrio, essas frações podem ser derivadas termodinamicamente:

$$f_N^k = \frac{1}{1 + K_{N \rightarrow I}^k + K_{N \rightarrow U}^k} \quad (2.4)$$

$$f_I^k = \frac{K_{N \rightarrow I}^k}{1 + K_{N \rightarrow I}^k + K_{N \rightarrow U}^k} \quad (2.5)$$

$$f_U^k = \frac{K_{N \rightarrow U}^k}{1 + K_{N \rightarrow I}^k + K_{N \rightarrow U}^k} \quad (2.6)$$

onde $K_{N \rightarrow I}^k = [I]/[N]$ e $K_{N \rightarrow U}^k = [U]/[N]$ são constantes de equilíbrio para as transições de estado *nativo* \rightarrow *intermediário* e *nativo* \rightarrow *desenovelado* na solução de condição k (concentração de desnaturante fixa para a desnaturação por uréia ou temperatura fixa para a desnaturação térmica), respectivamente, e $f_N^k + f_I^k + f_U^k = 1$. As constantes de equilíbrio são relacionadas às mudanças na energia livre de Gibbs como:

$$\Delta G_I^k = -RT \ln K_{N \rightarrow I}^k \quad (2.7)$$

$$\Delta G_U^k = -RT \ln K_{N \rightarrow U}^k \quad (2.8)$$

Assim, podemos expressar as frações moleculares em função da temperatura e da variação de energia livre de Gibbs. Para o estudo de desnaturação por ação de um desnaturante químico é preciso relacionar essas frações moleculares em cada estado de equilíbrio com a concentração de uréia. Para fazer isso, existem alguns modelos que relacionam a variação de energia livre de Gibbs com a concentração de uréia. O modelo que usaremos nesse trabalho será o “Modelo de Ligação do Desnaturante”. Esse modelo leva em conta o efeito da uréia na estabilidade da proteína. Ele assume que o desenovelamento de uma proteína resulta de um acréscimo no número de sítios de ligação do desnaturante na conformação desenovelada (ou intermediária) comparada com a forma nativa [Aune & Tanford, 1969]. Nesse modelo temos as seguintes relações:

$$\Delta G_I^k = \Delta G_I^{H_2O} - \Delta n_I RT \ln(1 + ca) \quad (2.9)$$

$$\Delta G_U^k = \Delta G_U^{H_2O} - \Delta n_U RT \ln(1 + ca) \quad (2.10)$$

onde ΔG_I^k e ΔG_U^k são as mudanças de energia livre no desenovelamento do estado nativo para o estado intermediário e do estado nativo para o estado desenovelado, respectivamente, extrapoladas para a concentração nula de desnaturante. e são, respectivamente, as diferenças no número de sítios de ligação de uréia entre os estados nativo e intermediário, e entre os estados nativo e desenovelado. R é a constante dos gases ($R = 1,9872 \text{ cal K}^{-1}\text{mol}^{-1}$) e T é a temperatura em *Kelvin*. O parâmetro c é uma constante média de ligação em equilíbrio em cada sítio e a é a atividade da uréia que está relacionada à sua concentração molar, M , pela relação [Pace, 1986]:

$$a = 0,9815M + 0,02978M^2 + 0,00308M^3$$

Rearranjando as equações que vão da (2.3) à (2.10), obtemos a seguinte relação para o raio de giro no processo de três estados em equilíbrio:

$$R_{g,k}^2 = \frac{R_{g,N}^2 + R_{g,I}^2 e^{-\alpha} + R_{g,U}^2 e^{-\beta}}{1 + e^{-\alpha} + e^{-\beta}} \quad (2.11)$$

onde

$$\alpha = [\Delta G_I^{H_2O} - \Delta n_I RT \ln(1 + ca)]/RT$$

$$\beta = [\Delta G_U^{H_2O} - \Delta n_U RT \ln(1 + ca)]/RT.$$

Para o caso da desnaturação térmica, usamos a discussão sobre energia livre, entalpia e entropia da seção 1.3.6 e deduzimos uma equação para R_g , da mesma maneira que fizemos para a equação (2.11), mas usando a relação $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ e supondo que ΔH e ΔS não dependam significativamente da temperatura no processo de desenovelamento¹. Sendo assim, chegamos à seguinte relação:

$$R_{g,k}^2 = \frac{R_{g,N}^2 + R_{g,I}^2 e^{-\gamma} + R_{g,U}^2 e^{-\delta}}{1 + e^{-\alpha} + e^{-\beta}} \quad (2.12)$$

onde

¹Novamente é importante lembrar que isso é uma aproximação onde estamos desconsiderando, por conveniência, a variação de calor específico da molécula, conforme já foi discutido na seção 1.3.6. Essa aproximação é válida, porém limitada, já que fornece valores um pouco menores que a realidade para as variações de entalpia e de entropia [Perez *et al.*, 2001].

$$\gamma = [\Delta H_I - T\Delta S_I]/RT$$

$$\delta = [\Delta H_U - T\Delta S_U]/RT.$$

As equações (2.11) e (2.12) são usadas para ajustar os dados experimentais de R_g^2 vs. $C_{uréia}$ e R_g^2 vs. T , respectivamente, usando o método de mínimos quadrados não-linear. Essas equações foram derivadas supondo um processo de desenovelamento de três estados, mas pode ser facilmente simplificada para um processo de dois estados somente fazendo $R_{g,I} = 0$ e omitindo os termos $e^{-\alpha}$ na equação (2.11) e $e^{-\gamma}$ na equação (2.12).

2.5 Resultados

Os resultados estão divididos em dois grupos: em um estão os resultados referentes ao estudo de desnaturação por ação de um desnaturante químico, a uréia, e no outro, os resultados do estudo de desnaturação térmica, ambos os estudos feitos utilizando a proteína lisozima como amostra. Os resultados são apresentados a seguir.

2.5.1 Estado nativo da lisozima usado como referência

Para termos uma referência dos parâmetros estruturais da lisozima no seu estado nativo, utilizamos informações obtidas no banco de dados de estruturas cristalinas de proteínas conhecido como Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org>). Nesse banco de dados a estrutura cristalina da lisozima que foi utilizada está registrada pelo código PDB 6lyz.

O estado nativo da proteína em solução pode, obviamente, ser representado pela estrutura cristalina levando em conta, é claro, a camada de água em torno da proteína em solução. Dessa forma os parâmetros dimensionais dessa proteína foram obtidos da estrutura PDB utilizando o programa CRY SOL [Svergun *et al.*, 1995]. Esse programa calcula os parâmetros gerais de SAXS, tais como raio de giro, e gera a curva de espalhamento $I(q)$ teórica a partir das coordenadas atômicas na proteína. Esse programa possibilita também acrescentar à estrutura cristalina uma camada de água com espessura de 3 Å envolvendo a proteína como envelope. Essa camada está sempre presente nas proteínas em solução e possui uma densidade eletrônica que contribui para o espalhamento de raios-X a baixo ângulo. Logo, é interessante acrescentar a camada de água à estrutura cristalina no momento de calcular os parâmetros estruturais teóricos para serem comparados com os experimentais obtidos da proteína em solução.

Sendo assim, as curvas $I(q)$ e a função $p(r)$ obtidas da estrutura cristalina são mostradas nas figuras 2.2(a) e 2.2(b), respectivamente. No destaque na figura 2.2(a) também é apresentada a curva de Kratky teórica para essa estrutura. Os valores de raio de giro e máxima dimensão para a proteína calculados pelo CRY SOL a partir da estrutura cristalina são $R_g = 15,07 \text{ \AA}$ e $D_{m\acute{a}x} = 49,04 \text{ \AA}$, respectivamente.

2.5.2 Desnaturação por ação de um desnaturante químico (Uréia)

Essas experiências foram realizadas com a lisozima em tampão citrato com e sem $NaCl$. O $NaCl$ foi adicionado para alterar a força iônica da solução, o que também altera também a conformação da proteína em solução, provocando uma blindagem de cargas da molécula em relação ao solvente. Por isso, vamos subdividir essa parte nos resultados da solução sem a adição de $NaCl$ e aqueles com a adição de $NaCl$. Para verificar a monodispersidade do estado nativo e do estado desenovelado, a primeira análise feita foi da região de Guinier, onde os resultados são mostrados na figura 2.3(a) para a solução sem $NaCl$ e na figura 2.3(b) para a solução contendo $NaCl$. Note que há um comportamento bastante linear nessa região, o que indica que a solução é monodispersa.

Para a solução sem $NaCl$, as curvas de espalhamento $I(q)$ do estado nativo e um estado com máxima alteração conformacional por ação da uréia são mostrados na figura 2.4(a). As representações de Kratky também são mostradas no destaque e mostram que a lisozima, mesmo na maior concentração de uréia, não perde totalmente sua compacidade, como notado no gráfico de Kratky que não perde totalmente seu máximo no estado a 8M de uréia em solução.

Os ajustes teóricos dos dados experimentais de espalhamento realizados com o programa GNOM e as curvas $p(r)$ estão mostrados nas figuras 2.4(a) e 2.4(b). Sendo assim, os parâmetros obtidos para os dois estados apresentados na figura (2.4) foram $R_g = (16,7 \pm 0,3) \text{ \AA}$ e $D_{m\acute{a}x} = 52 \text{ \AA}$ para o estado em 0M de uréia e $R_g = (21,2 \pm 0,3) \text{ \AA}$ e $D_{m\acute{a}x} = 70 \text{ \AA}$ para o estado em 8M de uréia, indicando uma mudança relevante na estrutura da proteína.

Junto com essas análises, acompanhamos as alterações conformacionais da proteína à medida que a concentração de uréia aumentava. As mudanças de compacidade das proteínas podem ser vistas na figura 2.5(a) através das alterações nas curvas de Kratky. Foi feito um alisamento nos dados experimentais para uma melhor visualização das curvas de Kratky na figura 2.5(a). À medida que a concentração de uréia aumenta, o máximo dessas curvas vai diminuindo, mas nunca desaparece totalmente. Essas alterações na estrutura também

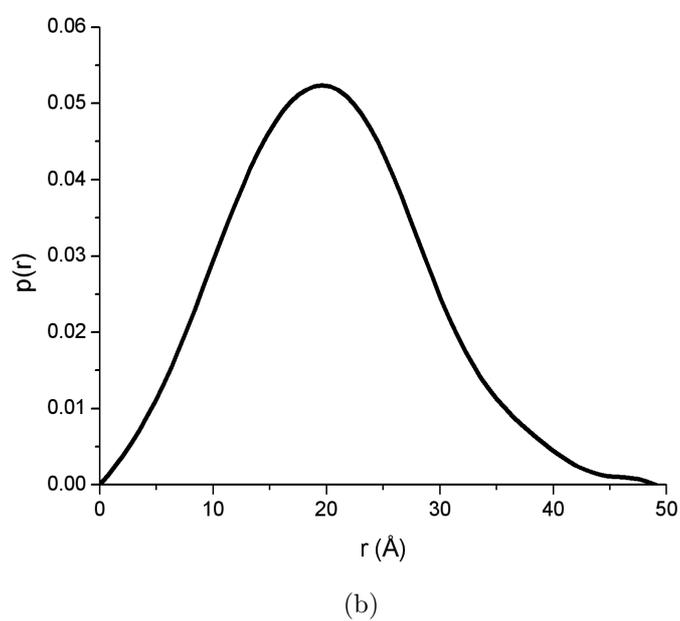
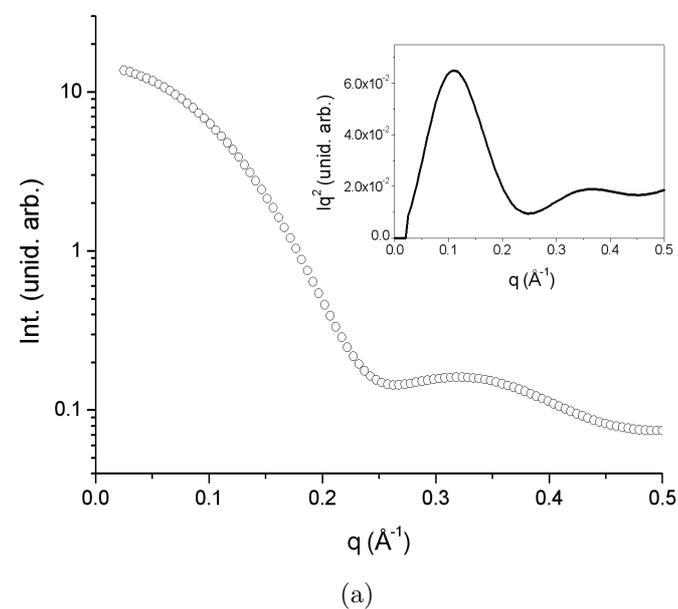


Figura 2.2: (a) Curva de intensidade de espalhamento $I(q)$ e (b) função $p(r)$ calculada a partir da estrutura cristalina utilizando o programa CRY SOL. No destaque da figura (a) é mostrado um gráfico de Kratky para esses dados.

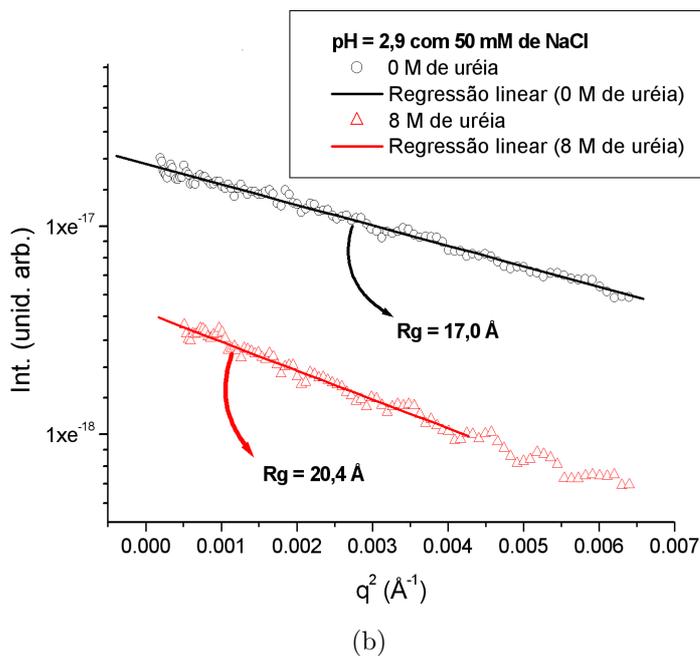
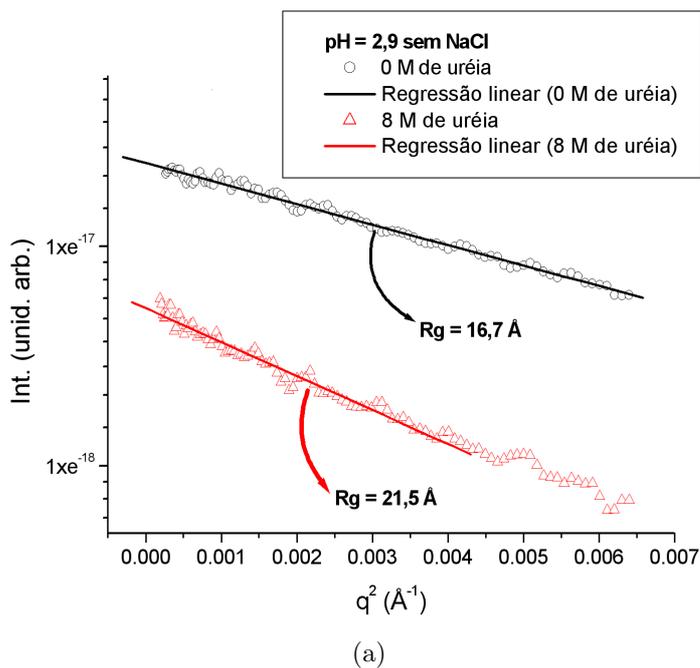


Figura 2.3: Gráficos mostrando a linearidade das curvas de espalhamento na região de Guinier para os estados nativo e desenovelado da lisozima nas soluções: (a) em $pH = 2,9$ sem $NaCl$ e (b) em $pH = 2,9$ contendo $NaCl$. Valores de raio de giro obtidos da regressão linear e usando a equação (1.14) estão mostrados.

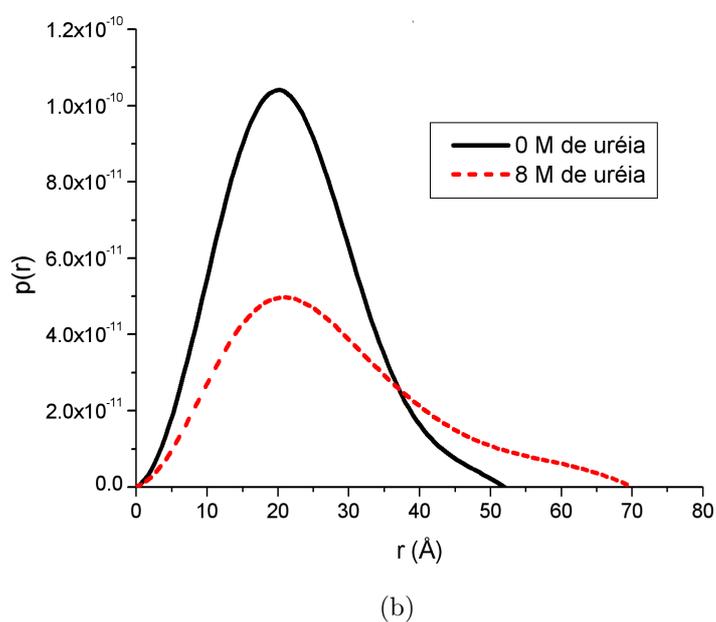
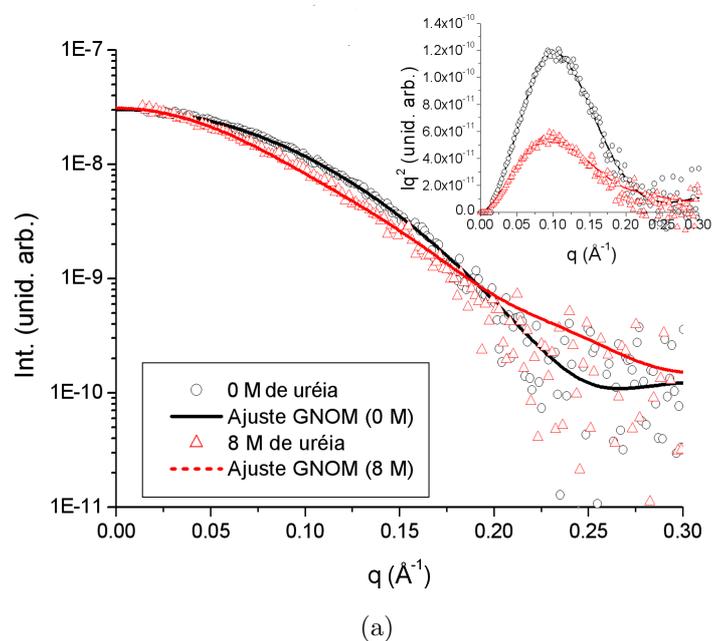
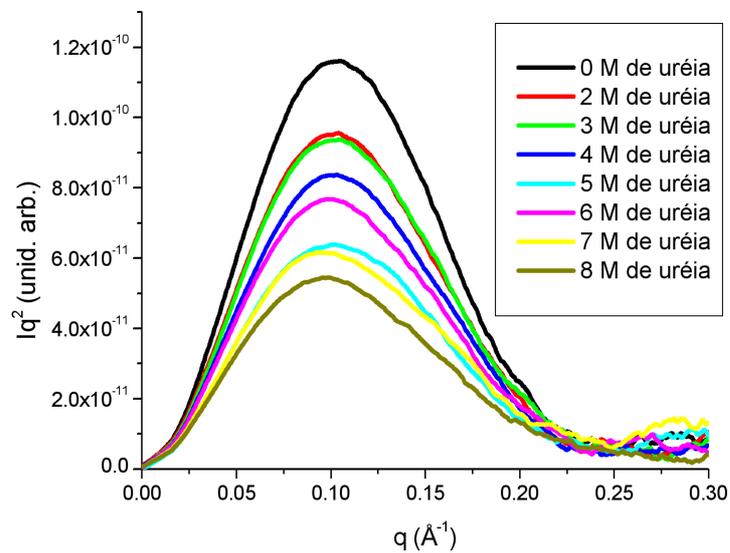
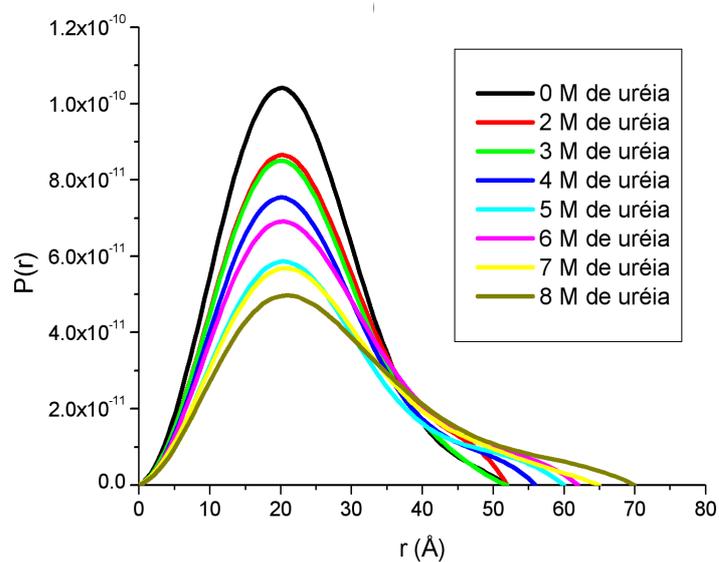


Figura 2.4: Estado nativo em 0M de uréia e estado desenovelado por 8M de uréia na solução sem *NaCl* em *pH* 2, 9. (a) Curvas de intensidade $I(q)$ com um destaque mostrando as representações de Kratky e nas (b) funções $p(r)$ para esses dois estados (0 M e 8 M de uréia).



(a)



(b)

Figura 2.5: Mudanças conformacionais acompanhadas para cada concentração de uréia em solução sem *NaCl* através das mudanças nas (a) curvas de Kratky (foi feito um alisamento nos dados experimentais uma melhor visualização das curvas) e nas (b) funções $p(r)$ da lisozima.

foram acompanhadas através das mudanças nas funções $p(r)$ como mostradas na figura 2.5(b). Como podemos notar, a proteína vai assumindo uma forma menos globular quando a concentração de uréia aumenta. Conseqüentemente, a dimensão máxima e o raio de giro da lisozima também se alteram.

Apesar dos dados experimentais de SAXS evidenciarem os diferentes estados conformacionais da proteína em 0M e 8M de uréia, não existe indício claro de que alguma curva corresponda a um estado intermediário da proteína, e não um transiente. Dessa forma, não podemos afirmar que um intermediário estável da proteína em condições de equilíbrio foi detectado. Para tentar encontrar um indício para esse estado, análises termodinâmicas dos dados foram feitas supondo a existência ou não de um intermediário. Para isso, o modelo para processo de dois estados e o modelo para processo de três estados, apresentados na seção 2.4.2, foram utilizados. A curva de desnaturação é apresentada na figura 2.6(a), juntamente com os ajustes dos modelos. Esses ajustes foram realizados deixando livres para variar somente os parâmetros $\Delta G_I^{H_2O}$, $\Delta G_U^{H_2O}$, Δn_I , Δn_U , $R_{g,I}$. Para os outros parâmetros foram usados os dados experimentais. Os resultados desse ajuste são apresentados na tabela 2.1.

Tabela 2.1: Resultado dos ajustes termodinâmicos dos dados experimentais da desnaturação da lisozima por uréia na solução sem *NaCl* em *pH* 2,9.

Modelo	$\Delta G_I^{H_2O}$ (kCal)	Δn_I	$\Delta G_U^{H_2O}$ (kCal)	Δn_U	$R_{g,I}$ Å	χ^2
Dois Estados	N.A.*	N.A.*	$3,5 \pm 0,6$	12 ± 1	N.A.*	1,63
Três Estados	$-3,7 \pm 0,6$	$-12,2 \pm 1,4$	$1,2 \pm 0,6$	$6,2 \pm 0,9$	$17,09 \pm 0,07$	0,89

*N.A. : não se aplica para esse modelo

Na figura 2.6(b), é apresentada a variação da máxima dimensão da molécula durante seu processo de desnaturação e, no destaque dessa figura, é apresentada uma estimativa do peso molecular para cada concentração de uréia, mostrando que não houve uma variação substancial de peso, indicando que nenhuma agregação ocorreu. A variação que é notada à primeira vista é bem pequena e está relacionada com as flutuações de densidade eletrônica da amostra padrão e daquela em estudo, além de flutuações de volume dos estados diferentes do estado nativo, já que esses estão afetados pelo desnaturante.

Para a solução contendo 50 mM de NaCl, as curvas $I(q)$ e $p(r)$ do estado nativo e do estado de maior alteração por efeito de uréia estão mostradas nas figuras 2.7(a) e 2.7(b), respectivamente. As representações de Kratky desses dois estados são mostradas no destaque. Mais uma vez esses gráficos de Kratky mostram que a lisozima tende a não perder totalmente

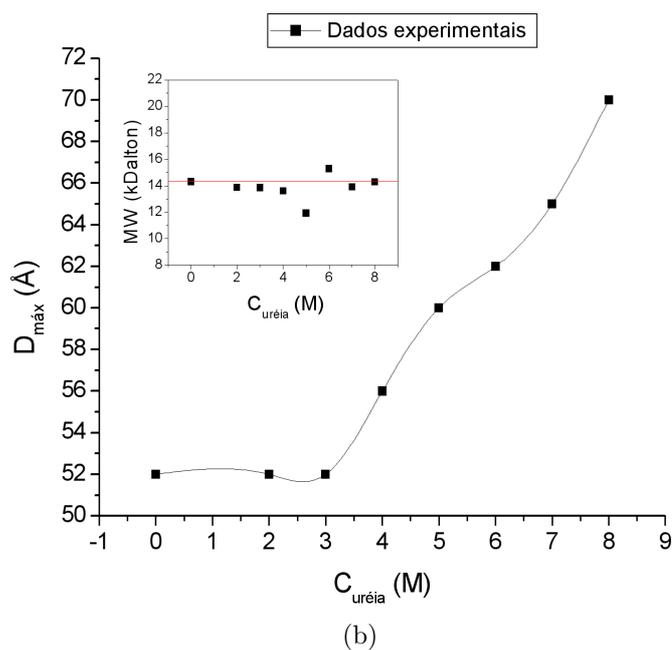
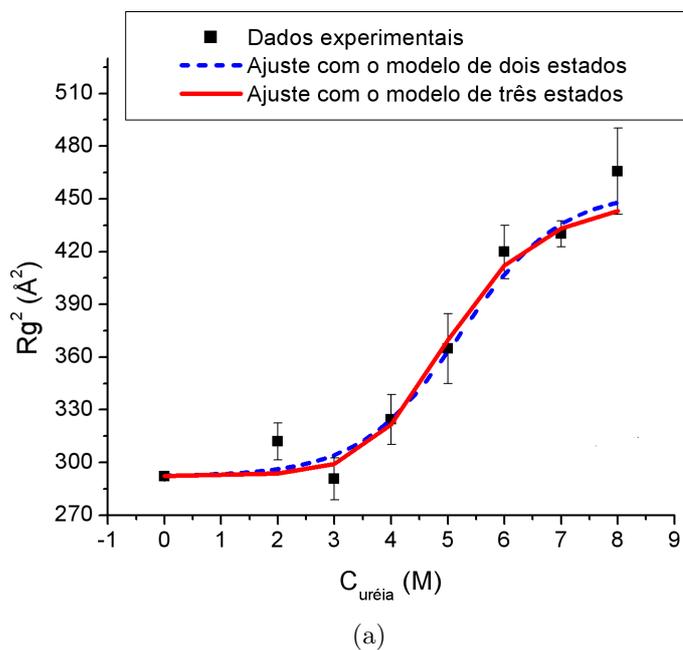


Figura 2.6: (a) Curva de desnaturação R_g^2 vs. $C_{ur\acute{e}ia}$ e ajustes com o modelo de dois estados e com o modelo de três estados [maiores detalhes no texto]. (b) Mudanças na máxima dimensão da partícula durante o processo de desnaturação em função da concentração de uréia [no destaque é mostrado o acompanhamento do peso molecular da lisozima nesse processo, juntamente com o peso molecular teórico (14,32 kDa) da lisozima].

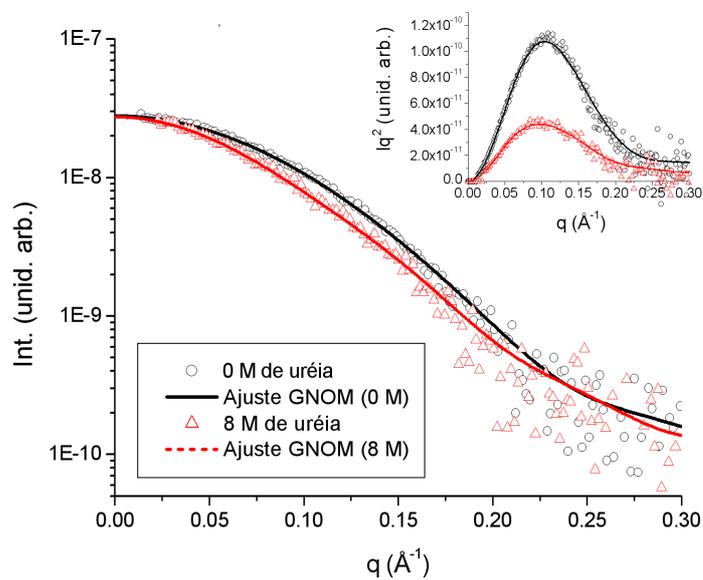
sua globularidade nas condições da solução em estudo quando a proteína é submetida a uma concentração de 8 M de uréia.

Usando novamente o programa GNOM, os ajustes teóricos e cálculo das curvas $p(r)$ foram feitos e são mostrados nas figuras 2.7(a) e 2.7(b). Os parâmetros estruturais obtidos dessa vez foram $R_g = (16,9 \pm 0,3) \text{ \AA}$ e $D_{m\acute{a}x} = 57,5 \text{ \AA}$ para o estado obtido em 0 M de uréia e $R_g = (20,8 \pm 0,8) \text{ \AA}$ e $D_{m\acute{a}x} = 69 \text{ \AA}$ para o estado obtido em 8 M de uréia, indicando uma mudança relevante na estrutura da proteína.

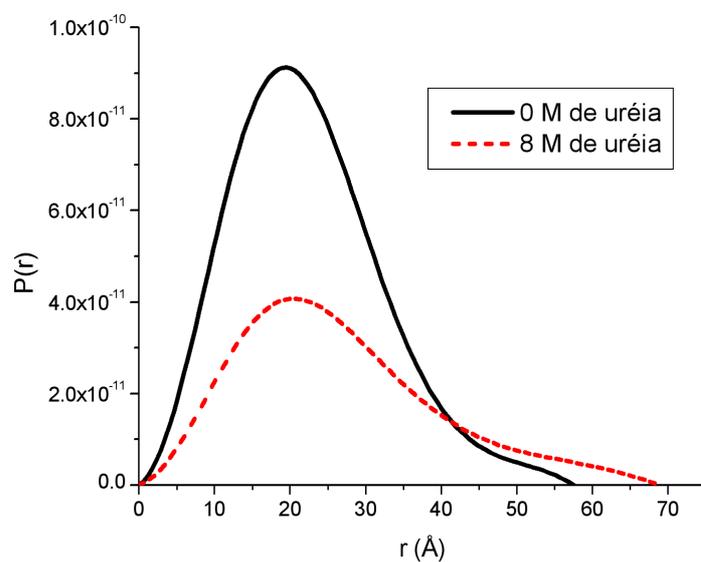
As alterações conformacionais da proteína à medida que a concentração de uréia aumentava também foi acompanhada aqui. As concentrações de desnaturante foram escolhidas foram as mesmas da primeira solução. As mudanças de compacidade das proteínas podem ser vistas na figura 2.8(a) através das alterações nas curvas de Kratky. Foi feito um alisamento nos dados experimentais para permitir uma melhor visualização das curvas. Como aconteceu para a solução sem *NaCl*, aqui também é notado o fato que, à medida que a concentração de uréia aumenta, o máximo dessas curvas vai diminuindo, mas nunca desaparece totalmente. Essas alterações na estrutura também foram acompanhadas através das mudanças nas funções $p(r)$ como mostradas na figura 2.8(b). As alterações estruturais aqui observadas foram bastante semelhantes àquelas observadas na primeira solução sem *NaCl*, mesmo que aqui a força iônica seja maior que na primeira.

Devido à dificuldade de detectar um intermediário, a análise termodinâmica dos dados foi repetida. A curva de desnaturação é apresentada na figura 2.9(a), juntamente com os ajustes dos modelos. Os ajustes foram realizados igualmente aos feitos para a solução sem *NaCl* e os resultados desse ajuste são apresentados na tabela 2.2. Na figura 2.9(b), é apresentada a variação da máxima dimensão da molécula durante seu processo de desnaturação e, no destaque dessa figura, é apresentada uma estimativa do peso molecular para cada concentração de uréia, mostrando que não houve uma variação substancial de peso, indicando que nenhuma agregação ocorreu. A pequena variação observada é atribuída às mesmas flutuações discutidas no primeiro caso.

Das análises termodinâmicas, vemos que o modelo de dois estados ajusta melhor os dados e rende valores de energia livre e número de sítios de ligação mais condizentes com a realidade do problema de desenovelamento. Isso pode ser visto pelo fato que a variação de energia livre entre o estado nativo e o intermediário no modelo de três estados é negativa, o que levaria a supor que o estado intermediário é mais estável que o estado nativo, mas isso não é verdade, pois o estado nativo é mais estável para a proteína. Juntando-se a isso, nesse modelo vemos que o número de sítios de ligação de uréia diminui no estado intermediário em relação ao nativo. Por isso, mesmo que o valor de raio de giro do estado intermediário nos

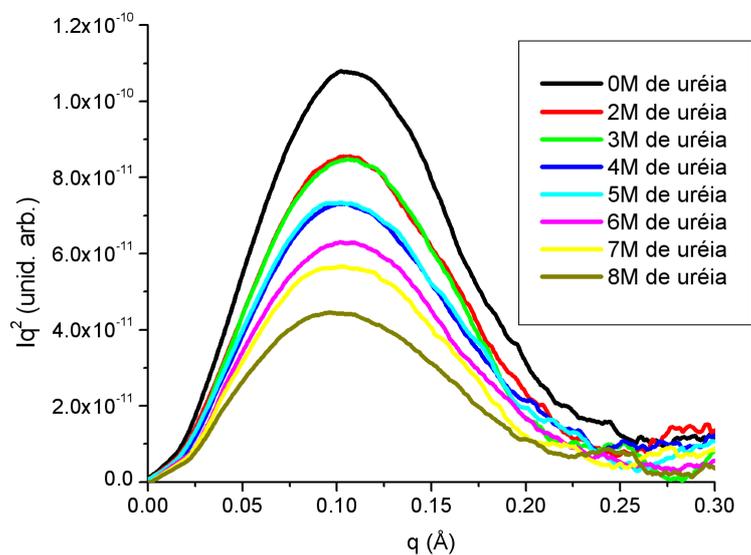


(a)

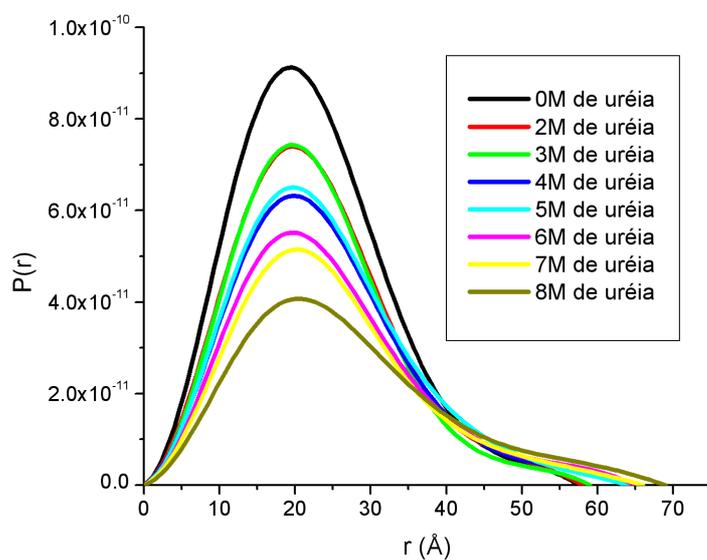


(b)

Figura 2.7: Estado nativo em 0 M de uréia e estado desenovelado por 8 M de uréia na solução com 50 mM de NaCl em pH 2, 9. (a) Curvas de intensidade $I(q)$ com um destaque mostrando as representações de Kratky e nas (b) funções $p(r)$ para esses dois estados (0 M e 8 M de uréia).



(a)



(b)

Figura 2.8: Mudanças conformacionais acompanhadas para cada concentração de uréia, em solução com 50 mM de NaCl , através das mudanças nas (a) curvas de Kratky (foi feito um alisamento nos dados experimentais uma melhor visualização das curvas) e nas (b) funções $p(r)$ da lisozima.

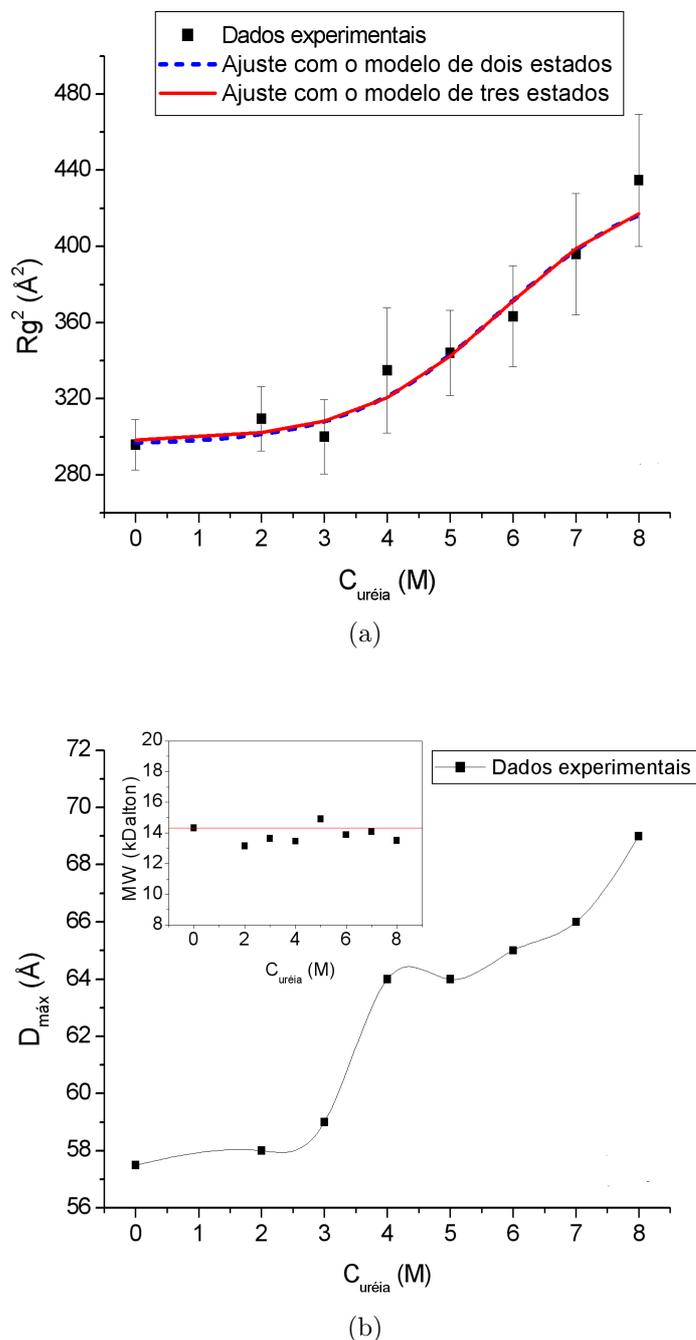


Figura 2.9: (a) Curva de desnatura\u00e7\u00e3o R_g^2 vs. $C_{\text{ur\u00e9ia}}$ e ajustes com o modelo de dois estados e com o modelo de tr\u00eas estados [maiores detalhes no texto]. (b) Mudan\u00e7as na m\u00e1xima dimens\u00e3o da part\u00edcula durante o processo de desnatura\u00e7\u00e3o em fun\u00e7\u00e3o da concentra\u00e7\u00e3o de ur\u00e9ia [no destaque \u00e9 mostrado o acompanhamento do peso molecular da lisozima nesse processo, juntamente com o peso molecular te\u00f3rico (14,32 kDa) da lisozima].

Tabela 2.2: Resultado dos ajustes termodinâmicos dos dados experimentais da desnaturação da lisozima por uréia na solução com 50 mM de NaCl em pH 2,9.

Modelo	$\Delta G_I^{H_2O}$ (kCal)	Δn_I	$\Delta G_U^{H_2O}$ (kCal)	Δn_I	$R_{g,I}$ Å	χ^2
Dois Estados	N.A.*	N.A.*	$2,9 \pm 0,5$	$8,9 \pm 0,9$	N.A.*	0,20
Três Estados	$-0,53 \pm 0,09$	$0,3 \pm 0,9$	$2,3 \pm 0,5$	$9,5 \pm 0,6$	$17,3 \pm 0,9$	0,31

*N.A. : não se aplica para esse modelo

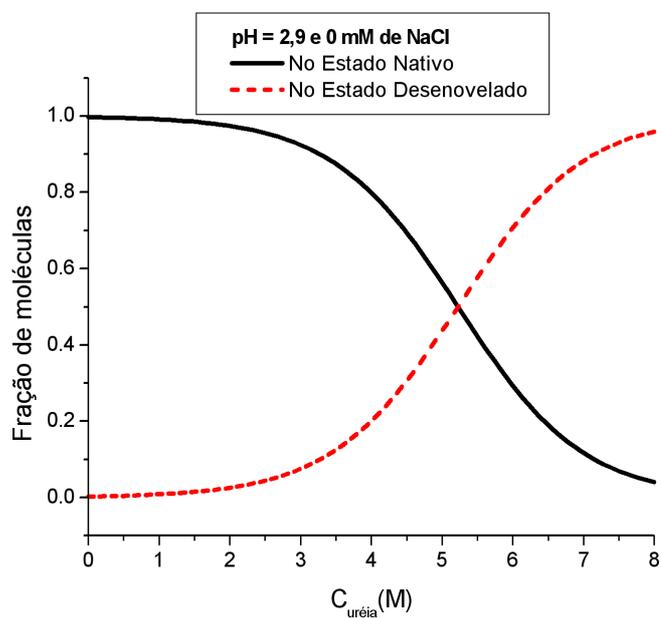
dois casos pudesse ser razoável para prever a sua existência, o modelo não se ajusta com a realidade em ambos os casos. Dessa forma, utilizando o modelo de dois estados, podemos calcular as frações de moléculas nos estados enovelado e desenovelado em cada concentração de uréia através das equações (2.4) e (2.6), fazendo a constante de equilíbrio $K_{N \rightarrow I}^k$ igual a zero e o resultado é apresentado na figura 2.10(a) para a solução sem NaCl e na figura 2.10(b) para a solução com NaCl.

2.5.3 Desnaturação por ação de altas temperaturas

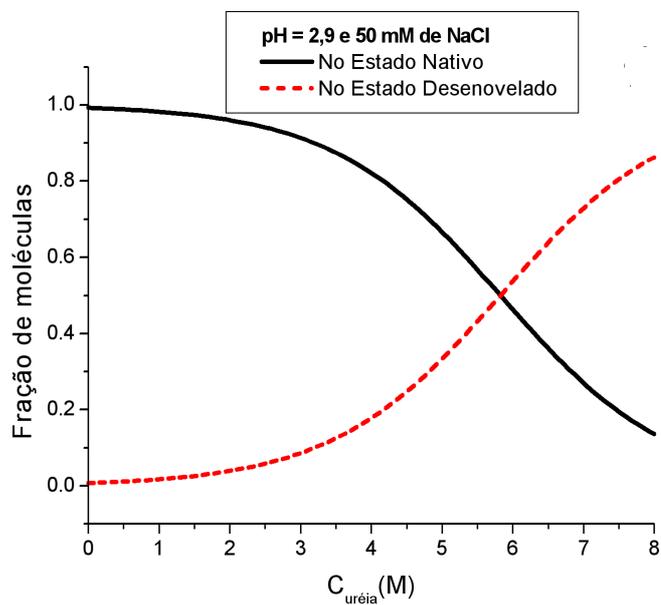
Um tratamento térmico foi aplicado à lisozima com o intuito de provocar a desnaturação da proteína. Ela foi estudada na temperatura ambiente onde obtivemos o espalhamento de sua estrutura nativa. Posteriormente a temperatura foi alterada de 25°C até 80°C utilizando um banho térmico. Para verificar a monodispersidade do estado nativo e do estado desenovelado, a primeira análise feita foi da região de Guinier, onde os resultados são mostrados na figura 2.11(a) para a solução em pH = 2,9 sem NaCl e na figura 2.11(b) para a solução em pH = 2,9 contendo NaCl. Note que há um comportamento bastante linear nessa região, o que indica que a solução é monodispersa.

Para a solução da proteína em tampão citrato em pH 2,9, as curvas $I(q)$ e os gráficos de Kratky em destaque para o estado a 25°C, estado nativo, e o estado a 80°C, estado no qual era esperado máximo desenovelamento, são mostrados na figura 2.12(a). As curvas da função $p(r)$ para cada um desses estados são apresentadas na figura 2.12(b). Dessa forma, os parâmetros estruturais obtidos para os dois estados apresentados na figura 2.12 foram $R_g = (16,6 \pm 0,3)$ Å e $D_{máx} = 50$ Å para o estado a 25°C e $R_g = (21,8 \pm 0,5)$ Å e $D_{máx} = 70$ Å para o estado a 80°C, indicando uma mudança relevante na estrutura da proteína entre esses dois estados.

Acompanhando as mudanças estruturais ocorridas com a alteração de temperatura, as representações de Kratky e as curvas da função $p(r)$ para cada temperatura estão mostradas



(a)



(b)

Figura 2.10: Fração de moléculas nos estados nativo e desenovelado na: (a) solução não contendo *NaCl* e (b) solução contendo *NaCl* no processo de desnaturação por ação do desnaturante uréia.

nas figuras 2.13(a) e 2.13(b), respectivamente. As mudanças de compacidade das proteínas podem ser vistas na figura 2.13(a) através das alterações nas curvas de Kratky. Foi feito um alisamento nos dados experimentais para permitir uma melhor visualização das curvas. Notamos aqui também que, à medida que a temperatura aumenta, o máximo dessas curvas vai diminuindo, mas nunca desaparece totalmente. Essas alterações na estrutura também foram acompanhadas através das mudanças nas curvas $p(r)$ como mostradas na figura 2.13(b). Como vemos, até 40°C não foram observadas mudanças substanciais na estrutura, mas acima dessa temperatura nos começamos a observar importantes modificações estruturais como mudanças no raio de giro, dimensão máxima e forma da molécula observadas através das mudanças nas curvas $p(r)$.

Pelo motivo da dificuldade de determinar intermediários nas mudanças conformacionais da lisozima, novamente foi tentado aplicar um modelo termodinâmico supondo a existência, ou não, de um intermediário durante o processo de desenovelamento. Sendo assim, os modelos para dois e três estados de enovelamentos apresentados na seção 2.4.2 foram aplicados utilizando a equação (2.12) para ajustar a curva de desnaturação R_g^2 vs. T . Essa curva de desnaturação é apresentada na figura 2.14(a) juntamente com os ajustes dos modelos. Esses ajustes foram realizados deixando livre para variar somente os parâmetros ΔH_I^0 , ΔH_U^0 , ΔS_I^0 , ΔS_U^0 , $R_{g,I}$. Para os outros parâmetros foram usados os dados experimentais. Os resultados desses ajustes são apresentados na tabela 2.3.

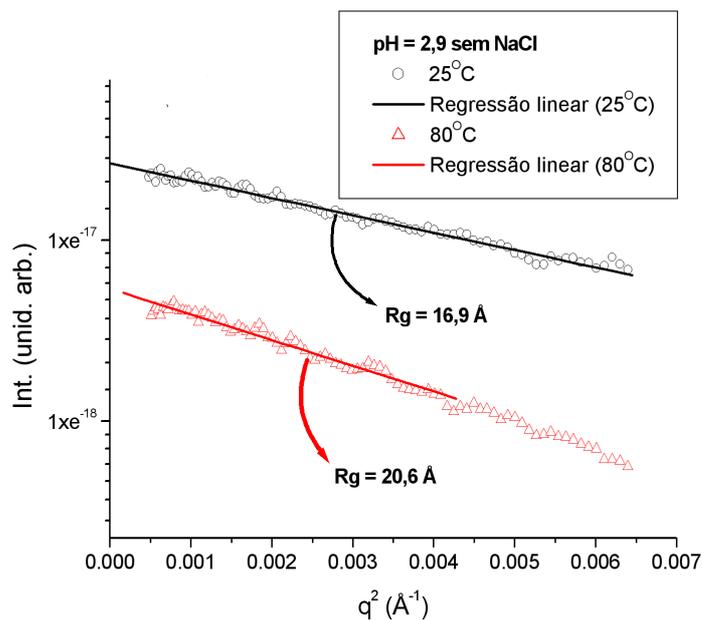
Tabela 2.3: Resultado dos ajustes termodinâmicos dos dados experimentais da desnaturação da lisozima por altas temperaturas na solução sem NaCl em $\text{pH } 2,9$.

Modelo	ΔH_I^0 (kCal)	ΔS_I^0 (cal/K)	ΔS_U^0 (kCal)	ΔS_U^0 (cal/K)	$R_{g,I}$ Å	χ^2
Dois Estados	N.A.*	N.A.*	$1,1 \pm 0,1$	20 ± 2	N.A.*	0,21
Três Estados	$-0,60 \pm 0,05$	$1,9 \pm 0,5$	$0,40 \pm 0,05$	22 ± 2	$16,7 \pm 0,2$	0,17

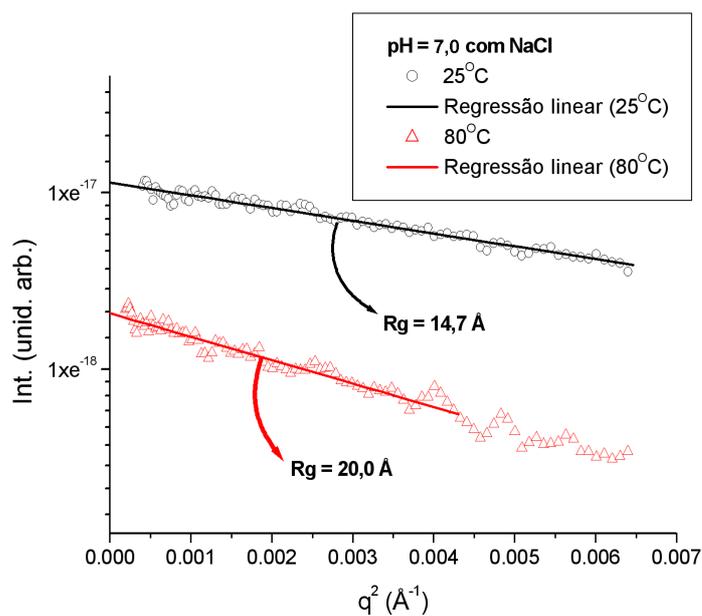
*N.A. : não se aplica para esse modelo

Na figura 2.14(b), é apresentada a variação da máxima dimensão da molécula durante seu processo de desnaturação e, no destaque dessa figura, é apresentada uma estimativa do peso molecular para cada temperatura, não apresentando variação substancial de peso, ou seja, nenhuma agregação ocorreu. A pequena variação é atribuída às flutuações já discutidas, e associadas ao calor absorvido pelas moléculas.

A fim de tentar compreender melhor a desnaturação térmica da lisozima, as mudanças conformacionais dessa proteína por efeito do calor foi novamente estudada, mas dessa vez a solução utilizada estava em $\text{pH } 7,0$ tamponada por Tris. Essa solução foi primeiramente



(a)



(b)

Figura 2.11: Gráficos mostrando a linearidade das curvas de espalhamento na região de Guinier para os estados nativo e desenovelado da lisozima nas soluções: (a) em $pH = 2,9$ sem $NaCl$ e (b) em $pH = 7,0$ contendo $NaCl$. Valores de raio de giro obtidos da regressão linear e usando a equação 1.14 estão mostrados.

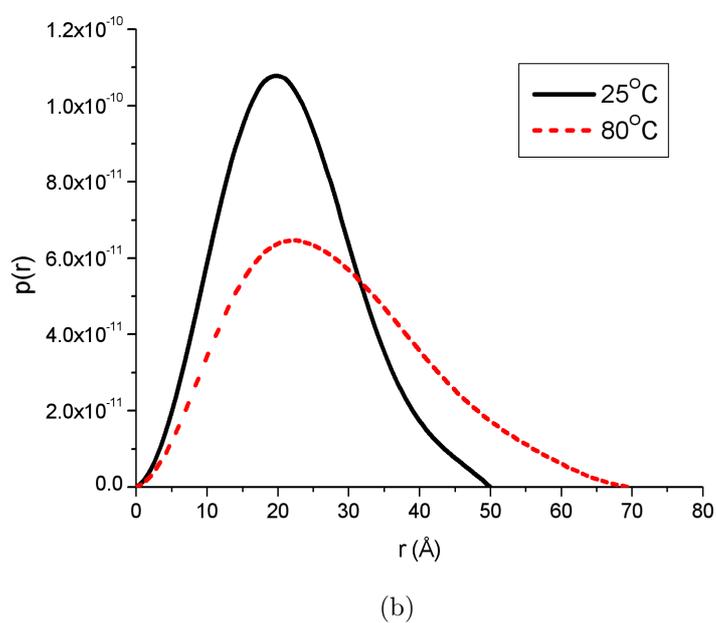
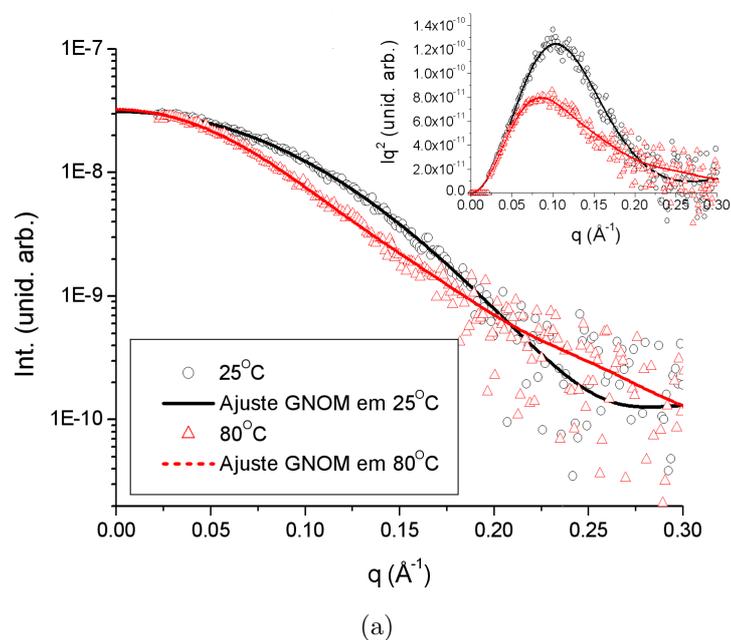
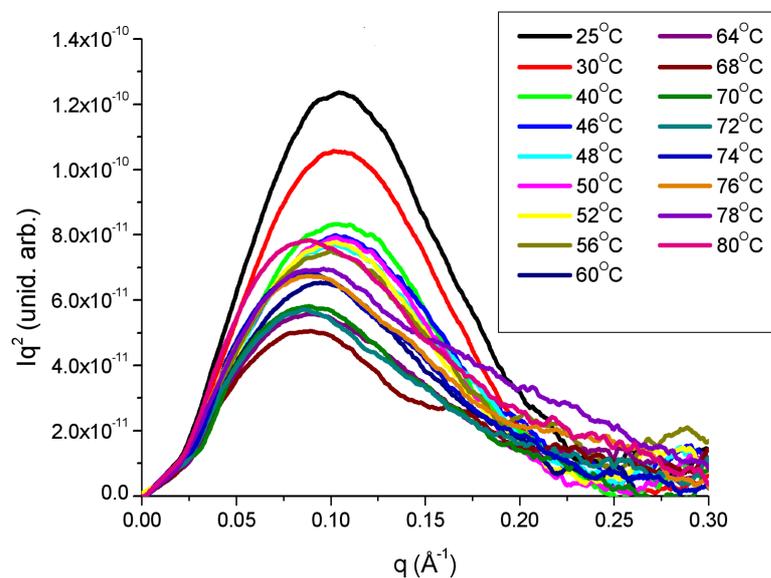
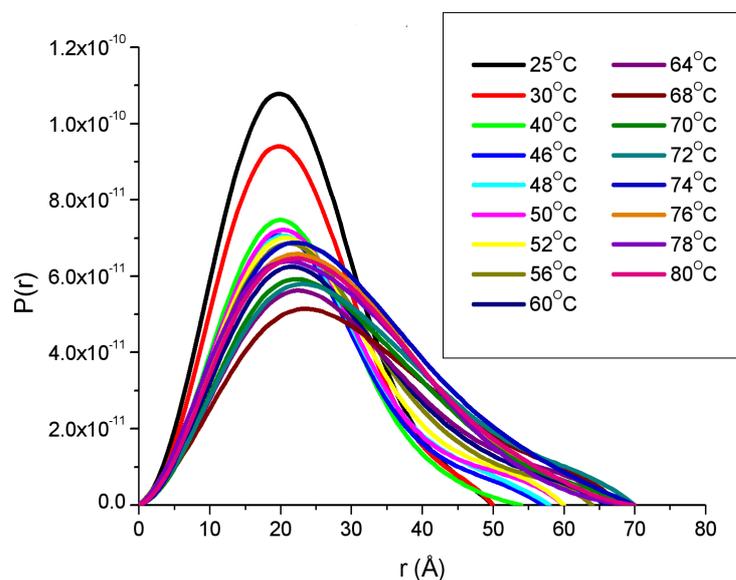


Figura 2.12: Estado nativo a 25°C e estado desenovelado a 80°C na solução sem NaCl em pH 2,9. (a) Curvas de intensidade $I(q)$ com um destaque mostrando as representações de Kratky e nas (b) funções $p(r)$ para esses dois estados.

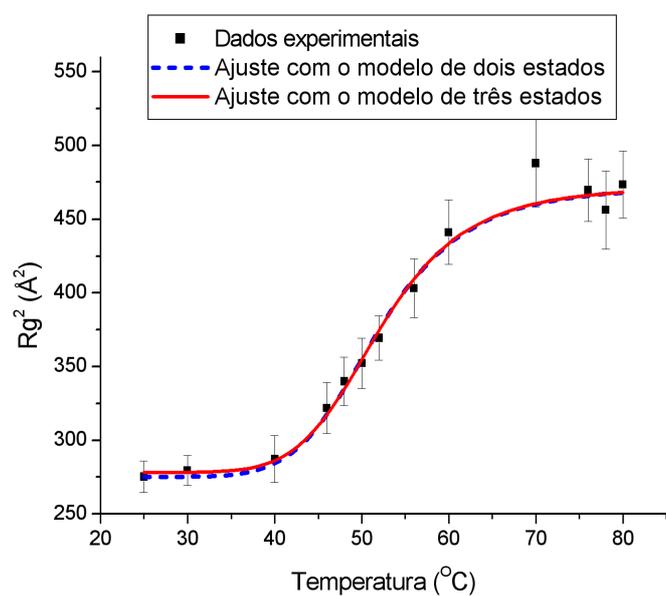


(a)

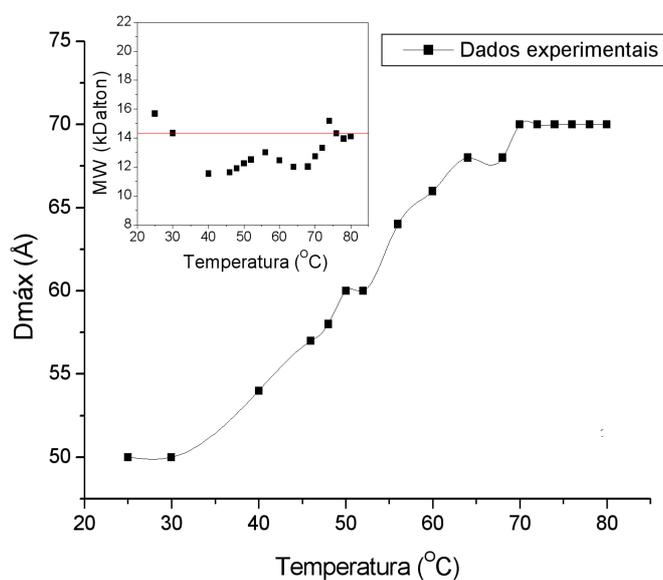


(b)

Figura 2.13: Mudanças conformacionais acompanhadas para cada temperatura, em solução a pH 2, 9, através das mudanças nas (a) curvas de Kratky (foi feito um alisamento nos dados experimentais uma melhor visualização das curvas) e nas (b) funções $p(r)$ da lisozima.



(a)



(b)

Figura 2.14: (a) Curva de desnaturação R_g^2 vs. T e ajustes com o modelo de dois estados e com o modelo de três estados [maiores detalhes no texto]. (b) Mudanças na máxima dimensão da partícula durante o processo de desnaturação em função da temperatura [no destaque é mostrado o acompanhamento do peso molecular da lisozima nesse processo, juntamente com o peso molecular teórico (14,32 kDa) da lisozima].

testada e foi notada agregação após a desnaturação da proteína para temperaturas acima de 78°C (dados não mostrados). Como nosso objetivo não era estudar agregação por enquanto, essa experiência foi repetida com adição de 50 mM de NaCl à solução e as curvas $I(q)$ para dois estados, um a 25°C e outro a 80°C , são mostradas na figura 2.15(a). Os gráficos de Kratky para esses dois estados são mostrados também no destaque dessa figura. As curvas da função $p(r)$ para esses dois estados, calculadas a partir dos dados experimentais de espalhamento da figura 2.15(a), são mostradas na figura 2.15(b), onde podemos notar uma variação relevante entre as estruturas desses dois estados. Os parâmetros estruturais obtidos para os dois estados apresentados nas figuras 2.15(a) e 2.15(b) foram $R_g = (14,7 \pm 0,3)\text{ \AA}$ e $D_{m\acute{a}x} = 44\text{ \AA}$ para o estado a 25°C e $R_g = (20,6 \pm 0,6)\text{ \AA}$ e $D_{m\acute{a}x} = 72\text{ \AA}$ para o estado a 80°C , indicando uma mudança relevante na estrutura da proteína entre esses dois estados.

Além desses dois estados extremos, outros estados conformacionais da proteína durante sua desnaturação térmica foram detectados para temperaturas entre 25°C e 80°C . Os gráficos de Kratky e as curvas da função $p(r)$ para esses estados estão mostrados nas figuras 2.16(a) e 2.16(b), respectivamente. Para uma melhor visualização das curvas de Kratky foi feito um alisamento nos dados experimentais. Essas curvas mostram a diminuição da compacidade da molécula da proteína à medida que a temperatura aumenta, como era esperado, devido ao desenovelamento da molécula. Entretanto, podemos ver que a princípio a proteína não tem um desenovelamento completo, pois a forma da curva de Kratky no estado mais desenovelado não perde seu máximo e ainda mantém uma forma que lembra um sino, porém esse estado é bastante diferente do estado nativo. Pode ser notado também que ocorreram mudanças de forma através das curvas $p(r)$ para temperaturas acima de 68°C .

Com o mesmo intuito de outras experiências de tentar encontrar indícios de ao menos um estado intermediário de desenovelamento da lisozima, o modelo termodinâmico para processos de dois e três estados de desenovelamento foram aplicados utilizando novamente a equação 2.12. A aplicação desses modelos e os ajustes de mínimos quadrados não-linear foram realizados exatamente da mesma maneira que foi feita anteriormente para a desnaturação térmica da lisozima em solução sem NaCl a pH 2,9. A curva de desnaturação e os ajustes feitos com os modelos são apresentados na figura 2.17(a) e os resultados dos ajustes são mostrados na tabela 2.4. Além disso, na figura 2.17(b), é apresentada a variação da máxima dimensão da molécula durante seu processo de desnaturação e, no destaque dessa figura, é apresentada uma estimativa do peso molecular para cada temperatura, não apresentando variação substancial de peso, ou seja, nenhuma agregação ocorreu. A pequena variação é atribuída às flutuações já discutidas, e associadas ao calor absorvido pelas moléculas.

Das análises termodinâmicas, vemos que o modelo de dois estados ajusta melhor os

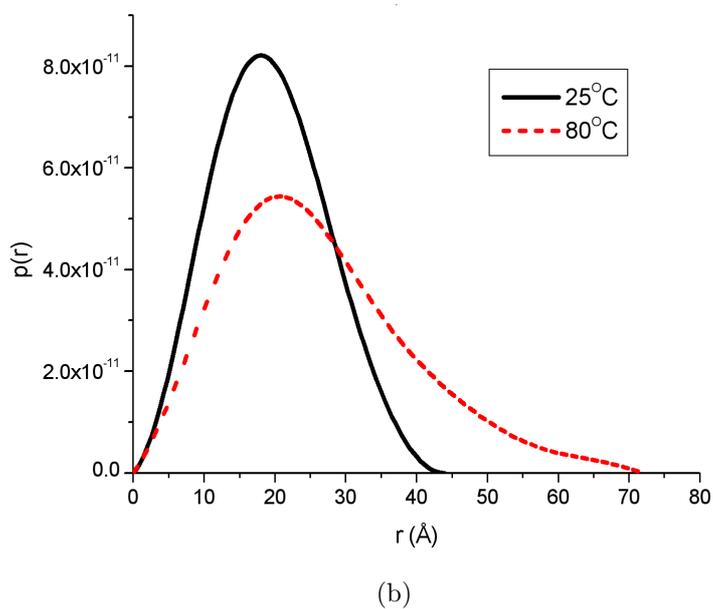
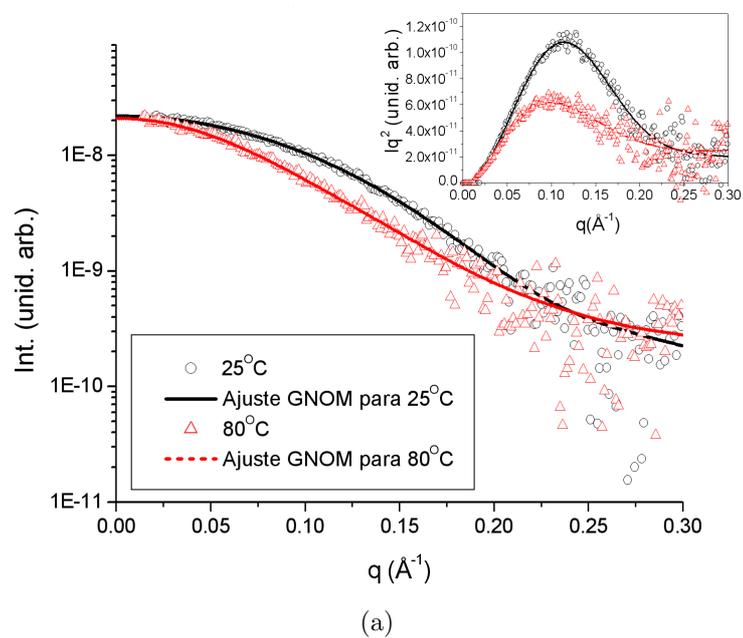
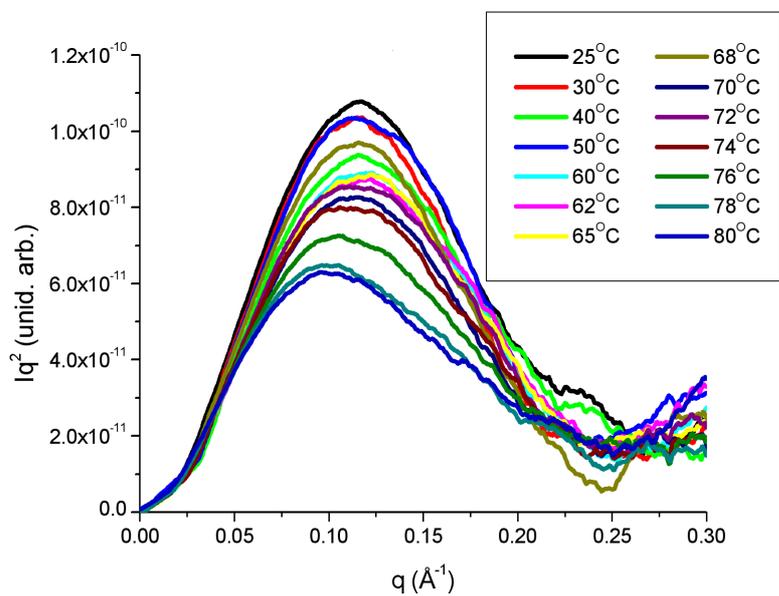
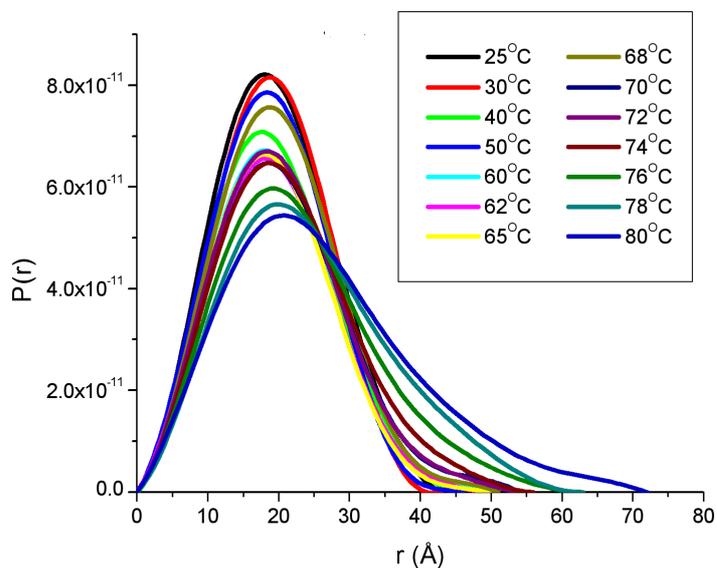


Figura 2.15: Estado nativo a 25°C e estado desenovelado a 80°C na solução com NaCl em pH 7,0. (a) Curvas de intensidade $I(q)$ com um destaque mostrando as representações de Kratky e nas (b) funções $p(r)$ para esses dois estados.

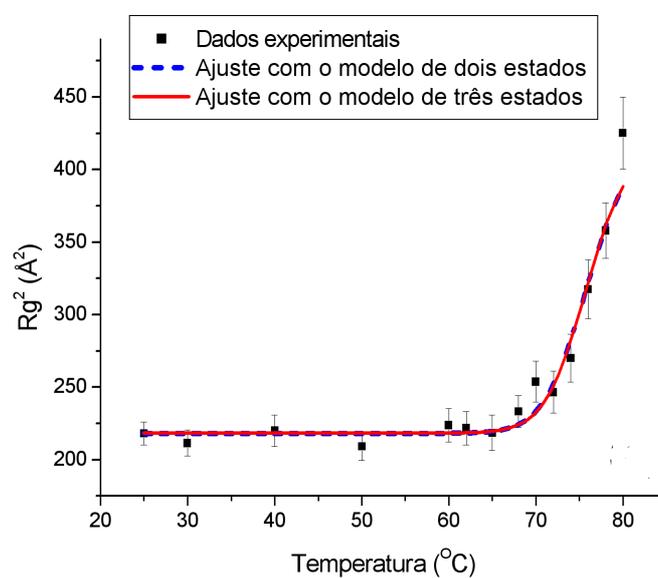


(a)

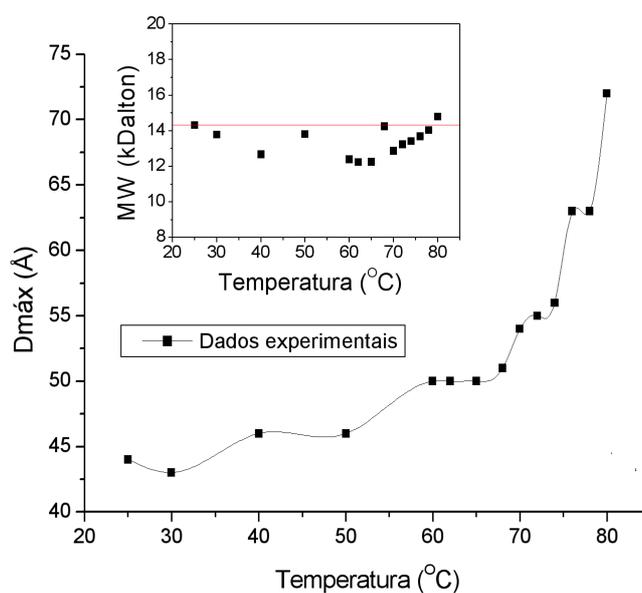


(b)

Figura 2.16: Mudanças conformacionais acompanhadas para cada temperatura, em solução a pH 7,0 com 50 mM de $NaCl$, através das mudanças nas (a) curvas de Krakty (foi feito um alisamento nos dados experimentais para uma melhor visualização das curvas) e nas (b) funções $p(r)$ da lisozima.



(a)



(b)

Figura 2.17: (a) Curva de desnaturação R_g^2 vs. T e ajustes com o modelo de dois estados e com o modelo de três estados [maiores detalhes no texto]. (b) Mudanças na máxima dimensão da partícula durante o processo de desnaturação em função da temperatura [no destaque é mostrado o acompanhamento do peso molecular da lisozima nesse processo, juntamente com o peso molecular teórico (14,32 kDa) da lisozima].

Tabela 2.4: Resultado dos ajustes termodinâmicos dos dados experimentais da desnaturação da lisozima por altas temperaturas na solução com 50 mM de NaCl em pH 7,0.

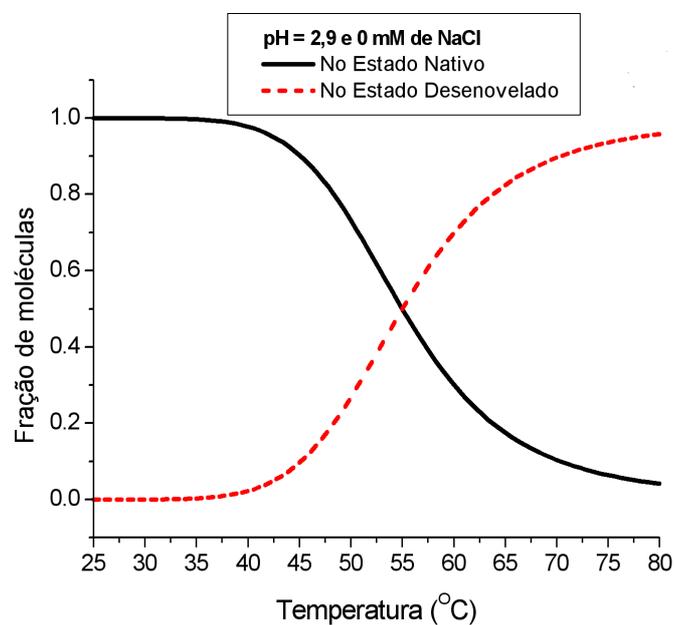
Modelo	ΔH_I^0 (kCal)	ΔS_I^0 (cal/K)	ΔS_U^0 (kCal)	ΔS_I^0 (cal/K)	$R_{g,I}$ Å	χ^2
Dois Estados	N.A.*	N.A.*	$4,5 \pm 0,8$	59 ± 9	N.A.*	0,63
Três Estados	$-4,5 \pm 0,9$	-51 ± 3	$-0,16 \pm 0,03$	9 ± 2	$14,8 \pm 0,2$	0,85

*N.A. : não se aplica para esse modelo

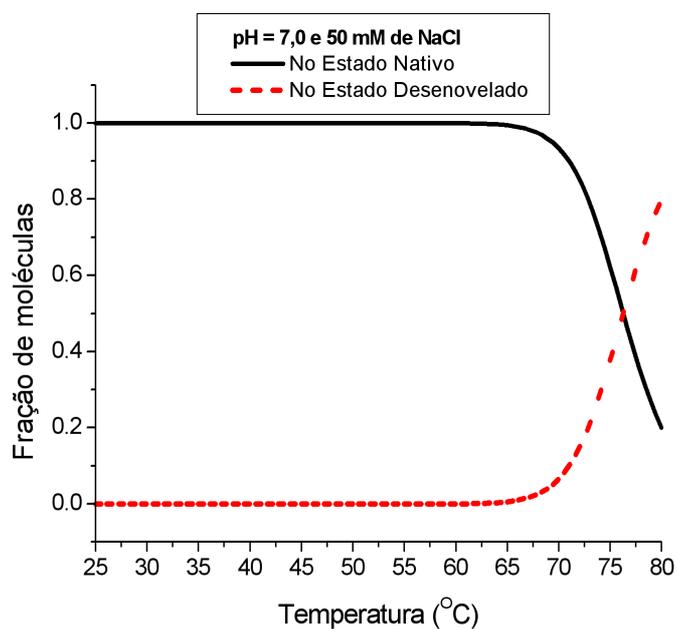
dados rendendo valores de variação de entalpia e entropia mais condizentes com a realidade do problema de desenovelamento para as duas soluções, uma em pH 2,9 sem NaCl e a outra em pH 7,0 com NaCl. Isso pode ser visto pelo fato que a variação de entalpia entre o estado nativo e o intermediário no modelo de três estados é negativa, o que levaria a supor que a transformação do estado nativo para o intermediário fosse uma transformação exotérmica, ou seja, estaria liberando calor, e como a combinação da variação de entropia também é negativa, concluiríamos que o estado intermediário é mais estável que o nativo. Entretanto isso não é verdade, pois o estado nativo é, por hipótese, o mais estável. Por isso, mesmo que o valor de raio de giro do estado intermediário nos dois casos pudesse ser razoável para prever a sua existência, o modelo não se ajusta com a realidade em ambos os casos. Dessa forma, utilizando o modelo de dois estados, podemos calcular as frações de moléculas nos estados enovelado e desenovelado em cada temperatura através das equações de (2.4) à (2.6), fazendo a constante de equilíbrio $K_{N \rightarrow I}^k$ igual a zero e o resultado é apresentado na figura 2.18(a) para a solução sem NaCl a pH 2,9 e na figura 2.18(b) para a solução com NaCl em pH 7,0.

2.6 Discussões

A primeira coisa que podemos dizer das experiências aqui realizadas para a desnaturação da lisozima é que essa proteína apresenta certa resistência em se desenovelar por completo, pois ela sempre manteve certa compacidade molecular até no estado mais desenovelado e nenhum aumento nas curvas de Kratky a altos valores q , o que seria típico do espalhamento de *random coils*. Entretanto, mudanças conformacionais ocorreram sem dúvida, modificando o estado nativo da proteína seja por ação do desnaturante uréia ou por efeito de altas temperaturas, independente da solução em que a proteína foi solubilizada. Todas essas mudanças foram facilmente detectadas pela técnica de SAXS.



(a)



(b)

Figura 2.18: Fração de moléculas nos estados nativo e desenovelado na: (a) solução não contendo *NaCl* em *pH* 2,9 e (b) solução contendo *NaCl* em *pH* 7,0 no processo de desnaturação por ação de altas temperaturas.

Outra coisa importante a ser notada foi que o estado nativo das proteínas em soluções em pH ácido apresenta certo aumento nos valores de raio de giro e dimensão máxima quando comparados com os valores obtidos em solução em pH neutro e dos valores obtidos a partir da estrutura cristalina. Isso pode ser atribuído à força iônica da solução ácida que é maior que a da solução neutra. Todavia, em todos os casos o raio de giro e dimensão máxima dos estados desenovelados foram aproximadamente os mesmos, indicando que a força iônica não afeta substancialmente o estado desenovelado da lisozima, mas sim o seu processo de desnaturação.

Através dos cálculos das frações de moléculas, assumindo o estado desenovelado como sendo o estado de maior desenovelamento da proteína, vemos que as condições da solução influenciam diretamente no início do processo de desnaturação da lisozima. Isso é evidenciado pelo fato de que nas soluções ácidas, a lisozima começou a perder sua conformação nativa em torno de uma concentração de uréia de $2 M$ no processo de desnaturação por uréia, porém na solução com $NaCl$ a desnaturação da lisozima se iniciou em uma concentração maior que na solução sem $NaCl$. Na primeira, quando a concentração de uréia está acima de aproximadamente $5,3 M$, a fração de moléculas no estado nativo foi da mesma ordem da fração de moléculas no estado desenovelado em equilíbrio, e acima disso, a fração desenovelada foi maior, sendo que em torno de $8 M$ ela já estava em torno de 1. Enquanto isso, na solução com a adição de $NaCl$, somente quando a solução está com $6 M$ de uréia a fração enovelada e desenovelada foram equiparáveis. Acima disso, a fração desenovelada é maior, porém em uma concentração de uréia em torno de $8 M$, ainda há uma fração pequena de estados enovelados. Isso mostra que os íons adicionais na solução, por razão do $NaCl$, aumentam sua força iônica e auxiliam na persistência da molécula de lisozima em não sofrer desnaturação por ação de uréia.

Já no processo de desnaturação térmica, pode ser visto que a solução neutra sem a adição de $NaCl$ induz a uma agregação da lisozima após sua desnaturação em altas temperaturas. Porém, com a adição de $NaCl$ na solução, isso não ocorre. Também é visto que em solução ácida a adição de $NaCl$ não foi necessária para evitar agregação. Entretanto, foi notado que a desnaturação da proteína ocorre em uma concentração menor de uréia na solução ácida quando comparada com a solução neutra. Isso indica que a força iônica da solução ácida auxilia na desnaturação da proteína, enquanto que a força iônica causada simplesmente pela adição de $NaCl$ não faz o mesmo. Vemos que acima de $55^{\circ}C$, a fração desnaturada já é maior que a fração enovelada da lisozima na solução ácida e, em $80^{\circ}C$, a fração enovelada é praticamente nula. A mesma coisa não acontece na solução neutra, onde a lisozima começa a perder sua conformação nativa em torno de $65^{\circ}C$, sendo que acima de $77^{\circ}C$ a fração desenovelada já é maior, porém quando a temperatura está em torno de $80^{\circ}C$, ainda é

possível detectar uma fração relevante de moléculas enoveladas, ainda que menor que a fração desenovelada, em equilíbrio.

Por fim, os ajustes termodinâmicos usando os modelos de dois e de três estados, com o intuito de observar indícios de intermediário no processo de desnaturação da lisozima, não apresentaram nenhuma evidência comprovada de estados intermediários. Isso mostrou a alta cooperatividade presente no processo de desnaturação da lisozima, tanto por ação do desnaturante uréia, quando por ação de altas temperaturas. As interações moleculares, as interações hidrofóbicas e de van der Waals, além de interações eletrostáticas e das ligações de hidrogênio, todas elas atuam cooperativamente no processo de desnaturação da lisozima, tornando ainda mais difícil a detecção de um estado intermediário. Isso pode ser notado também pela pequena variação de energia livre entre os estados enovelado e desenovelado, observada em cada caso, quando comparada com a variação de outras proteínas [Perez *et al.*, 2001]. Isso pode indicar que os trajetos de desenovelamento no modelo de superfície de energia dos processos de desnaturação aqui detectados não passaram por uma grande rugosidade, pela ocorrência dessa pequena variação de energia e do fato de não se observar indícios de intermediários. Além disso, como podemos relacionar a variação de entropia na desnaturação térmica entre o estado enovelado e o desenovelado da lisozima com as interações hidrofóbicas, vemos que essas interações aumentam bastante durante o processo, concluindo que elas são predominantes durante a desnaturação da lisozima, comprovando sua alta cooperatividade.

2.7 Conclusões

Desse trabalho, pudemos concluir que a lisozima apresenta uma alta cooperatividade em seu processo de desnaturação, sendo que as interações predominantes nesse caso são aquelas causadas por interações hidrofóbicas. Nenhum estado intermediário foi detectado em nossos experimentos devido a esse efeito.

Além disso, a lisozima também apresentou uma resistência a não perder totalmente sua compacidade no estado mais desenovelado observado quando as condições dos agentes desnaturantes (uréia ou temperatura) eram extremas. A molécula dessa proteína não assume uma conformação do tipo *random coils* quando ela está no estado desenovelado, como pudemos ver através das curvas de Kratky desse estado que não apresentaram um aumento em altos valores de q , como acontece, por exemplo, no estado desenovelado da heparina [Chen *et al.*, 1996], uma proteína pequena como a lisozima.

Também pudemos apresentar a potencialidade da técnica de SAXS para observar as

mudanças conformacionais da estrutura terciária de biomoléculas. Também, relacionando os conceitos de SAXS com a termodinâmica dos processos de desenovelamento de proteínas, foi possível mostrar uma ferramenta importante para observar indícios de estados intermediários independentes, em equilíbrio com estados enovelados e desenovelados, da lisozima. Isso faz da técnica da SAXS uma técnica singular para esse tipo de estudo.

3

Estudo por SAXS da oligomerização e agregação da proteína β -Lactoglobulina irradiada por radiação gama

3.1 Introdução

Este trabalho foi realizado em colaboração com Dra. Lucia de la Hoz e Profa. Dra. Flávia M. Netto, ambas pertencentes à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp. Aqui são apresentados os estudos feitos por SAXS do qual eu estive envolvido, juntamente com o Dr. Cristiano Luis Pinto de Oliveira¹, e cujos resultados fizeram parte de uma publicação internacional [Oliveira *et al.*, 2007].

A irradiação de proteínas pode induzir mudanças em suas estruturas e pode alterar suas propriedades funcionais. Moléculas da proteína irradiadas no estado sólido absorvem diretamente a energia da radiação, produzindo mudanças em consequência do chamado “efeito direto”. Em solução aquosa, a radiação age principalmente nas moléculas de água produzindo espécies ativas tais como radicais hidroxila ($\bullet OH$) e elétrons hidratados (e_{aq}^-) que, por sua vez, reagem com as moléculas da proteína. Neste caso, a radiólise da proteína ocorre em consequência do “efeito indireto” [Yamamoto, 1992].

A descontaminação de alimentos por radiação ionizante é um processo seguro, eficaz, ambientalmente limpo e com eficiência de energia [Farkas, 1998]. Esse processo tem se

¹Atualmente trabalhando como pós-doc no Departamento de Química da Universidade de Århus na Dinamarca.

tornado uma das tecnologias mais discutidas recentemente, não obstante aprovadas em 37 países [<http://www.physics.isu.edu/radinf/food.htm>].

A irradiação é útil para a preservação do alimento destruindo ou inativando organismos que o estragam e causam sua decomposição, estendendo sua vida útil. Os alimentos também podem ser esterilizados por irradiação. Alimentos esterilizados são muito úteis em hospitais para pacientes com seus sistemas imunológicos severamente danificados, e também podem ser usados em projetos militares e no aparelhamento das necessidades de sobrevivência da tripulação de vôos espaciais [<http://www.physics.isu.edu/radinf/food.htm>; De Bruyn, 2000].

Há também uma tentativa de usar a radiação em outras aplicações tecnológicas. Ela pode ser usada para melhorar as cores de produtos alimentícios [Byun *et al.*, 2000] e as propriedades mecânicas de películas comestíveis biodegradáveis [Le Tien *et al.*, 2000; Sabato *et al.*, 2001; Letendre *et al.*, 2002]. Radiação ionizante também tem sido testada para reduzir a alergenicidade de algumas das substâncias do leite que provocam alergia, como por exemplo, a proteína β -Lactoglobulina (β -LG) [Lee *et al.*, 2001].

A β -LG, principal proteína no soro de leite (50%), é uma proteína globular com massa molar de aproximadamente 18,4 Kg/mol, com 162 aminoácidos em sua cadeia. Sua estrutura é conhecida dos estudos cristalográficos e está relacionada à família de proteínas lipocalinas [Papiz *et al.*, 1986; Brownlow *et al.*, 1997]. Ela tem uma estrutura globular bastante compacta na qual as folhas β aparecem em uma estrutura tipo barril ou cálice (figura 3.1). A estrutura quaternária da β -LG é predominantemente dimérica sob circunstâncias fisiológicas [Hambling *et al.*, 1992]. A proteína contém cinco resíduos de cisteína por monômero, um livre e quatro envolvidos em pontes de dissulfeto [Brownlow *et al.*, 1997]. Alto valor nutricional, boas propriedades funcionais, solubilidade e estabilidade em diferentes valores de pH e características imunogênicas são as principais características desta proteína [Morr & Foegeding, 1990; Wong *et al.*, 1996; Taulier & Chalikian, 2001; Kella & Kinsella, 1988; Spies, 1973; Sélo *et al.*, 1999]. Atualmente, a β -LG é obtida em grandes quantidades e com alta pureza usando processos de ultrafiltração de membrana [Maubois *et al.*, 1987].

Diversas investigações sobre a qualidade nutricional de proteínas irradiadas, incluindo a β -LG, têm sido relatadas ultimamente. Entretanto, estudos sobre o efeito do tratamento de irradiação nas estruturas e nas propriedades conformacionais das moléculas estão faltando.

A técnica de SAXS foi utilizada com sucesso para analisar a associação induzida por NaCl da β -LG [Baldini *et al.*, 1999] e para descrever as características de oligômeros isolados resultantes de um tratamento térmico [Carrota *et al.*, 2003]. Desnaturação, induzida por pressão e por temperatura, e agregação da β -LG foram monitoradas por SAXS em um estudo realizado por Panick *et al.* [1999].

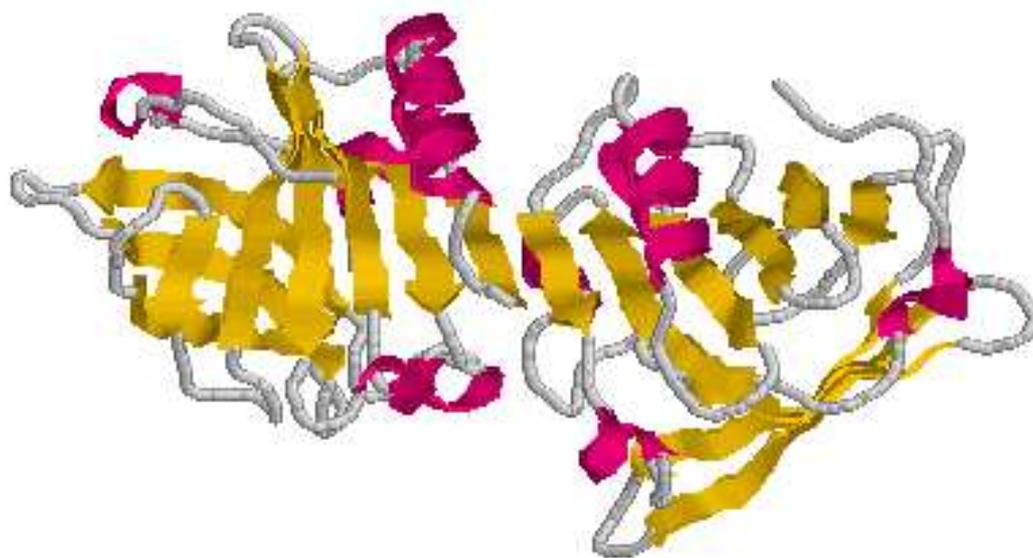


Figura 3.1: Estrutura de alta resolução da proteína β -Lactoglobulina obtida através da técnica de cristalografia de proteína e registrada no Protein Data Bank com o código PDB 1beb.

3.2 Objetivos

O alvo desta parte do trabalho de tese foi estudar as mudanças conformacionais da proteína β -LG, no estado sólido e em solução, sob o efeito de irradiação com radiação gama e propor um modelo do processo de agregação e das estruturas oligoméricas formadas.

3.3 Materiais e Métodos

3.3.1 Materiais e Preparação da proteína

A β -LG comercial, BioPURE Betalactoglobulina (variantes *A* e *B*) foi fornecida por *Davisco Alimentos Internacional Inc.* (Food Ingredient Company, Le Sueur, MN, EUA). Para o estudo aqui proposto a proteína foi preparada no estado sólido, com diferentes atividades de água², e em solução, com diferentes concentrações.

Para obter a β -LG com diferentes atividades de água, o pó de β -LG com uma a_w inicial de 0,22 foi passado rapidamente através de uma nuvem fina de água pulverizada gerada

²A quantidade de água presente em uma substância pode se encontrada na forma de água ligada e não-ligada. Atividade de água é a disponibilidade relativa de água na substância. A relação entre o teor de água ligada e não-ligada é denominada de atividade de água. É definida também como a pressão de vapor da água incorporada dividida por aquela da água pura e é comumente denominada por a_w .

por um vaporizador de ultrassom (MOD. US-2000, ICEL, Manaus, AM, Brasil). As parcelas de proteína hidratada foram colocadas nos dissecadores em atmosfera de umidade relativa constante de 52,9%, usando uma solução saturada de $Mg(NO_3)_2$, e de 75,1%, usando uma solução saturada de $NaCl$, em $25^\circ C$, até que o equilíbrio fosse alcançado. As medidas do a_w destas amostras foram feitas após 2 dias usando um medidor da atividade de água (Water Activity Meter), Modelo AquaLab Série 3TE (Decagon Devices, Inc.; Pullman, WA, EUA). Os valores finais foram de $a_w = 0,53$ para as amostras equilibradas em $Mg(NO_3)_2$, e de 0,74 para as amostras equilibradas na solução de $NaCl$. Soluções de β -LG (a_w : 0,22) foram preparadas em um tampão de fostafo de sódio 10 mM, pH 7,0 em concentração de 3 e de 10 mg/mL.

3.3.2 Tratamento com a radiação gama

As amostras da proteína com atividade de água 0,22, 0,53, e 0,74 (correspondendo a 0,06, 0,12 e 0,18 g de H_2O/g de proteína, respectivamente) foram condicionadas em sacos plásticos com o interior laminado e selados a vácuo. As soluções de proteína em 3 e 10 mg/mL foram colocadas em tubos de vidro Pyrex (14 x 1,5 cm I.D.) com tampas, sob uma atmosfera comum. A proteína no estado sólido ou na solução foi irradiada com um irradiador gama com cela de $Co - 60$, (Gamma cell GC220, AECL, Ottawa, Canadá, com uma atividade de c_{ia} : 12500ci, taxa de dose: 4,34 kGy/h, e Gamma cell 220, Excel Northern, Canadá, c_{ia} : 2600ci, taxa de dose 0,974 kGy/h), nos níveis de dose de 5, 10, 25 e 50 kGy, em temperatura ambiente. As amostras irradiadas em solução foram armazenadas em $4^\circ C$ e as análises começaram após 15 dias. As condições experimentais para a preparação das diferentes amostras de β -LG e a nomenclatura adotada para as amostras estão nas tabelas 3.1 e 3.2.

Tabela 3.1: Condições experimentais para a preparação das diferentes amostras de β -LG irradiada no estado sólido.

Tratamento Dose (kGy)	Atividade de água A1 / A2 / A3	Nomenclatura das Amostras
0	0,22 / 0,53 / 0,74	C0A1 / C0A2 / C0A3
5	0,22 / 0,53 / 0,74	C5A1 / C5A2 / C5A3
10	0,22 / 0,53 / 0,74	C10A1 / C10A2 / C10A3
25	0,22 / 0,53 / 0,74	C25A1 / C25A2 / C25A3
50	0,22 / 0,53 / 0,74	C50A1 / C50A2 / C50A3

Tabela 3.2: Condições experimentais para a preparação das diferentes amostras de β -LG irradiada em solução.

Tratamento Dose (kGy)	Concentração da proteína (mg/mL)	Nomenclatura das Amostras
0	3/10	C0S3 / C0S10
5	3/10	C5S3 / C5S10
10	3/10	C10S3 / C10S10

3.3.3 SAXS

As medidas de espalhamento a baixo ângulo foram executadas na linha de luz *D11A* – SAXS do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas-SP). As experiências foram realizadas usando um porta amostras com um tubo capilar de 1,5 mm de diâmetro [Cavalcanti *et al.*, 2004] a 20°C, comprimento de onda de raio-X de $\lambda = 1,488 \text{ \AA}$ e uma distância amostra-detetor de 744,9 mm. As amostras de β -LG (3 e 10 mg/mL) foram medidas em solução tampão de fosfato de sódio a 10 mM em pH 7,0. Para cada amostra, quatro coletas de 10 minutos cada foram feitas e uma média foi feita para melhorar a qualidade dos dados. O tratamento dos dados foi feito usando o programa TRAT1D [Oliveira, 2003; Oliveira, 2005]. As correções por absorção da amostra e inhomogeneidade do detector, além do cálculo de erros, estão incluídas na rotina do programa. Ajustes teóricos e o cálculo das funções de distribuição de pares de distância, $p(r)$, foram realizados utilizando o programa GNOM [Semenyuk & Svergun, 1991; Svergun, 1991; Svergun, 1992]. O programa CRY SOL [Svergun *et al.*, 1995] foi usado para realizar o cálculo das curvas teóricas de SAXS a partir das coordenadas cristalográficas da proteína β -LG (entrada 1beb.pdb do Protein Data Bank, <http://www.rcsb.org>), permitindo o ajuste dos dados experimentais de espalhamento. As construções modelo foram feitas usando o fator de forma de um elipsóide elíptico [Pedersen, 2002] e usando os programas MASSHA [Konarev *et al.*, 2001], DIMFOM e GROUPREF [Petoukhov & Svergun, 2005].

3.4 Resultados

3.4.1 Proteína irradiada no estado sólido

As intensidades de espalhamento, os ajustes teóricos e as funções de distribuição de distâncias $p(r)$ são mostrados na figura 3.2. Parâmetros dimensionais foram obtidos da análise dos dados e são mostrados na tabela 3.3. O raio de giro calculado e o peso molecular foram aproximadamente os mesmos em todos os casos, indicando que nenhuma mudança

estrutural relevante ou perda significativa da massa molecular foram detectadas. Isto é confirmado também pelo ajuste teórico usando a estrutura cristalográfica da β -LG. Como mostrado na figura 3.2 (linha pontilhada), uma boa concordância foi obtida em todos os casos, indicando que a forma geral das proteínas estudadas é similar à estrutura nativa da proteína. A mesma conclusão é alcançada da análise das curvas $p(r)$ (figura 3.2 - destaques). Em todos os casos, as funções $p(r)$ calculadas mostram a mesma forma geral. Entretanto, para as amostras com atividade de água elevada (amostras C25A3 e C50A3), foi observada uma tendência das curvas $p(r)$ apresentarem valores mais elevados para a distância máxima ($D_{máx}$) (figura 3.2 - destaques). Isto poderia indicar a formação de uma fração pequena de oligômeros ou de agregados induzidos pela irradiação das amostras.

Tabela 3.3: Resultados de SAXS: Amostras irradiadas no estado sólido.

Amostras	R_g (Å)	MW (kDa)
C0A1	$24,0 \pm 0,3$	36 ± 2
C0A2	$23,5 \pm 0,4$	33 ± 2
C0A3	$25,4 \pm 0,8$	34 ± 2
C5A1	$23,5 \pm 0,4$	36 ± 2
C5A2	$24,0 \pm 0,3$	35 ± 2
C5A3	$23,8 \pm 0,3$	35 ± 2
C10A1	$23,8 \pm 0,5$	36 ± 2
C10A2	$24,2 \pm 0,4$	33 ± 2
C10A3	$23,5 \pm 0,2$	35 ± 2
C25A1	$23,4 \pm 0,2$	33 ± 2
C25A2	$23,7 \pm 0,2$	34 ± 2
C25A3	$23,7 \pm 0,2$	34 ± 2
C50A1	$23,7 \pm 0,2$	34 ± 2
C50A2	$23,9 \pm 0,2$	33 ± 2
C50A3	$24,2 \pm 0,3$	34 ± 2

3.4.2 Proteína irradiada em solução

As intensidades de espalhamento, os ajustes teóricos e as funções de distribuição de pares de distância, $p(r)$, para as amostras irradiadas em solução são mostrados na figura 3.3. Do ajuste teórico usando o programa GNOM nós obtivemos os parâmetros estruturais das amostras (tabela 3.4). Analisando esses resultados, há uma indicação da formação de oligômeros. Dos valores do raio do giro e dos pesos moleculares, está claro que o tamanho dos oligômeros é proporcional às doses de radiação e inversamente proporcional às concentrações da proteína. A forma da função $p(r)$ corresponde às partículas prolatas em todos os casos. A fim de obter mais informação sobre a oligomerização da proteína, os modelos estruturais

de baixa resolução foram construídos.

Tabela 3.4: Resultados de SAXS: Amostras irradiadas solução.

Amostras	R_g (Å)	MW (kDa)	Oligomerização
C0S3	$24,8 \pm 0,7$	33 ± 5	Dímero
C0S10	$24,0 \pm 0,4$	35 ± 5	Dímero
C5S3	50 ± 2	≈ 100	Hexâmero
C5S10	$30,3 \pm 0,4$	≈ 50	Tetrâmero
C10S3	69 ± 5	≈ 350	Decâmero
C10S10	$33,8 \pm 0,6$	≈ 60	Tetrâmero

3.4.3 Modelando os oligômeros através de elipsóides

Como uma primeira tentativa de modelar os oligômeros, o fator de forma de elipsóides elípticos [Pedersen, 2002] foi usado para ajustar os dados experimentais. Embora esta aproximação seja limitada a uma baixa resolução, o ajuste depende de um pequeno número de parâmetros (semi-eixos a , b e c de cada elipsóide), e pode indicar a forma geral dos oligômeros e o número aproximado dos monômeros. Os ajustes experimentais dos dados são mostrados na figura 3.4, e os resultados são sumarizados na tabela 3.5. Uma vista do elipsóide simulado é mostrada como destaque na figura 3.4. Calculando as intensidades teóricas de espalhamento do monômero e do dímero da β -LG a partir de sua estrutura cristalográfica, os melhores elipsóides que ajustam os dados de espalhamento puderam ser gerados. Com estes valores, foi possível estimar o número dos monômeros ou dímeros que compõem o oligômero em cada caso. Interessantemente, esses resultados deram uma forte indicação de que os dímeros deveriam ser arrançados em uma forma linear.

Tabela 3.5: Ajuste dos dados experimentais usando elipsóides elípticos.

Amostras	a (Å)	b (Å)	c (Å)	χ	Volume (Å ³)	V/V_{mono}	V/V_{dim}
Monômero 1beb.pdb	15,86	23,06	23,05		11243	1	0,5
Dímero 1beb.pdb	13,74	26,04	43,30		20665	2	1
C0S3	17,98	28,80	90,82	0,533	62705	6	3
C10S3	12,06	42,59	133,09	0,528	91146	8	4
C5S10	13,58	26,85	58,42	0,614	33274	3	2
C10S10	12,57	31,27	63,49	0,575	28402	3	1

3.4.4 Modelando os oligômeros com as subunidades da estrutura cristalina da β -Lactoglobulina

Na tentativa de modelar os oligômeros, a estrutura cristalográfica do dímero da proteína β -LG (entrada *1beb.pdb* no PDB) foi usada como subunidade de referência. Nós tentamos construir múltiplos do dímero da β -LG que resultou num bom ajuste dos dados experimentais.

Embora a estrutura terciária da β -LG pudesse sofrer mudanças no processo de oligomerização, a utilização da estrutura cristalográfica da β -LG para construir o oligômero pode ser vista como uma primeira aproximação para modelar estes oligômeros. Diversos modelos foram construídos e combinações lineares dos fatores de forma das estruturas calculadas foram testadas para determinar uma possível polidispersidade de tamanhos. Os melhores resultados são mostrados na tabela 3.6, e as curvas calculadas para as estruturas dos modelos oligoméricos são mostradas na figura 3.4. Nestas figuras, os modelos calculados estão incluídos como destaques.

Tabela 3.6: Ajuste dos dados experimentais usando modelagem de corpo rígido.

Amostras	Subunidade	χ	Oligomerização
C0S3	3	0,51	Hexâmero
C10S3	6	0,52	Dodecâmero
C5S10	2	0,72	Tetrâmero
C5S10	1 + 2	0,54	Dímero + Tetrâmero
C10S10	2	0,53	Tetrâmero

A primeira estrutura construída foi um par de dímeros de *1beb*. Para esta construção tetramérica, o programa DIMFOM foi usado. Este programa utiliza duas estruturas de entrada (neste caso, duas estruturas *1beb*) e rola uma partícula sobre a outra procurando pela configuração que dá o melhor ajuste dos dados de espalhamento. Como resultado, o programa gera até 20 configurações possíveis classificando-as pelo valor resultante da discrepância χ . Neste caso a estrutura que dá menor discrepância é escolhida. Para modelar os oligômeros de ordem mais elevada, combinações de estruturas da β -LG foram usadas. Como nenhuma informação sobre locais de ligação na estrutura da β -LG para a oligomerização induzida pela radiação é disponível, foi necessário propor um ponto inicial para o cálculo do modelo.

Dessa forma, usando os elipsóides calculados como um espaço da busca, diversos pontos de início foram propostos para os dímeros *1beb*. Na otimização, os programas procuraram pelo arranjo das subunidades que dão o melhor ajuste dos dados experimentais. Para esses cálculos, os programas GROUPREF e MASSHA foram usados. Em todos os casos, as

estruturas finais têm a mesma forma geral, com pequenas diferenças no posicionamento dos monômeros. Interessantemente, após a otimização das estruturas, os tamanhos gerais estavam muito perto dos valores obtidos pelos ajustes com os elipsóides.

A proposição de um arranjo linear das subunidades de β -LG na formação dos oligômeros é bem suportada pela alta qualidade dos ajustes experimentais dos dados. Para a amostra *C5S3* a formação de um trímero de dímeros da β -LG (hexâmero) é aparentemente a estrutura mais provável, com um ajuste muito bom dos dados experimentais. Aumentando a dose de radiação, como mostrado para a amostra *C10S3*, a formação de oligômeros grandes foi observada, sendo possível modelar um hexâmero linear de dímeros da β -LG (dodecâmero), com ajuste muito bom.

Para a amostra *C5S10* nós tentamos construir um modelo tetramérico, mas a qualidade do ajuste não foi suficientemente boa (figura 3.4(c)). Entretanto, para a amostra *C10S10*, um tetrâmero ajusta os dados experimentais razoavelmente bem. Neste momento, a hipótese de que a amostra *C5S10* formou uma mistura de dímeros e dos tetrâmeros de β -LG foi testada. Usando o fator de forma do dímero (1beb.pdb) e do tetrâmero (obtido do ajuste dos dados da amostra *C10S10*) foi possível aumentar a qualidade do ajuste dos dados da amostra *C5S10*, obtendo uma proporção de 62% de tetrâmeros e de 38% de dímeros. Esta estratégia foi aplicada em todos os casos (*C5S3*, *C10S3*, e *C10S10*), entretanto, nestes casos, a maioria da população (> 99%) foi composta do oligômero inicial. Isto indica que há monodispersidade no estado oligomérico (somente tetrâmeros, ou hexâmeros, etc., prevalecem).

3.5 Discussões

De acordo com dados da literatura atual, este trabalho é um dos primeiros a descrever as características estruturais da β -LG submetida à radiação gama, caracterizando o processo de agregação induzido por radiação.

O grau de hidratação afeta algumas propriedades das proteínas (alimento ou produtos farmacêuticos) durante o armazenamento ou processamento [Rupley & Carery, 1991; Lai & Topp, 1999]. A radiação gama poderia ser usada para evitar processos de degradação. Entretanto, nenhum estudo sobre o efeito da radiação gama na estrutura da proteína para diferentes níveis de hidratação foi encontrado. Os alimentos em pó (incluindo proteínas isoladas) geralmente possuem uma atividade de água entre 0,2 - 0,4, onde 0,74 é uma condição extrema. Assim, em nosso trabalho, a fim de estudar os efeitos da irradiação sobre a β -LG em três diferentes atividades de água (ou níveis de hidratação) foram escolhidas - 0,22; 0,53 e 0,74 - que estão dentro da escala de interesse científico-tecnológico para os alimentos ou

produtos farmacêuticos. As concentrações de proteína usadas neste trabalho (3 mg/mL e 10 mg/mL) estão dentro da escala usada em outros trabalhos que relataram modificações das propriedades de algumas proteínas devido ao processo de irradiação. Estas concentrações foram também muito convenientes para as experiências de espalhamento de raios-X.

As análises de SAXS indicaram que a radiação gama não afetou significativamente a estrutura da proteína β -LG no estado sólido nos diversos graus de hidratação. Em contraste, a proteína irradiada em solução apresentou mudanças estruturais nas estruturas terciária e quaternária, conduzindo à formação de oligômeros induzidos pela radiação. O efeito da radiação foi mais significativo na proteína em mais baixa concentração que é consistente com a ocorrência do “efeito indireto” quando as proteínas são irradiadas em solução.

É sabido que o “efeito direto” da radiação nas proteínas no estado sólido é menos de um décimo comparado ao “efeito indireto” nas soluções aquosas [Yamamoto, 1992]. Então, é possível que na presente experiência algumas moléculas da β -LG irradiadas no estado sólido foram efetivamente afetadas pela radiação, mas as mudanças não foram detectadas pelos métodos analíticos utilizados. A estrutura compacta estável da β -LG em todos os graus de hidratação estudados impediu que ocorressem mudanças estruturais após o tratamento com a radiação gama.

Das curvas da função $p(r)$ das análises de SAXS é possível concluir que a radiação poderia ter afetado as amostras irradiadas no estado sólido com $a_w = 0,74$, com doses elevadas de radiação (C25A3 e C50A3). Índícios de agregados protéicos foram observados nestas amostras. É possível que, na superfície da proteína mais hidratada (0.18 g H_2O/g proteína), um colapso das moléculas de água em “clusters” maiores poderia ocorrer, fornecendo um meio favorável para a difusão de íons. Ao mesmo tempo, uma espécie mais ativa poderia se formar devido à radiólise da água e reagir com a proteína. Essa sucessão de eventos sugeriria que estas amostras estariam afetadas pelo “efeito indireto” da radiação.

A radiólise das proteínas em solução ocorre pelo “efeito indireto” [Yamamoto, 1992]. Os danos nas cadeias polipeptídicas são associados na maior parte com os radicais de $\bullet OH$ que promovem a formação de radicais de tirosil pela abstração do hidrogênio dos resíduos de aminoácidos da tirosina [Yamamoto, 1992]. É bem documentado que os “cross-links” de bitirosil são causados pela radiação gama [Boguta & Dancewicz, 1983; Garrison, 1987; Brault *et al.*, 1997] e esse tipo de “cross-links” foi detectado por sua característica de fluorescência [Boguta & Dancewicz, 1983; Davies *et al.*, 1987; Brault *et al.*, 1997]. Dado que os “cross-links” de bitirosil foram detectados, foi concluído que ele tem um papel na agregação da β -LG. De acordo com Davies *et al.*, [1987], a formação de bitirosina é um “marcador” útil para a modificação da proteína pelo radical de $\bullet OH$. A detecção desses “cross-links” de

bitirosil sugere que as reações similares de “*cross-links*” em outros locais também estão envolvidas, mas são menos prontamente identificáveis [Shinar *et al.*, 1983].

Um aspecto interessante da oligomerização observado é o fato que ela é dependente das doses de radiação e das concentrações das amostras. O aumento das doses de radiação e a diminuição das concentrações induziram a formação de oligômeros maiores. Foi relatado que a proteína em solução em baixa concentração é mais sensível a radiação [Krumhar & Berry, 1990; Brault *et al.*, 1997; Cho *et al.*, 1999; Kempner, 2001]. De acordo com Cho *et al.*, [1999], isto é devido à maior acessibilidade dos radicais em uma solução diluída.

De acordo com os modelos dos oligômeros descritos neste trabalho obtidos pela análise de SAXS, os dímeros são arranjados em uma forma linear. Um arranjo similar foi proposto para os oligômeros formados no estágio inicial do tratamento térmico da β -LG [Elofsson *et al.*, 1996; Hoffmann *et al.*, 1996; Carrota *et al.*, 2003] onde os monômeros da β -LG, ao invés dos dímeros de β -LG, estão linearmente ligados através de ligações dissulfeto. Diferentemente do mecanismo no processo de agregação induzida por calor, a radiação resultou em moléculas de β -LG covalentemente ligadas, pelo menos em parte, por *cross-linking* intermolecular de bitirosil das subunidades de dímeros, evidenciados por medidas de fluorescência nas amostras de β -LG irradiadas em solução (10, 25 e 50 kGy) [Oliveira *et al.*, 2007].

As películas e os revestimentos biodegradáveis comestíveis têm sido desenvolvidos nos últimos anos. As películas comestíveis baseadas na proteína do soro de leite foram desenvolvidas com sucesso para aplicações em sistemas alimentícios [Chen, 1995, Sabato *et al.*, 2001]. De acordo com Le Tien *et al.*, [2000], as películas da proteína do soro de leite, obtidas após irradiação gama das mesmas, exibem melhores propriedades do que aquelas obtidas pelo tratamento de calor. Dado que o “*cross-linking*” das proteínas é necessário para obter uma película flexível, fácil de manusear [Le Tien *et al.*, 2000], é razoável supor que o “*cross-linking*” formado devido à irradiação da β -LG em solução, como foi demonstrado em nossas experiências, é, pelo menos em parte, uma explicação para as diferentes propriedades dos biofilmes irradiados relatados por Le Tien *et al.*, [2000].

Lee *et al.*, [2001] relataram que a β -LG irradiada em solução mostrou uma alergenicidade reduzida. Uma possível explicação para este resultado está relacionada às modificações estruturais da proteína. Como foram relatados no trabalho atual, os oligômeros de β -LG foram formados devido à irradiação gama. Mudanças no perfil dos epítomos (partes da proteína que são reconhecidas pelo sistema imune, principalmente, anticorpos) da proteína irradiada poderiam ser resultados de um efeito de blindagem de alguns locais na superfície da proteína, quando as moléculas β -LG são arranjadas na forma oligomérica, assim reduzindo a alergenicidade.

3.6 Conclusões

Os resultados do presente trabalho confirmaram que o efeito da radiação na proteína depende das circunstâncias em que ela é irradiada. A β -LG no estado sólido, estudadas em diferentes atividades de água, a_w , não foi significativamente afetada pela radiação gama. Por outro lado, a proteína irradiada em solução agregou-se formando oligômeros ou multímeros. Os arranjos lineares compostos de múltiplos dímeros das moléculas de β -LG são propostos para a estrutura dos oligômeros.

O mecanismo de agregação através dos *cross-links* de bitirosil foi avaliado por medidas de fluorescência, mas a ocorrência de tipos diferentes de *cross-links* intermoleculares não investigados neste estudo não foi negligenciado. Como mencionado acima, este mecanismo é diferente do mecanismo da agregação induzido pelo tratamento com calor relatado na literatura e, então, é possível que os agregados apresentem características especiais e diferentes.

Considerando que nenhuma degradação da β -LG irradiada no estado sólido nos diferentes valores de a_w foi detectada, o tratamento com irradiação gama poderia ser considerado o mais adequado se usado dentro da escala de doses de radiação geralmente usada em processos de fabricação de alimentos ($< 10kGy$). Como foi mostrado, a β -LG irradiada no estado sólido conserva sua estrutura e, conseqüentemente, deve manter as propriedades científico-tecnológicas requeridas para diversas formulações dos produtos alimentícios.

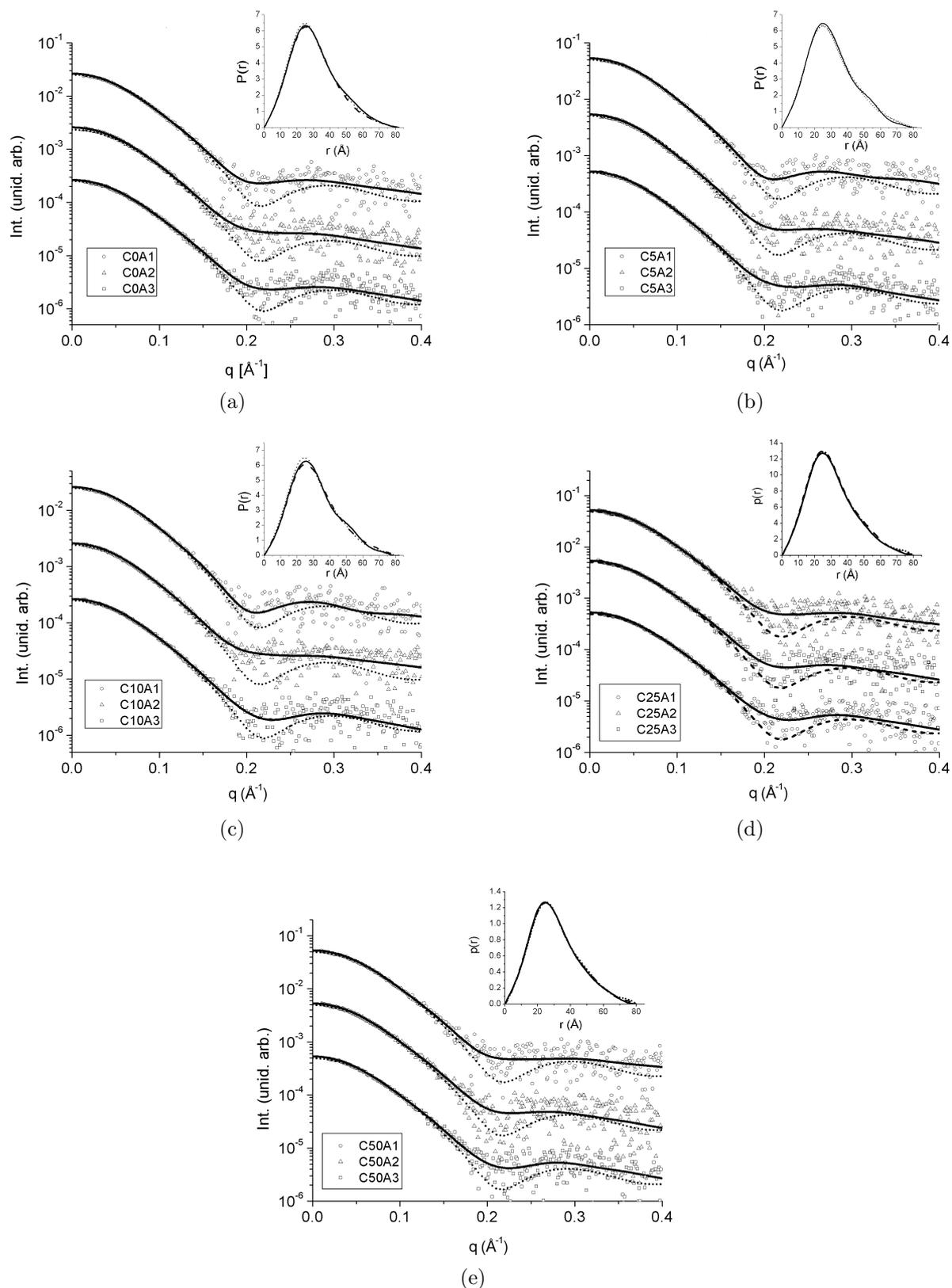


Figura 3.2: Intensidades de SAXS, ajustes teóricos (linha sólida) e funções de distribuição de pares de distância (destaque) para as amostras irradiadas no estado sólido. (a) Amostras de controle; (b) Amostras irradiadas com 5 kGy; (c) Amostras irradiadas com 10 kGy; (d) Amostras irradiadas com 25 kGy; (e) Amostras irradiadas com 50 kGy. A linha pontilhada é um cálculo teórico da intensidade espalhada usando os dados da estrutura cristalina.

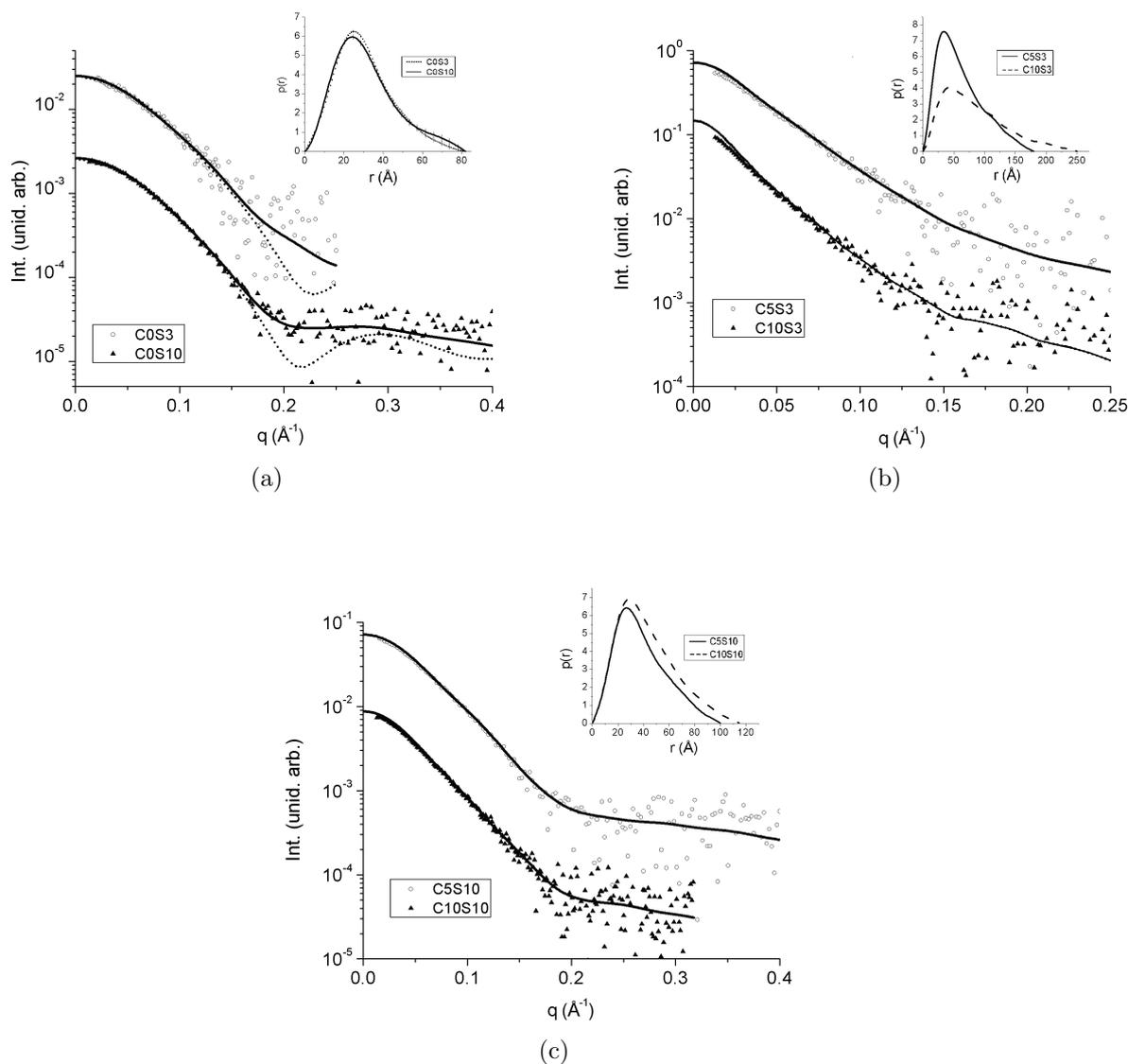


Figura 3.3: Intensidades de SAXS, ajustes teóricos (linha sólida) e funções de distribuição de pares de distância (destaque) para as amostras irradiadas em solução. (a) Amostras de controle (0 kGy), onde a linha pontilhada é um cálculo teórico da intensidade espalhada usando os dados da estrutura cristalina; (b) Amostras irradiadas com 5 kGy (linha sólida no destaque) e 10 kGy (linha tracejada no destaque) em 3mg/mL; (c) Amostras irradiadas com 5 kGy (linha sólida no destaque) e 10 kGy (linha tracejada no destaque) em 10 mg/mL.

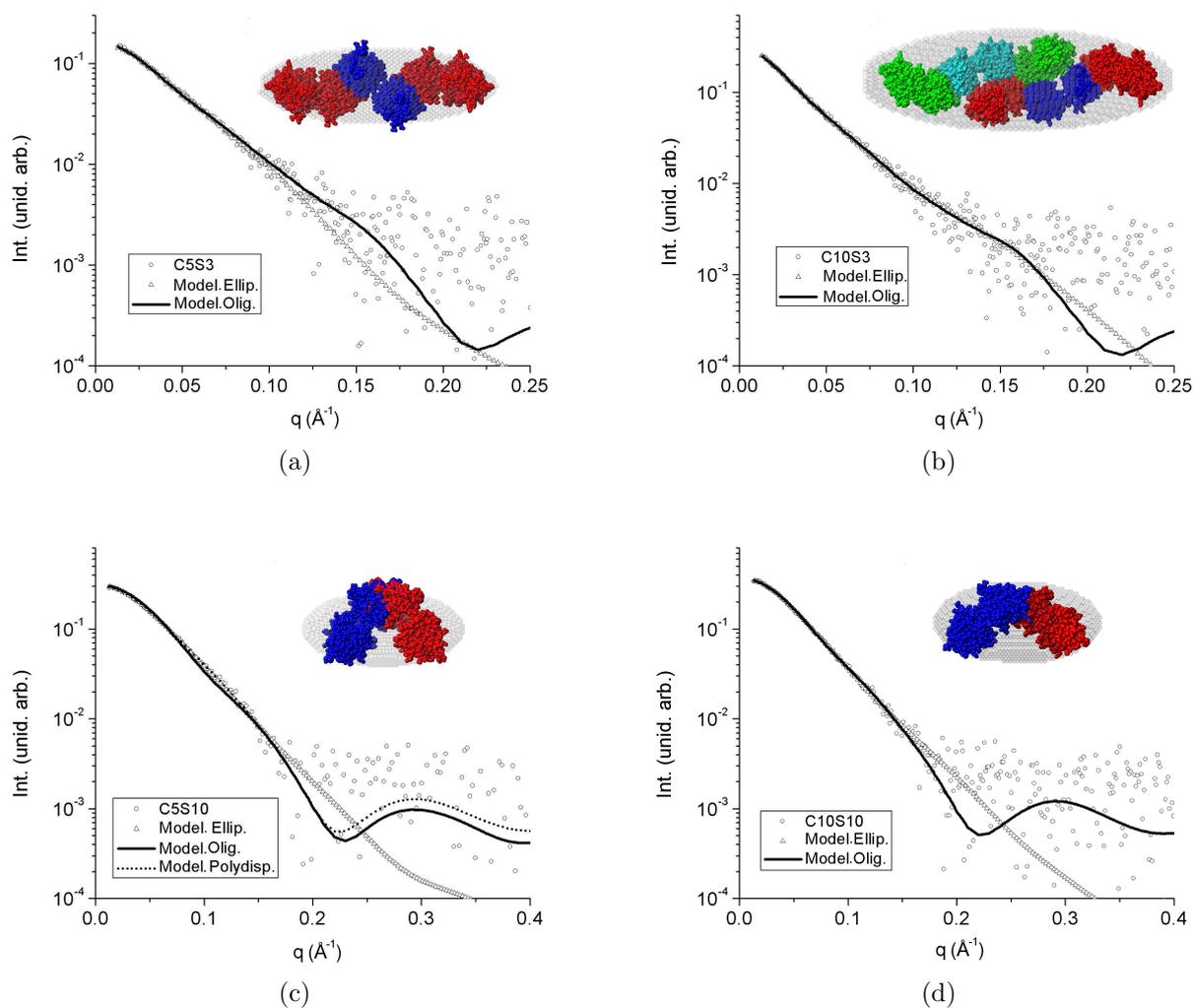


Figura 3.4: Curvas de espalhamento calculadas para os modelos oligoméricos das amostras irradiadas em solução (os ajustes dos modelos com elipsóides e os ajustes dos modelos oligoméricos são mostrados). (a) Amostra irradiada com 5 kGy em 3 mg/mL; (b) Amostra irradiada com 10 kGy em 3 mg/mL; (c) Amostra irradiada com 5 kGy em 10mg/mL (ajuste com modelo polidisperso também é mostrado); (d) Amostra irradiada com 10 kGy em 10 mg/mL.

4

Considerações Finais e Sugestão para Futuros Trabalhos

Este trabalho mostrou a potencialidade da técnica de SAXS para o estudo de mudanças conformacionais de moléculas biológicas em solução. Como foi possível notar, a técnica de SAXS é uma técnica dinâmica que permite estudar as proteínas em condições bastante próximas às fisiológicas, além de permitir estudos em tempo real através de alterações nas condições da solução da proteína. O processo de desnaturação da lisozima por ação de um agente químico desnaturante ou de altas temperaturas em condições de equilíbrio pôde ser estudado correlacionando os parâmetros dimensionais e de forma da proteína obtida por SAXS com a termodinâmica do processo de desnaturação. Isso mostrou a alta cooperatividade dessa proteína durante seu desenovelamento e sua resistência em perder totalmente sua forma compacta no estado mais desnaturado. Além disso, no estudo da oligomerização da proteína β -Lactoglobulina irradiada por radiação gama, a técnica de SAXS mostrou sua potencialidade para modelar estruturas de proteínas em diferentes estados de agregação a partir dos dados experimentais de espalhamento. Por fim, a técnica de SAXS se mostrou uma das mais adequadas para esses estudos de mudanças conformacionais de proteínas em solução, dentre o amplo leque de outras importantes técnicas, dentro do qual podemos destacar as técnicas de dicroísmo circular (CD), viscosidade, fluorescência e ressonância magnética nuclear (RMN).

Para trabalhos futuros, uma sugestão é a aplicação do método de Decomposição de valor único singular (*SVD: Singular Value Decomposition*) [Golub & Reinsh, 1970; Press *et al.*, 1992] aos dados experimentais do processo de enovelamento ou desenovelamento, cinético ou em condições de equilíbrio. Esse método permite determinar quantos estados independentes

estáveis existe entre o estado nativo e o desenovelado, o que é uma poderosa arma para desvendar estados intermediários no processo de enovelamento ou de desenovelamento. Esse método fornece parâmetros estruturais desses estados intermediários, além de uma curva de espalhamento para cada intermediário que possa haver. Outra sugestão é a aplicação de um sistema de *Stopped-Flow* para esse estudo de mudanças conformacionais, pois permite uma análise cinética em curtos intervalos de tempo da ordem de milissegundos das alterações estruturais da molécula em solução. Obviamente, isso implicaria também em um estudo para diminuir o tempo necessário para que os detectores existentes forneçam uma curva de espalhamento em um espaço de tempo muito curto. Isso é sem dúvida um campo promissor onde ainda há muito trabalho a ser feito.

Referências

- Abkevich, V. I., Gutin, A. M., & Shakhnovich, E. I., (1994), Specific nucleus as the transition state for protein folding: evidence from the lattice model, *Biochemistry* 33, 10026-10036.
- Akiyama, S., Takahashi, S., Kimura, T., Ishimori, K., Morishima, I, Nishikawa, Y., & Fujisawa, T., (2002), Conformational landscape of cytochrome c folding studied by microsecond-resolved small-angle x-ray scattering, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 1329-34.
- Amemiya, Y., Ito, K., Yagi, N., Asano, Y., Wakabayashi, K., Ueki, T., & Endo, T., (1995), Large-Aperture TV Detector with a Beryllium-Windowed Image Intensifier for X-ray Diffraction, *Rev. Sci. Instrum.* 66, 2290-4.
- Aparicio, R., Fischer, H., Scott, D. J., Verschueren, K. H., Kulminskaya, A. A, Eneiskaya, E. V., Neustroev, K. N., Craievich, A. F., Golubev, A. M, & Polikarpov, I., (2002), Structural insights into the beta-mannosidase from *T. reesei* obtained by synchrotron small-angle X-ray solution scattering enhanced by X-ray crystallography, *Biochemistry* 41, 9370-9375.
- Arai, M., Ito, K., Inobe, T., Nakao, M., Maki, K., Kamagata, K., Kihara, H., Amemiya, Y., & Kunihiro, K., (2002), Fast Compaction of α -Lactalbumin During Folding Studied by Stopped-flow X-ray Scattering, *J. Mol. Biol.* 321, 121-132.
- Aune, K. C., & Tanford, C., (1969), Thermodynamics of the Denaturation of Lysozyme by Guanidine Hydrochloride. II. Dependence on Denaturant Concentration at 25°C, *Biochemistry* 8(11), 4586-4590.
- Baldini, G., Beretta, S., Chirico, G., Franz, H., Maccioni, E., Mariani, P., & Spinozzi, F., (1999), Salt induced association of beta-lactoglobulin studied by salt light and X-ray scattering, *Macromolecules* 32, 6128-6138.
- Baum, J., Dobson, C. M., Evans, P. A., & Hanley, C., (1989), Characterization of a Partly Folded Protein by NMR Methods: Studies on the Molten Globule State of Guinea Pig α -Lactalbumin, *Biochemistry* 28, 7-13.

- Boguta, G., & Dancewicz, A., (1983), Radiolytic and Enzymatic Dimerization of Tyrosyl Residues in Insulin, Ribonuclease, Papain and Collagen, *Int. J. Radiat. Biol.* 43, 249-265.
- Borges, J. C., Fischer, H., Craievich, A. F., & Ramos, C. H. I., (2005), Low-resolution structural study of two human Hsp40 chaperones in solution: DjA1 from subfamily A and DjB4 from subfamily B have different quaternary structures, *J. Biol. Chem.* 280, 13671-13681.
- Bosio, L., Teixeira, J., & Bellissent-Funel, M.-C., (1989), Enhanced density fluctuations in water analyzed by neutron scattering, *Phys. Rev. A* 39, 6612-6613.
- Bradbury, J. H., & King, N. L. R., (1969), Denaturation of Proteins: Single or Multiple Step Process?, *Nature* 223, 1154-1156.
- Brault, D., D'Aprano, G., & Lacroix, M., (1997), Formation of free standing sterilized edible films from irradiated caseinates, *J. Agric. Food Chem.* 45, 2964-2969.
- Brownlow, S., Cabral, J.H., Cooper, R., Flower, D., Yewdall, S., Polikarpov, I., North, A., & Sawyer, L., (1997), Bovine-lactoglobulin at 1.8 Å resolution, *Structure* 5, 481-495.
- Bryngelson, J. D., Onuchic, J. N., Socci, N. D., & Wolynes, P. G., (1995), Funnels, pathways, and the energy landscape of protein folding: A synthesis, *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 21, 3, 167-195.
- Buck, M., Radford, S. E., & Dobson, C. M., (1993), A partially folded state of hen egg white lysozyme in trifluoroethanol: structural characterization and implications for protein folding, *Biochemistry* 32, 669-678.
- Bychkova, V. E., & Ptitsyn, O. B., (1993), The molten globule state of protein molecule is becoming the rule rather than the exception, *Biophysics* 38, 1, 58-66.
- Byun, M. W., Lee, J. W., Yook, H. S., Lee, K. H., & Kim, K. P., (2000), Effects of Gamma Radiation on Sensory Qualities, Microbiological and Chemical Properties of Salted and Fermented Squid, *J. Food Prot.* 62, 1162-1166.
- Calmettes, P., Durand, D., Desmadril, M., Minard, P., Receveur, V., & Smith, J. C., (1994), How random is a highly denatured protein?, *Biophys. Chem.* 53, 105-114.
- Carrigan, P. E., Sikkink, L. A., Smith, D. F., & Ramirez-Alvarado, M., (2006), Domain: domain interactions within Hop, the HSP70 / HSP90 organizing protein, are required for protein stability and structure, *Protein Sci.* 15, 522-532.
- Carrota, R., Arleth, L., Pedersen, J., & Bauer, R., (2003), Small-angle X-ray scattering studies of metastable intermediates of β -lactoglobulin isolated after heat-induced aggregation, *Biopolymers* 70, 377-390.

- Cavalcanti, L. P., Torriani, I. L., Plivelic, T. S., Oliveira, C. L. P., Kellermann, G., & Neuenschwander, R., (2004), Two new sealed samples cells for small angle X-ray scattering from macromolecules in solution and complex fluids using synchrotron radiation, *Rev. Sci. Inst.* 75, 4541-4546.
- Chan, H. S., Bromberg, S., & Dill, K. A., (1995), Models of Cooperativity in Protein Folding, *Philos. T. Roy. Soc. B* 348, 1323, 61-70.
- Chen, H., (1995), Functional Properties and Applications of Edible Films Made of Milk Proteins, *J. Dairy Sci.* 78, 2563-2583.
- Chen, L., Hodgson, K. O., & Doniach, S., (1996), A lysozyme folding intermediate revealed by solution X-ray scattering, *J. Mol. Biol.* 261,658-671.
- Cho, Y., Yang, J.S., & Song, K.B., (1999), Effect of ascorbic acid and protein concentration on the molecular weight profile of bovine serum albumin and beta-lactoglobulin by γ -irradiation, *Food Res. Intern.* 32, 515-519.
- Dael, H. V., Haezebrouck, P., Morozova, L., Arico-Muendel, C., & Dobson, C. M., (1993), Partially folded states of equine lysozyme. Structural characterization and significance for protein folding, *Biochemistry* 32, 11886-11894.
- Davies, K., Delsignore, M., & Lin, S., (1987), Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids, *J. Biol. Chem.* 262, 9902-9907.
- De Bruyn, I. N., (2000), IN 2000: The application of high dose food irradiation in South Africa, *Radiat. Phys. Chem.* 57, 223-225.
- Debye, P., (1947), Molecular-weight determination by light scattering, *J. Phys. Colloid. Chem.* 51, 18-32.
- Debye, P., & Bueche, A. M., (1949), Scattering by an Inhomogeneous Solid., *Appl. Phys. Lett.* 20, 518-525.
- Dill, K. A., Bromberg, S., Yue, K. Z., Fiebig, K. M., Yee, D. P., Thomas, P. D., & Chan, H. S., (1995), Principles of protein folding – A perspective from simple exact models, *Protein Sci.*, 4, 561-602.
- Dill, K. A., & Chan, H. S., (1997), From Levinthal to pathways to funnels, *Nat. Struct. Biol.* 4, 10-19.
- Dinner, A. R., Sali, A., Smith, L. J., Dobson, C. M., & Karplus, M., (2000), Understanding protein folding via free-energy surfaces from theory and experiment, *Trends Biochem. Sci.* 25, 331-339.
- Dobson, C. M., (1994), Solid evidence for molten globule, *Curr. Biol.* 4(7), 636-640.

- Dobson, C. M., Evans, P. A., & Radford, S. E., (1994), Understanding how proteins fold: the lysozyme story so far, *Trends Biochem. Sci.* 19, 31-37.
- Dobson, C., Sali, A., & Karplus, M., (1998), Protein Folding : A Perspective from Theory and Experiment, *Angew. Chem. Int. Ed.* 37(7), 868-893.
- Doniach, S., (2001), Changes in biomolecular conformation seen by small angle X-ray scattering, *Chem. Rev.* 101, 1763-78.
- Dyson, H. J., & Wright, P. E., (1993), Peptide conformation and protein folding, *Curr. Opin. Struc. Biol.* 3, 1, 60-65.
- Eliezer, D., Chiba, K., Tsuruta, H., Doniach, S., Hodgson, K. O., & Kihara, H., (1993), Evidence of an associative intermediate on the myoglobin refolding pathway, *Biophys. J.* 65, 912-917.
- Elofsson, U., Dejmek, P., & Paulsson, M., (1996), Heat-Induced Aggregation of β -Lactoglobulin Studied by Dynamic Light Scattering., *Int. Dairy J.* 6, 343-357.
- Fan, C-Y, Lee, S., & Cyr, D., (2003), Mechanisms for regulation of Hsp70 function by Hsp40, *Cell Stress & Chaperones* 8(4), 309-316.
- Farkas, J., (1998), Irradiation as a method for decontaminating food. A review., *Int. J. Food Microbiol.* 44, 189-204.
- Feigin, L. A., & Svergun, D. I., (1987), Structure analysis by small-angle X-ray and neutron scattering, Plenum Press, New York.
- Fenton, W. A. & Horwich, A. L., (2003), Chaperonin-mediated protein folding: fate of substrate polypeptide, *Q. Rev. Biophys.* 36(2), 229-56.
- Fersht, A. R., (1995), Optimization of Rates of Protein Folding: The Nucleation-Condensation Mechanism and Its Implications, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92(24), 10869-10873.
- Fersht, A. R., (1997), Nucleation mechanisms in protein folding, *Curr. Opin. Struc. Biol.* 7(1), 3-9.
- Fritz, G., Scherf, G., & Glatter, O., (2000), Applications of Densimetry, Ultrasonic Speed Measurements, and Ultralow Shear Viscosimetry to Aqueous Fluids, *J. Phys. Chem. B* 104(15), 3463-3470.
- Fujisawa, T., Inoko, Y. & Yagi, N.,(1999), The use of a Hamamatsu X-ray image intensifier with a cooled CCD as a solution X-ray scattering detector, *J. Synchrotron Rad.* 6, 1106-1114.

- Gabashvili, I. S., Agrawal, R. K., Spahn, C. M. T., Grassucci, R. A., Svergun, D. I., Frank, J., & Penczek, P., (2000), Solution Structure of the *E. coli* 70S Ribosome at 11.5 Å Resolution, *Cell*, 100, 537-549.
- Garrison, W. M., (1987), Reaction Mechanisms in the Radiolysis of Peptides, Polypeptides, and Proteins, *Chem. Rev.* 87, 381-398.
- Glatter, O., & Kratky, O., (1982), Small Angle X-Ray Scattering, Academic Press Inc. Ltd., New York.
- Glatter, O., (1990), Neutron, X-ray and Light Scattering, edited by P. Lindner & Th. Zemb, pp. 33-82. Amsterdam: North Holland.
- Golub, G. H., & Reinsh, C., (1970), Singular value decomposition and least squares solutions, *Numer. Math.* 14, 403-420.
- Guinier, A., & Fournet, G., (1955), Small angle scattering of X-rays. Translated by Walker, C.B. & Yudowitch, K.L., New York: John Wiley & Sons.
- Haezebrouck, P., Joniau, M., Dael, H. V., Hooke, S. D., Woodruff, N. D., & Dobson, C. M., (1995), An equilibrium partially folded state of human lysozyme at low pH, *J. Mol. Biol.* 246(3), 382-387.
- Hambling, S. G., McAlpine, A. S., & Sawyer, L., (1992), In *Advanced Dairy Chemistry*; Fox, P. F., Ed.; Elsevier: London; pp.141-190.
- Hammersley, A., (Copyright 1987-2005), Program FIT2D v.12.077, ESRF, Grenoble, France, <http://www.esrf.eu/computing/scientific/FIT2D/>.
- Hao, Q., Dodd, F. E., Grossman, J. G., & Hasnain, S. S., (1999), Ab initio phasing using molecular envelope from solution X-ray scattering, *Acta Crystallogr. D: Biol. Crystallogr.* 55, 243-246.
- Hao, Q., (2001), Phasing from an envelope, *Acta Crystallogr. D: Biol. Crystallogr.* 57, 1410-4.
- Hirai, M., Arai, S., & Iwase, H., (1999), Complementary Analysis of Thermal Transition Multiplicity of Hen Egg-White Lysozyme at Low pH Using X-ray Scattering and Scanning Calorimetry, *J. Phys. Chem. B* 103, 549-556.
- Hirai, M., Arai, S., & Iwase, H., (2004), Hierarchical map of protein unfolding and refolding at thermal equilibrium revealed by wide-angle X-ray scattering, *Biochemistry* 43, 9036-9049.
- Hoffmann, M. A., Roefs, S. P., Verheul, M., Van Mil, P. J., & de Kruif, K. G., (1996), Aggregation of beta-lactoglobulin studied by in situ light scattering, *J. Dairy Res.* 63, 423-440.

- Jackson, M. B., (2006), *Molecular and Cellular Biophysics*, Cambridge University Press, New York.
- Jackson, S. E., & Fersht, A. R., (1991a), Folding of Chymotrypsin Inhibitor 2. 2. Influence of Proline Isomerization on the Folding Kinetics and Thermodynamic Characterization of the Transition State of Folding, *Biochemistry* 30(43), 10436-10443.
- Jackson, S. E., & Fersht, A. R., (1991b), Folding of Chymotrypsin Inhibitor 2. 1. Evidence for a Two-State Transition, *Biochemistry* 30(43), 10428-10435.
- Karlsen, S., Rao, Z.H., Hough, E., & Isaacs, N.W., (1996), The Crystal Structure of a Bulgecin-inhibited G-type Lysozyme from the Australian Black Swan, *Acta Crystallogr. D: Biol. Crystallogr.* 52, 105-114.
- Kataoka, M., Nishii, I., Fujisawa, T., Ueki, T., Tokunaga, F., & Goto, Y., (1995), Structural characterization of the molten globule and native states of apomyoglobin by solution X-ray scattering, *J. Mol. Biol.* 249(1), 215-228.
- Kato, S., Okamura, M., Shimamoto, N., & Utiyama, H., (1981), Spectral Evidence for a Rapidly Formed Structural Intermediate in the Refolding Kinetics of Hen Egg-White Lysozyme, *Biochemistry* 20, 1080-1085.
- Kella, N., & Kinsella, J., (1988), Structural stability of beta-lactoglobulin in the presence of kosmotropic salts. A kinetic and thermodynamic study, *Int. J. Pept. Protein Res.* 32, 396-405.
- Kempner, E. S., (2001), Effects of high-energy electrons and gamma rays directly on protein molecules, *J. Pharm. Sci.* 90, 1637-1646.
- Kim, P. S., & Baldwin, R. L., (1990), Intermediates in the Folding Reactions of Small Proteins, *Annu. Rev. Biochem.* 59, 631-660.
- Konarev, P.V., Petoukhov, M.V., & Svergun, D.I., (2001), MASSHA - a graphics system for rigid-body modelling of macromolecular complexes against solution scattering data, *J. Appl. Cryst.* 34, 527-532.
- Konarev, P. V., Volkov, V. V., Sokolova, A. V., Koch, M. H. J., & Svergun, D. I., (2003), PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis, *J. Appl. Cryst.* 36, 1277-1282.
- Konarev, P. V., Petoukhov, M. V., Volkov, V. V., & Svergun, D. I., (2006), ATSAS 2.1, a program package for small-angle scattering data analysis, *J. Appl. Cryst.* 39, 277-286.
- Karplus, M., & Weaver, D. L., (1976), Protein-folding dynamics, *Nature (London)*, 260, 404-406.

- Kratky, O., & Wawra, H., (1963), Measurements of the absolute intensity of diffuse Roentgen Small-Angle Scattering by mechanical weakening of the primary beam through adaptation of the impulse - counting technique, *Monatsh. Chem.* 94, 981-987.
- Krumhar, K.C., & Berry, J.W., (1990), Effect of Antioxidant and Conditions on Solubility of Irradiated Food Proteins in Aqueous Solutions, *J. Food Sci.* 55, 1127-1132.
- Lai, M.C., & Topp, E.M., (1999), Solid-state chemical stability of proteins and peptides, *J. Pharm. Sci.* 88, 488-500.
- Laidler, K. J., (1996), *Pure & Appl. Chem.*, 68, n°1, 149-192, Glossary of terms used in Chemical Kinetics, including Reaction Dynamics, IUPAC.
- Lattman, E. E., (1994), Small angle scattering studies of protein folding, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 4, 87-92.
- Laughlin, R. B., Pines, D., Schmalian, J., Stojkovic, B., & Wolynes, P., (2000), The Middle Way, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 32-37.
- Le Tien, C., Letendre, M., Ispas-Szabo, P., Mateescu, M. A., Delmas-Patterson, G., Yu, H. L., & Lacroix, M., (2000), Development of Biodegradable Films from Whey Proteins by Cross-Linking and Entrapment in Cellulose, *J. Agric. Food Chem.* 48, 5566-5575.
- Lee, J-W., Kim, J-H., Yook, H-S., Byun, M-W, Kang, K-O., Lee, S-Y., & Hwang, H-J., (2001), Effects of Gamma Radiation on the Allergenic and Antigenic Properties of Milk Proteins, *J. Food Prot.*, 64, 272-276.
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L., & Cox, M. M., (1995), *Princípios de Bioquímica*, 4ª. Ed., Sarvier, São Paulo.
- Leopold, P. E., & Onuchic, J. N., (1992), Protein folding funnels: a kinetic approach to the sequence-structure relationship, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 18, 8721-8725.
- Letendre, M., D'Aprano, G., Delmas-Patterson, G., & Lacroix, M., (2002), Isothermal Calorimetry Study of Calcium Caseinate and Whey Protein Isolate Edible Films Cross-Linked by Heating and γ -Irradiation, *J. Agric. Food Chem.* 50, 6053-6057.
- Levinthal, C., (1969), *Mossbauer Spectroscopy in Biological System*, ed. P DeBrunner et al (Urbana, IL:University of Illinois Press) pp 22-4.
- Lifson, S., & Roig., A., (1961), On the theory of helix-coil transitions in biopolymers, *J. Chem. Phys.* 34, 1963-1974.
- Liu, Q., Weaver, A. J., Xiang, T., Thiel, D. J., & Hao, Q., (2003), Low-resolution molecular replacement using a six-dimensional search, *Acta Crystallogr. D: Biol. Crystallogr.* 59, 1016-9.

- Maubois, J. L., Pierre, A., Fauquant, J., & Piot, M., (1987), Industrial fractionation of main whey proteins, Bull IDF 212, 154-159.
- Mayer, M. P., & Bukau, B., (2005), HSP70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism, CMLS, Cell. Mol. Life Sci. 62, 670-684.
- Morr, C. V., & Foegeding, E. A., (1990), Composition and functionality of commercial whey and milk protein concentrates and isolates: a status report, Food Technology, 44, 100-112.
- Muller, P., (1994), Pure & Appl. Chem., 66, n°5, 1077-1184, Glossary of terms used in Physical Organic Chemistry, IUPAC.
- Nölting, B., Golbik, R., Neira, J. L., Soler-Gonzalez, A. S., Schreiber, G., & Fersht, A. R., (1997), The folding pathway of a protein at high resolution from microseconds to seconds, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 3, 826-830.
- Oliveira, C. L. P., (2003), TRAT1D - Computer Program for SAXS Data Treatment. LNLS Technical Manual MT01/2003.
- Oliveira, C. L. P., (2005), Estudos de espalhamento de Raios-X a baixos ângulos por sistemas biológicos: Teoria e Aplicações, Tese de doutorado defendida no Instituto de Física Gleb Wataghin UNICAMP, Brazil.
- Oliveira, C. L. P., de la Hoz, L., Silva, J. C., Torriani, I. L., & Netto, F. M., (2007), Gamma radiation effects on β -Lactoglobulin: oligomerization and aggregation, Biopolymers 85, 284-294.
- Orthaber, D., Bergmann, A., & Glatter, O., (2000), SAXS experiments on absolute scale with Kratky systems using water as a secondary standard, J. Appl. Cryst. 33, 218-255.
- Österberg, R., Sjöberg, B., Rymo, L., & Lagerkvist, U., (1975), Small-angle x-ray scattering study of the interaction between lysine transfer RNA ligase from yeast and transfer RNA, J. Mol. Biol. 99, 383-400.
- Pace, C. N., (1986). Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. In Colowick, S. P. & Kaplan, N. O. (Eds.), Methods in Enzymology (pp. 266-280). Orlando, Florida: Academic Press.
- Pain, R. H., Ed. (2000), Mechanisms of Protein Folding, Oxford University Press, New York.
- Panick, G., Malessa, R., & Winter, R., (1999), Exploring the Temperature-Pressure Phase Diagram of Staphylococcal Nuclease, Biochemistry 38, 6512-6519.
- Papiz, M. Z., Sawyer, L., Eliopoulos, E. E., North A. C. T., Findlay, J. B. C., Sivaprasadarao, R., Jones, T. A., Newcomer, M. E., & Kraulis, P. J., (1986), The structure of bold italic β -lactoglobulin and its similarity to plasma retinol-binding protein, Nature 324, 383-385.

- Pedersen, J. S., (2002), In *Neutrons, X-Rays and Light*, Lindner, P. and Zemb, T., Eds.; Elsevier Science B.V.: Amsterdam; Chapter 16.
- Perez, J., Vachette, P., Russo, D., Desmadril, M., & Durand, D., (2001), Heat-induced unfolding of Neocarzinostatin, a small all- β protein investigated by small-angle X-ray scattering, *J. Mol. Biol.* 308, 721-43.
- Petoukhov, M. V., & Svergun, D. I., (2005), Global Rigid Body Modeling of Macromolecular Complexes against Small-Angle Scattering Data, *Biophys. J.* 89, 1237-1250.
- Plotkin, S. S., & Onuchic, J. N., (2002), Understanding protein folding with energy landscape theory Part I: Basic concepts, *Quart. Rev. Biophys.* 35, 111-67.
- Plotkin, S. S., & Wolynes, P.G., (2003), Buffed energy landscapes: another solution to the kinetic paradoxes of protein folding, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 4417-32.
- Pollack, L., Tate, M. W., Darnton, N. C., Knight, J. B., Gruner, S. M., Eaton, W. A., & Austin, R. H., (1999), Compactness of the denatured state of a fast-folding measured by submillisecond small-angle X-ray scattering, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 10115-7.
- Pollack, L., Tate, M. W., Finnefrock, A. C., Kalidas, C., Trotter, S., Darnton, N. C., Lurio, L., Austin, R. H., Batt, C. A., Gruner, S. M., & Mochrie, S. G. J., (2001), Time resolved collapse of a folding observed with small angle X-ray scattering, *Phys. Rev. Lett.* 86, 4962-5.
- Pontoni, D., Narayanan, T., & Rennie, A. R., (2002), High-dynamic range SAXS data acquisition with an X-ray image intensifier, *J. Appl. Cryst.* 35, 207-211.
- Porod, G., (1951), The Small-angle X-ray scattering from densely packed colloidal systems. Part 1, *Kolloid-Zeitschrift* 124, 83-114.
- Press, W. H., Teukolsky, S. A., Vetterling, W. T., & Flannery, B. P., (1992), *Numerical Recipes in Fortran* (2nd ed.), Cambridge University Press.
- Privalov, G., Kavina, V., Freire, E., & Privalov, P. L., (1995), Precise Scanning Calorimeter for Studying Thermal Properties of Biological Macromolecules in Dilute Solution, *Anal. Biochem.*, 232, 79-85.
- Privalov, P. L., (1979), Stability of protein. Small globular protein, *Adv. Prot. Chem.*, 33, 167-241.
- Ptitsyn, O. B., (1973), The stepwise mechanism of protein molecule self-organization, *Doklady Akademii Nauk SSSR* 210, 1213-1215.
- Ptitsyn, O. B., (1993), The molten globule state. In Creighton, T. E. (Eds.), *Protein folding*, New York: W. H. Freeman and Company, pp. 243-300.

- Ptitsyn, O. B., (1995), Structures of folding intermediates, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5, 74-78.
- Ptitsyn, O. B. (1996), How molten is the molten globule?, *Nat. Struct. Biol.* 3(6), 488-490.
- Puchwein, G., Kratky, O., Gölker, C. F., & Helmreich, E., (1970), Small-angle x-ray scattering measurements on rabbit muscle glycogen phosphorylase dimer b and tetramer b, *Biochemistry* 9, 4691-4698.
- Radford, S. E., Dobson, C. M., & Evans, P. A., (1992), The folding of hen lysozyme involves partially structured intermediates and multiple pathways, *Nature* 358, 302-307.
- Ramos, C. H. I., & Ferreira, S. T., (2005), Protein Folding, Misfolding and Aggregation: Evolving Concepts and Conformational Diseases, *Protein and Peptide Letters*, 12, 213-222.
- Rochet, J-C., & Lansbury, P. T. Jr., (2000), Amyloid fibrillogenesis: themes and variations, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10, 60-68.
- Rupley, J.A., & Careri, G., (1991), Protein hydration and function, *Adv. Protein Chem.* 41, 37-172.
- Russel, T. P., (1983), An absolute intensity standard for small-angle X-ray scattering measured with position-sensitive detectors, *J. Appl. Cryst.* 16, 473-478.
- Saad, A., Ludtke, S. J., Jakana, J., Rixon, F. J., Tsuruta, H., & Chiu, W., (2001), Fourier amplitude decay of electron cryomicroscopic images of single particles and effects on structure determination, *J. Struct. Biol.* 133, 32-42.
- Sabato, S. F., Ouattara, B., Yu, H., Dáprano, G., Le Tien, C., Mateescu, M. A., & Lacroix, M., (2001), Mechanical and Barrier Properties of Cross-Linked Soy and Whey Protein Based Films, *J. Agric. Food Chem.* 49, 1397-1403.
- Sélo, I., Clément, G., Bernard, C., Chatel, J-M., Créminon, C., & Peltre, G., (1999), Allergy to bovine b-lactoglobulin: specificity of human IgE to tryptic peptides, *Clin. Exp. Allergy* 29, 1055-1063.
- Semenyuk, V., & Svergun, D. I., (1991), GNOM - a program package for small-angle scattering data processing, *J. Appl. Cryst.* 24, 537-540.
- Shinar, E., Navok, T., & Chevion, M., (1983), The analogous mechanisms of enzymatic inactivation induced by ascorbate and superoxide in the presence of copper, *J. Biol. Chem.* 258, 14778-14783.
- Song, Y., & Masison, D. C., (2005), Independent regulation of Hsp70 and Hsp90 chaperones by Hsp70/Hsp90-organizing protein Sti1 (Hop1), *J. Biol. Chem.* 280, 34178-34185.
- Spies, J., (1973), Milk allergy, *J. Milk Food Technol.* 36, 225-231.

- Stabinger, H., & Kratky, O., (1978), A new technique for the measurement of the absolute intensity of x-ray small angle scattering. The moving slit method, *Makromol. Chem.* 179, 1655-1659.
- Svergun, D. I., (1991), Mathematical methods in small-angle scattering data analysis, *J. Appl. Cryst.* 24, 485-492.
- Svergun, D. I., (1992), Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria, *J. Appl. Cryst.* 25, 495-503.
- Svergun, D. I., Barberato, C., & Koch, M. H. J., (1995), CRY SOL - a program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates, *J. Appl. Cryst.*, 28, 768-773.
- Svergun, D. I., & Koch, M. H. J., (2003), Small-angle scattering studies of biological macromolecules in solution, *Rep. Prog. Phys.* 66, 1735-1782.
- Taulier, N., & Chalikian, T., (2001), Characterization of pH-induced Transitions of beta-Lactoglobulin: Ultrasonic, Densimetric, and Spectroscopic Studies, *J. Mol. Biol.* 314, 873-889.
- Tanford, C., (1970), Protein denaturation. Part C, *Adv. Protein Chem.*, 24, 1-95.
- Thuman-Commike, P. A., Tsuruta, H., Greene, B., Prevelige, P. E., King, J., & Chiu, W., (1999), Solution X-ray scattering-based estimation of electron cryomicroscopy imaging parameters for reconstruction of virus particles, *Biophys. J.* 76, 2249-61.
- Tsuruta, H., Nagamura, T., Kimura, K., Igarashi, Y., Kajita, A., Wang, Z-X, Wakabayashi, K., Amemiya, Y., & Kihara, H., (1989), Stopped-flow apparatus for X-ray scattering at subzero temperature, *Rev. Sci. Instrum.* 60, 2356-8.
- Voet, D., & Voet, J. G., (1995), *Biochemistry*, 2nd. ed., New york: J. Wiley.
- Wetlaufer, D. B., (1962). Ultraviolet spectra of proteins and amino acids. In *Advances in protein chemistry* (pp. 303-390). New York: Academic Press, Inc.
- Wetlaufer, D. B., (1973), Nucleation, Rapid Folding, and Globular Intrachain Regions in Proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 697-701.
- Witz, J., Timasheff, S. N., & Luzzati, V., (1964), Molecular Interactions in β -Lactoglobulin. VIII. Small-Angle X-Ray Scattering Investigation of the Geometry of β -Lactoglobulin A Tetramerization, *J. Amer. Chem. Soc.* 86, 168-173.
- Wong, D., Camirand, W., & Pavlath, A., (1996), Structures and functionalities of milk proteins, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 36, 807-844.
- Yamamoto, O., (1992), In. *Stability of Protein Pharmaceuticals*; Ahern, T. J. and Manning M. C., Eds.; Plenum Press: New York; Chapter 12.

- Zhen, W., & Doniach, S., (2002), Protein structure prediction constrained by solution X-ray scattering data and structural homology identification, *J. Mol. Biol.* 316, 173-187.
- Zwanzig, R., Szabo, A., & Bagchi, B., (1992), Levinthal's Paradox, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 20-22.