UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS INSTITUTO DE QUÍMICA DEPARTAMENTO DE FÍSICO-QUÍMICA

TESE DE DOUTORADO

CARACTERIZAÇÃO TERMODINÂMICA DE REAÇÕES DE NITROSAÇÃO E INTERAÇÕES PROTÉICAS POR TITULAÇÃO CALORIMÉTRICA ISOTÉRMICA

ALUNO: ROGÉRIO CÔRTE SASSONIA

**ORIENTADOR:** PROF. DR. MARCELO GANZAROLLI DE OLIVEIRA

CAMPINAS

OUTUBRO DE 2009

### FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP

Sa79a	Sassonia, Rogério Côrte. Caracterização termodinâmica de reações de nitrosação e interações protéicas por titulação calorimétrica isotérmica / Rogério Côrte Sassonia Campinas, SP: [s.n], 2009.
	Orientador: Marcelo Ganzarolli de Oliveira.
	Tese - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.
	<ol> <li>Calorimetria. 2. Tióis. 3. EFHC1. 4. Sinalização celular. I. Oliveira, Marcelo Ganzarolli.</li> <li>II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.</li> </ol>

**Título em inglês:** Thermodynamic characterization of the nitrosation reactions and protein interactions by isothermal titration calorimetry

Palavras-chaves em inglês: Calorimetry, Thiols, EFHC1, Cellular signaling

Área de concentração: Físico-Química

Titulação: Doutor em Ciências

**Banca examinadora:** Marcelo Ganzarolli de Oliveira (orientador), Marcelo Matos Santoro (IC-Biológicas-UFMG), Luis Henrique Mendes da Silva (DQ-UFV), Pedro Luiz Onófrio Volpe (IQ-UNICAMP), Ljubica Tasic (IQ-UNICAMP)

Data de defesa: 16/10/2009

# Aos meus pais, Vito Galdino Sassonia e Maria do Carmo Côrte Sassonia.

Com amor e gratidão, dedico este trabalho.

"QUANDO A NOSSA MENTE SE OCUPA DAS COISAS TEMPORAIS BUSCANDO NELAS O SEU FIM, REBAIXA-SE A ELAS; MAS QUANDO SE OCUPA DELAS EM ORDEM À BEM-AVENTURANÇA, LONGE DE REBAIXAR-SE A ELAS, ELEVA-AS A DEUS."

São Tomás de Aquino.

Contra Gentiles, 1, 80, 1258-1264.

#### AGRADECIMENTOS

Ao Deus que alegra minha juventude e a Nossa Senhora Auxiliadora, Intercessora de todas as Graças.

Aos meus pais, Vito Galdino Sassonia e Maria do Carmo Côrte Sassonia pela vida, educação e conselho.

Ao Prof. Dr. Marcelo Ganzarolli de Oliveira pela orientação e ao Prof. Dr. John E. Ladbury pela supervisão do trabalho desenvolvido no Reino Unido.

À Marina Novelli pelo auxílio dedicado no acompanhamento dos experimentos.

Aos colegas do Laboratório B 135 Maíra, Regiane, Gabriela, Bruno, Amedea, Marcela, Jaqueline, Juliana, Lilian, Evandro, Rodrigo Cardoso, Rodrigo Argarten, Vanessa, Roberta, Kelly, Fernanda Egídio, Marcus, Letícia, Larissa, Ana Maria, Maira, Fernanda Alves, Ana Paula, Thiago, César, Márcio e Daniel e ao Kleber do Instituto de Filosofia e Ciências Humanas pelo apoio e companheirismo.

Aos funcionários do Instituto de Química pela excelência dos serviços prestados.

Ao meu cunhado Marciel Vilalta, que ao lado de sua esposa Carina Vilalta, ajudaram-me em tudo que foi preciso e lhes estava ao alcance.

Ao CNPq e à Fapesp pelo financiamento deste projeto.

# *Em especial,* "a todos aqueles que me ajudaram a por debaixo dos pés o erro, e entre os braços a verdade".

Extraído da obra Luz e Calor – I Parte, Doutrina VIII do Pe. Manuel Bernardes.

### **ROGERIO CORTE SASSONIA**

### Curriculum Vitae

Endereço: Departamento de Físico-Química Universidade Estadual de Campinas Lab. B 135 Campinas – SP Brasil

Data de Nascimento: 03/03/75 Nacionalidade: Brasileira Tel: 00 55 19 3521 3154 FAX: 00 55 19 3521 3023 Email: rsassonia@iqm.unicamp.br rsassonia@gmail.com

### FORMAÇÃO ACADÊMICA

#### Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, 2004-2009.

Doutoramento em Química *Título da Tese*: "Caracterização Termodinâmica de Reações de Nitrosação e Interações Protéicas por Titulação Calorimétrica Isotérmica". *Orientador*: Prof. Marcelo Ganzarolli de Oliveira.

#### Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, 2002-04.

Mestrado em Físico-Química. *Título da Dissertação*: "Estudo da termodinâmica de partição de polímeros hidrossolúveis em sistemas líquidos bifásicos aquosos/orgânicos". *Orientador*: Prof. Watson Loh.

#### Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, 1997-2001.

Bacharelado e Licenciatura em Química.

#### EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL

- **2000** Trabalho de graduação com o Prof. Dr. Martin Demuth do Departamento de Química Bioinorgânica, MAX–PLANCK–Institut Fur Strahlenchemie - Mülheim/Ruhr, Alemanha. Área de concentração: fotoquímica.
- **2007** Trabalho de pós-graduação com o Prof. Dr. John E. Ladbury do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, University College London Londres, Reino Unido. Área de concentração: sinalização celular.

#### **DISTINÇÕES E PRÊMIOS**

- 1995 Menção Honrosa no 38º Concurso Cientistas de Amanhã realizado na 47ª Reunião da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência (SBPC) São Luis MA / 1995.
- **1996** Menção Honrosa no 47<sup>th</sup> Intel International Science and Engineering Fair, Tucson-AZ, USA.
- 1998 Menção Honrosa no XXIV Prêmio Mario Covas 1998, São Paulo-SP, Brasil.
- 2009 William F. Giauque Award, 64th Calorimetry Conference, Santa Fe-NM, USA.

#### **PUBLICAÇÕES**

- Murai, M.; SASSONIA, R. C.; Zamboni, A.; Conte, F.; Martins de Souza, D.; Aparicio, R. ; de Oliveira, M. G.; Lopes-Cendes, I.; Characterization of the C-terminal half of human juvenile myoclonic epilepsy protein EFHC1: Dimer formation blocks Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> binding to its functional EF-hand. <u>Archives of</u> Biochemistry and Biophysics 2008, 477, 1, 131-138.
- 2. Anselmo, A. G.; SASSONIA, R. C.; Loh, W.;

Thermodynamics of the Partitioning of Poly(Propylene Oxide) between Aqueous and Chlorinated Organic Phases Compared to Poly(Ethylene Oxide) and Other Hydrophilic Polymers, Journal of Physical Organic Chemistry 2006, 19, 780-785.

#### PATENTE

"PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CORANTES DE BETERRABA", **Rogério Côrte Sassonia** / Eloy Marini Camas / Solano Cledson de Godoy Matos. Número do Processo: PI9802148.

#### CONVITE PARA APRESENTAÇÃO DE CONFERÊNCIAS EM ENCONTROS CIENTÍFICOS

**Use of isothermal titration calorimetry in macromolecular recognition**. Em: The 64th North American Calorimetry Conference, Santa Fe, NM-USA, **2009**.

#### CONVITE PARA APRESENTAÇÃO DE SEMINÁRIOS

O que leva as coisas acontecerem: a contribuição da titulação calorimétrica na elucidação da força motriz de processos físico-químicos e biológicos. Em: Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Porto-Portugal, 2008.

#### **RESUMO**

**Título**: Caracterização Termodinâmica de Reações de Nitrosação e Interações Protéicas por Titulação Calorimétrica Isotérmica.

Autor: Rogério Côrte Sassonia.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Ganzarolli de Oliveira.

**Palavras chave:** titulação calorimétrica isotérmica, caracterização termodinâmica de interações químicas, reação de nitrosação, interações proteína-proteína, domínio EF-hand.

Este trabalho apresenta os resultados da aplicação da titulação calorimétrica isotérmica na caracterização termodinâmica de reações de S-nitrosação de tióis e de interações proteínaproteína e proteína-íon. Foram estudadas as reações de S-nitrosação da N-acetil-L-cisteína (NAC), L-cisteína (CYS), L-glutationa (GLU) e do ácido mercaptosuccínico. Também foram avaliadas as interações entre a proteína sinalizadora Shc (Src homology collagen-like) e as proteínas glutationa S-transferase (GST) e a ciclofilina A (CypA) e a interação entre a região Cterminal da proteína humana EFHC1 (EFHC1-C) com íons Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup>. Os valores da variação de entalpia revelaram que a S-nitrosação é um fenômeno exotérmico e ocorre com diminuição de entropia. Estes dados termodinâmicos revelam que as reações de S-nitrosação investigadas são entalpicamente dirigidas a 25 °C (1 atm) e possuem valores semelhantes de variações de entalpia, entropia e energia livre, apesar das diferenças entre as estruturas químicas dos tióis. Verificou-se que a proteína EFHC1C liga-se tanto a íons Ca<sup>2+</sup> quanto Mg<sup>2+</sup> numa estequiometria de 1:1, com afinidades definidas por diferentes contribuições entálpicas e entrópicas. Este dado confirmou a existência de um suposto domínio EF-hand ligante de Ca<sup>2+</sup> na porção C-terminal previsto pela seqüência primária da EFHC1C. Por outro lado, a EFHC1C perde sua capacidade de interação com íons Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> em solução sem 1,4-ditiotreitol (DTT), provavelmente, devido à formação de dímeros. A ausência de sinais térmicos de ITC mostrou que nem a proteína GST, nem a proteína CypA interagem com a proteína Shc nas condições experimentais usadas.

#### ABSTRACT

**Title**: Thermodynamic Characterization of the Nitrosation Reactions and Protein Interactions by Isothermal Titration Calorimetry.

Author: Rogério Côrte Sassonia.

Adviser: Prof. Dr. Marcelo Ganzarolli de Oliveira.

**Keywords**: isothermal titration calorimetry (ITC), thermodynamic characterization of chemical interactions, nitrosation reaction, protein-protein interactions, EF-hand motif.

This work presents the results of isothermal titration calorimetry application in the thermodynamic characterization of thiol nitrosation reactions, protein-protein and protein-ion interactions. The S-nitrosation reactions of N-acetyl-L-cysteine (NAC), L-cysteine (CYS), Lglutathione (GLU) and acid mercaptosuccinic were studied. The interactions of the signaling protein Shc (Src homology collagen-like) with glutathione S-transferase (GST) and ciclofilina A (CypA) and of the EF-hand motif from human EFHC1C with Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> ions were also evaluated. Enthalpy change values revealed that the S-nitrosation reaction is an exothermic phenomenum associated to a decrease in entropy. These thermodynamic data show that the Snitrosation reactions investigated are enthalpically driven at 25 °C (1 atm) and have similar enthalpic, entropic and free energy change values, despite the differences among the chemical structures of the thiols. It was verified that the EFHC1C protein binds to both  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  ions in a 1:1 stoichiometry with affinities defined by different enthalpic and entropic contributions. These data confirmed the presence of a putative EF-hand Ca<sup>2+</sup>-binding motif at the C-terminal portion as expected by the primary sequence of EFHC1C. On the other hand, EFHC1C losses its ability to interact with Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>ions in solution without 1,4-ditiotreitol (DTT) likely due to protein dimerization. The absence of ITC thermal signals showed that neither GST nor CypA interact with the Shc protein in the experimental conditions used.

# ÍNDICE

### página

# 1 - INTRODUÇÃO

1.1 - O ESTADO DA ARTE E AS EXPECTATIVAS PARA O	
FUTURO DA TITULAÇÃO CALORIMÉTRICA ISOTÉRMICA	
1.1.1 - Titulação Calorimétrica Isotérmica	3
1.1.2 - Método de Detecção do Calor	4
1.1.3 - Relações Termodinâmicas Fundamentais que Descrevem o	6
Fenômeno das Interações Moleculares	0
1.1.4 - Método de van´t Hoff	7
1.1.5 - O Tratamento dos Dados no Experimento de Titulação	7
Calorimétrica	1
1.1.6 - As Informações Contidas nos Resultados Experimentais da	10
Titulação Calorimétrica Isotérmica	10
1.1.6.1 – Constante de Equilíbrio	10
1.1.6.2 - Variação de Entalpia	13
1.1.6.3 - Variações de Entalpia de van't Hoff e Calorimétrica	14
1.1.6.4 - Determinação do Número de Prótons Envolvidos em uma Interação	15
Química	17
1.1.6.5 - Variação da Capacidade Calorífica	17
1.1.6.6 - Variação de Entropia	18
1.2 - APLICAÇÕES DA TITULAÇÃO CALORIMETRICA	
ISOTERMICA NA CARACTERIZAÇÃO DE INTERAÇÕES	
MOLECULARES	
1.2.1 - Exemplos da Aplicação da Titulação Calorimétrica Isotérmica	19
nas Ciências Biológicas	
1.2.1.1 - Caracterização da Desnaturação Reversível de Proteínas	20

1.2.1.2 - Caracterização das Interações Protéicas	21
1.2.1.3 - Caracterização das Interações entre Proteínas e Íons	
1.2.1.4 - Outras Aplicações	
1.2.2 - Exemplos da Aplicação da Titulação Calorimétrica Isotérmica	
nas Ciências dos Materiais	
1.2.2.1 - Caracterização da Formação de Complexos de Ciclodextrina	25
1.2.2.2 - Caracterização da Formação de Complexos Micelares	27
1.2.2.3 - Caracterização das Interações entre Drogas e Surfatantes	29
1.2.2.4 - Caracterização das Interações entre Polímeros e Surfatantes	29
1.2.2.5 - Caracterização das Interações entre Proteínas e Surfatantes	31
1.2.2.6 - Caracterização da Formação de Complexos de Polieletrólitos	32
1.2.2.7 - Outras Aplicações	33
1.3 - AS EXPECTATIVAS PARA O FUTURO DA TITULAÇÃO	2.4
CALORIMÉTRICA ISOTÉRMICA	34
2 - OBJETIVOS	
2.1- OBJETIVO GERAL	37
2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
<b>3 - PARTE EXPERIMENTAL</b>	
3.1 - INSTRUMENTAÇÃO	
3.1.1 - Calorímetro	41
3.1.1.1 - Calibração do Calorímetro de Titulação Isotérmica	
3.2 - METODOLOGIAS	
3.2.1 - Caracterização Termodinâmica da S-Nitrosação da N-Acetil-L-	A A
Cisteína, Cisteína, Glutationa e do Ácido Mercaptosuccínico por	44

Titulação Calorimétrica Isotérmica

3.2.1.1 - Materiais	
3.2.1.2 - Metodologia	44
- Titulação Calorimétrica Isotérmica	
Determinação da Entalpia de Diluição da Solução de Nitrito de Sódio	44
Determinação dos Parâmetros Termodinâmicos das Reações de S-Nitrosação	44
Determinação dos Parâmetros Termodinâmicos da S-nitrosação da N-acetil-L- cisteína pelo Ácido Nitroso	45
- Medidas Espectrofotométricas	46
3.2.2 - Caracterização Termodinâmica da Interação entre as Proteínas	
SHC (SRC Homology Collagen Like) e Glutationa S-transferase por	47
Titulação Calorimétrica Isotérmica	
3.2.2.1 - Materiais e Métodos	47
- Transformação da cepa de Escherichia coli Rosetta 2 com o plasmídio pET28aShc	47
- Expressão e Purificação da Proteína p52Shc	47
- Expressão e Purificação da Proteína GSTT1-1	49
- Determinação da Concentração das Soluções de Proteína	50
- Titulação Calorimétrica Isotérmica	50
3.2.3 - Caracterização Termodinâmica da Interação entre as Proteínas	
SHC (SRC Homology Collagen Like) e Ciclofilina A (CYPA) por	51
Titulação Calorimétrica Isotérmica	
3.2.3.1 - Materiais e Métodos	51
- Expressão e Purificação da Proteína p52Shc	51
- Expressão e Purificação da Proteína CypA	51
- Determinação da Concentração das Soluções de Proteína	52
- Titulação Calorimétrica Isotérmica	52
3.2.4 - Caracterização Termodinâmica da Interação da Proteína EFHC1 com Íons Cálcio e Magnésio usando Titulação Calorimétrica Isotérmica	53

# 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - CARACTERIZAÇÃO TERMODINÂMICA DA S-	
NITROSAÇÃO DA N-ACETIL-L-CISTEÍNA, L-CISTEÍNA, L-	57
GLUTATIONA E ÁCIDO MERCAPTOSUCCÍNICO POR	57
TITULAÇÃO CALORIMÉTRICA ISOTÉRMICA	
4.1.1 - Considerações Iniciais	57
4.1.2 - Resultados e Discussão	
- Titulação Calorimétrica Isotérmica	59
Determinação da Entalpia de Diluição da Solução de Nitrito de Sódio	59
Determinação dos Parâmetros Termodinâmicos das Reações de S-Nitrosação	59
Determinação do $pK_a$ do Ácido Nitroso e dos Parâmetros Termodinâmicos da S-	66
nitrosação da N-acetil-L-cisteína pelo Ácido Nitroso	00
- Medidas Espectrofotométricas	70
4.1.4 - Conclusão	73
4.2 - CARACTERIZAÇÃO TERMODINÂMICA DE INTERAÇÕES	
PROTÉICAS	
4.2.1 - Considerações Iniciais	75
- Sinalização Celular	76
- Receptores de Sinais Celulares	76
- Introdução à Metodologia do DNA Recombinante	
Clonagem Molecular	77
Vetores de Clonagem	77
Transformação Bacteriana	78
Expressão de Proteínas Heterólogas	79

4.2.1 - Caracterização Termodinâmica da Interação entre as ProteínasShc (Src Homology Collagen Like) e Glutationa S-transferase porTitulação Calorimétrica Isotérmica

4.2.1.1 - Introdução	
4.2.1.2 - Resultados e Discussão	
- Expressão e Purificação da Proteína p52Shc	82
- Expressão e Purificação da Proteína GSTT1-1	83
- Titulação Calorimétrica Isotérmica	84
4.2.1.3 - Conclusão	86
4.2.2 - Caracterização Termodinâmica da Interação entre as Proteínas	
SHC (SRC Homology Collagen Like) e Ciclofilina A (CYPA) por	
Titulação Calorimétrica Isotérmica	
4.2.2.1 - Introdução	87
4.2.2.2 - Resultados e Discussão	
- Expressão e Purificação das Proteínas p52Shc e CypA	88
- Titulação Calorimétrica Isotérmica	89
4.2.3 - Conclusão	92
4.3 - CARACTERIZAÇÃO TERMODINÂMICA DA INTERAÇÃO	
DA PROTEÍNA EFHC1 COM ÍONS CÁLCIO E MAGNÉSIO	
USANDO TITULAÇÃO CALORIMÉTRICA ISOTÉRMICA	
4.3.1 - Considerações Iniciais	93
4.3.2 - Introdução	
Proteínas Ligantes de Cálcio	94
Características dos Domínios Protéicos EF-hand	96
O papel das Proteínas Ligantes de Cálcio na Epilepsia	97
4.3.3 – Apresentação do Artigo "Characterization of the C-terminal half of human juvenile myoclonic epilepsy protein EFHC1: Dimer	98

formation blocks  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  binding to its functional EF-hand". <u>Archives of Biochemistry and Biophysics</u>, **2008**, 477, 131-138.

4.3.4 - Conclusão

107

# 5 - CONCLUSÃO FINAL

# 6 - REFERÊNCIAS

115

111



# 1.1 - O ESTADO DA ARTE E AS EXPECTATIVAS PARA O FUTURO DA TITULAÇÃO CALORIMÉTRICA ISOTÉRMICA

The beauty of titration calorimetry is in its simplicity, which allows to obtain the entire set of thermodynamic parameters from performing only a few experiments at a series of different temperatures<sup>1</sup>.

### 1.1.1 - Titulação Calorimétrica Isotérmica

A titulação calorimétrica isotérmica baseia-se na medida do calor envolvido no processo de interação entre duas espécies químicas colocadas em contato de modo gradual e contínuo em uma cela calorimétrica mantida em uma temperatura definida. A adição de uma espécie química contida em uma seringa (titulante) na espécie contida na cela calorimétrica (titulado) possibilita a medida da energia envolvida na interação química entre as mesmas. A energia medida é global, isto é, inclui a energia da interação entre as espécies químicas colocadas em contato como também a energia devido ao fenômeno da solvatação, reorganização molecular e mudanças conformacionais, a energia de diluição das espécies envolvidas no experimento, além da energia devido à agitação mecânica<sup>2, 3</sup>. Por esta razão, a variação da entalpia molar medida (observada) é aparente e designada muitas vezes por  $\Delta H_{obs}$ . A Figura 1.1 mostra o registro gráfico de uma titulação calorimétrica isotérmica onde podem ser identificados os sinais térmicos produzidos no momento da adição do titulante ao titulado em 18 adições sucessivas em intervalos de tempo de 3 minutos.



Figura 1.1: Registro gráfico típico de uma titulação calorimétrica isotérmica.

Cada pulso (sinal térmico) mostrado na Figura 1.1 indica o momento da adição de um volume conhecido do titulante contido em uma seringa no titulado contido na cela calorimétrica.

### 1.1.2 - Método de Detecção do Calor

A maior parte dos calorímetros de titulação isotérmica é baseada na metodologia de compensação de energia, principalmente, aqueles usados no estudo de sistemas biológicos<sup>3</sup>. A Figura 1.2 mostra o diagrama esquemático característico de um calorímetro de compensação de energia. As vantagens deste sistema incluem um tempo de resposta rápido, elevada sensibilidade e a necessidade de relativamente pouca quantidade de amostra. O calorímetro de compensação de energia é composto por duas células equivalentes com o formato de "pirulito" envoltas por uma cobertura adiabática<sup>3</sup>. A temperatura de cada célula é monitorada e mantida constante através de um ciclo eletrônico de retroalimentação que controla

aquecedores adjacentes a cada célula. De modo geral, um sistema de retroalimentação reduz desvios em relação a uma referência.

Durante o experimento, a diferença de temperatura entre a cela que contém o titulado e a cela de referência ( $\Delta T_1$ , Figura 1.2) aumenta se o resultado da adição do titulante ao titulado for um processo exotérmico.



Figura 1.2: Diagrama esquemático de um calorímetro de compensação de energia (figura adaptada da referência 3).

Neste caso, o ciclo de retroalimentação responde reduzindo a energia dos aquecedores ao redor da célula do titulado para reduzir a zero o valor de  $\Delta T_1$ . Por esta razão, a adição do titulante desloca a linha base para um valor negativo em um registro de potência *versus* tempo (Figura 1.1). Uma reação endotérmica gera um pico positivo. O registro de um valor constante de energia indica que o sistema atingiu o equilíbrio. Neste caso, a energia registrada pela linha base é proporcional à energia necessária para manter a diferença de temperatura entre a célula de referência e o isolamento adiabático  $\Delta T_2$ , Figura 1.2.

# **1.1.3 - Relações Termodinâmicas Fundamentais que Descrevem o** Fenômeno das Interações Moleculares

A variação da energia livre de Gibbs,  $\Delta G$ , de uma interação à pressão constante depende da temperatura e é descrita pela Eq. 1.1<sup>1</sup>.

$$\Delta G(T) = \Delta H(T_R) + \int_{T_R}^T \Delta C_p dT - T \Delta S(T_R) - T \int_{T_R}^T \Delta C_p dlnT \qquad \text{Eq. 1.1}$$

 $\Delta H$  e  $\Delta S$  são as variações de entalpia e entropia, respectivamente,  $\Delta C_P$  é a variação da capacidade calorífica à pressão constante e  $T_R$  uma temperatura específica de referência. Se  $\Delta C_P$  não depende da temperatura no intervalo de interesse, a Eq. 1.1 pode ser simplificada pela Eq. 1.2.

$$\Delta G(T) = \Delta H(T_R) - T \Delta S(T_R) + \Delta C_p [T - T_R - T \ln(T/T_R)]$$
 Eq. 1.2

As Eqs. 1.1 e 1.2 mostram que a variação da energia livre de uma interação é constituída pelas componentes entálpica e entrópica. As variações de entalpia e entropia variam com a temperatura de acordo com Eq. 1.3.

$$\Delta C_p = \frac{d(\Delta H)}{dT} = T \frac{d(\Delta S)}{dT}$$
 Eq.1.3

A caracterização termodinâmica de uma interação química implica a determinação dos parâmetros  $\Delta G$ ,  $\Delta H$  e  $\Delta S$  a uma temperatura específica e a obtenção do  $\Delta C_P$  para avaliar a variação destes três parâmetros com a temperatura.

### 1.1.4 - Método de van't Hoff

0 método não-calorimétrico para determinação de parâmetros termodinâmicos de uma interação química é comumente conhecido como método de van't Hoff. Pode-se obter  $\Delta C_P$  pelo cálculo da segunda derivada de  $\Delta G(T)$  em função da temperatura. Este método não-calorimétrico para determinação da variação da capacidade calorífica de uma interação tem várias desvantagens. Freqüentemente, os experimentos podem somente ser realizados em uma faixa de temperatura pequena e os erros experimentais propagam-se e geram erros grandes para  $\Delta H$ ,  $\Delta S$  e  $\Delta C_P$  em particular. Ademais,  $K_{eq}$ , muitas vezes, não varia com a temperatura na faixa experimental acessível devido à compensação existente entre as variações de  $\Delta H$  e  $\Delta S$  com a temperatura de modo a manter os valores de  $\Delta G$ praticamente constante (compensação entálpica-entrópica). Por estas razões, o método de van't Hoff freqüentemente não produz bons resultados.

# 1.1.5 - O Tratamento dos Dados no Experimento de Titulação Calorimétrica

A integração da derivada da potência em relação ao tempo gera o calor observado,  $q_{i,obs}$ , entre as adições i - 1 e i, Eq. 1.4.

 $q_{i,obs}$  corresponde à área do *i*-ésimo sinal térmico, por exemplo, de um pico mostrado no registro gráfico da Figura 1.1. Para a interação química representada pela Eq. 1.5:

$$M + nL \rightleftharpoons ML_n$$
 Eq. 1.5

L representa o titulante, M representa a espécie titulada e n representa o número de sítios de interação idênticos e independentes presentes em M.

Praticamente toda espécie L adicionada reage com o titulado M se a constante de equilíbrio de associação,  $K_a$ , for grande e a razão molar entre o titulante e o titulado for pequena no início da titulação (primeiras adições). Os sinais térmicos, neste caso, têm áreas praticamente idênticas. O valor de  $q_{i,obs}$  diminui à medida que a fração de saturação aumenta. O valor de  $q_{i,obs}$  é proporcional ao volume da célula,  $V_{cel}$ , à mudança da concentração da espécie L ligada ao titulado M,  $\Delta[L_i]_{ligado} = [L_i]_{ligado} - [L_{i-1}]_{ligado}$ , e à variação da entalpia molar de formação do complexo  $ML_n$  observada,  $\Delta H_{obs}$ .

Pequenos sinais térmicos observados após a saturação são causados pela energia relacionada à diluição das espécies químicas (principalmente do titulante),  $q_{i,dil}$ , e pela energia relacionada a processos não específicos,  $q_{i,ne}$ . Deste modo, tem-se que:

O valor de  $q_{i,dil} + q_{i,ne}$  é obtido pela titulação da espécie L (titulante) no solvente no qual o titulado, M, havia sido dissolvido.  $V_{cel}$  é conhecido e  $\Delta H_{obs}$  é constante para uma determinada pressão, temperatura e solvente usado.  $\Delta H_{obs}$  e  $K_a$  são determinados a partir da Eq. 1.7.

$$\boldsymbol{q}_{i} = \boldsymbol{q}_{i,obs} - \boldsymbol{q}_{i,dil} - \boldsymbol{q}_{i,ne} = \boldsymbol{n}[\boldsymbol{M}]_{tot} \boldsymbol{V}_{cel} \Delta \boldsymbol{H}_{obs} \mathbb{R}$$
 Eq. 1.7

 $[M]_{tot}$  é a concentração total do titulado, M, presente na cela calorimétrica.  $\Delta q_i$  é o calor referente à formação do complexo  $ML_n$  na *i*ésima adição da titulação e  $\mathbb{R}$  é a raiz quadrada da Eq. 1.8<sup>1</sup>.

$$Y_i^2 - Y_i \left( 1 + \frac{1}{nK_a[M]_{tot}} + \frac{[L_i]_{tot}}{n[M]_{tot}} \right) + n[L]_{tot}[M]_{tot} = 0$$
 Eq. 1.8

onde  $Y_i$  é o grau de saturação já definido anteriormente, isto é,  $Y_i = \Delta[L_i]_{ligado} / [M]_{tot}$ .  $[L_i]_{tot}$  é a concentração total da espécie L adicionada até a adição i. A regressão não-linear dos dados com base na Eq. 1.7 fornece os valores de n,  $K_a$  e  $\Delta H_{obs}$  a partir de uma única titulação calorimétrica.

O sucesso da deconvolução da isoterma de interação depende freqüentemente de informações adicionais independentes sobre o número de sítios de interação, n, presentes em M, uma vez que  $n e \Delta H_{obs}$  estão correlacionados. Para sítios de interação idênticos e independentes, aplica-se o tratamento dos dados discutido acima. No caso de espécies contendo sítios de interação diferentes e/ou interdependentes requer-se o tratamento termodinâmico estatístico dos dados. Recentemente, Buurma e colaboradores<sup>4</sup> resumiram os modelos descritos na literatura para o tratamento de sistemas de interação intermolecular mais complexos com atenção particular para as interações que envolvem DNA. A deconvolução tem rigorosa fundamentação termodinâmica e existem exemplos instrutivos que demonstram os resultados deste método<sup>5,6,7</sup>. Na prática, contudo, o sucesso depende muito da qualidade dos dados experimentais e do número de parâmetros correlacionados no ajuste.

## 1.1.6 - As Informações Contidas nos Resultados Experimentais da Titulação Calorimétrica Isotérmica

### 1.1.6.1 – Constante de Equilíbrio

As concentrações dos reagentes (titulante e titulado) devem estar em uma razão adequada para tornar possível a obtenção de um valor confiável da constante de equilíbrio de associação ( $K_a$ ) das espécies químicas estudadas em um experimento de titulação. Se a concentração dos sítios de interação do composto a ser titulado é muito maior do que  $1/K_a$ , praticamente todo reagente adicionado é consumido até a saturação e a curva de titulação calorimétrica tem flexão demasiadamente abrupta. No caso da concentração dos sítios de interação ser muito menor que  $1/K_a$ , a curva da titulação calorimétrica é muito plana e torna-se impraticável seu ajuste. A concentração dos sítios de interação (contidos no titulado, por exemplo) não deve ser muito maior do que  $1/K_a$  para tornar possível a obtenção de um valor confiável da constante de equilíbrio da interação estudada.

Neste aspecto, Wiseman e colaboradores<sup>2</sup> notaram que o perfil da curva de titulação calorimétrica variava conforme o valor da multiplicação de  $K_a$  pela concentração de sítios de interação do titulado, M, nos casos onde o titulado apresentava um único sítio de interação (Eq. 1.9). O produto desta multiplicação foi denominado fator c (Eq. 1.10).

$$M + L \rightleftharpoons ML$$
 Eq. 1.9

O cálculo do fator c auxilia a seleção das melhores condições iniciais de um experimento de titulação calorimétrica. Valores do fator c entre 10 e 500 resultam

curvas cujo ajuste fornecerá valores confiáveis para a constante de equilíbrio enquanto que para valores de c < 10 o ajuste implicará, provavelmente, valores inexatos. Certamente para c < 1 o ajuste será impraticável. A Figura 1.3 mostra o perfil das curvas simuladas de titulação calorimétrica obtidas para diferentes valores do fator c.



Figura 1.3: Curvas de titulação calorimétrica simuladas para uma interação química para diferentes valores de c. O calor liberado por adição (normalizado em relação a quantidade molar de titulante adicionado e pela variação de entalpia da interação) é apresentado em função da razão molar entre o titulante e o titulado. O fator c é o valor da multiplicação de  $K_a$  pela concentração de sítios de interação do titulado, M, presente na cela calorimétrica e foi definido por Wiseman e colaboradores<sup>2</sup> para avaliar a confiabilidade da determinação de  $K_a$  pela regressão não-linear da isoterma de interação obtida em um experimento de titulação calorimétrica (figura adaptada da referência 8).

A Eq. 1.11 é a equação geral para o cálculo do fator c definido por Wiseman e colaboradores<sup>2</sup> no caso do titulado conter n sítios de interação idênticos e independentes<sup>8</sup>.

Atualmente, o software Nano ITC Run Software V1.6 auxilia a determinação das condições iniciais de uma titulação calorimétrica. Ele é disponibilizado gratuitamente pela empresa TA Instruments (New Castle, DE USA) e está disponível para cópia no endereço eletrônico: http://www.tainstruments.com/main.aspx?id=279&n=2&siteid=11.

Freqüentemente, as concentrações adequadas dos reagentes para determinação de  $K_a$  mostram-se impraticáveis. Constantes de equilíbrio muito grandes exigem concentrações muito pequenas de titulado o que pode tornar os sinais térmicos gerados imperceptíveis. Por este motivo,  $K_a$  acima de  $\approx 10^9$  M<sup>-1</sup> ( $\Delta$ G ~ -50 kJ mol<sup>-1</sup> na temperatura ambiente) não podem ser medidos com exatidão.

Por outro lado, a agregação dos reagentes devido às altas concentrações constitui um problema no caso de constantes de equilíbrio muito pequenas que requerem uma concentração total de sítios de interação alta para gerar valores do fator c entre 10 e 500.

Torna-se possível, às vezes, escolher uma temperatura adequada na qual se pode medir o valor de  $K_a$  com confiabilidade. Infelizmente, na maioria dos casos,  $K_a$  é praticamente independente da temperatura devido à acentuada compensação entálpica/entrópica. Outra alternativa requer o uso de ciclos termodinâmicos adequados onde as constantes de interação entre as espécies químicas de interesse podem ser determinadas. Por exemplo, pela variação do pH<sup>9,10</sup> ou pelo deslocamento de uma espécie química ligada ao sítio de interação de interesse por outra espécie química em um experimento de titulação calorimétrica <sup>11, 12, 13</sup>.

### 1.1.6.2 - Variação da Entalpia

Os valores da variação de entalpia são determinados com exatidão nas condições onde a interação entre as espécies químicas de interesse é completa, isto é, quando o grau de saturação é pequeno. Por esta razão,  $K_a \ \Delta H_{obs}$  são melhor definidos em experimentos com diferentes razões de concentração entre as espécies químicas de interesse (titulante/titulado), embora os valores destes parâmetros possam ser determinados simultaneamente em uma única titulação calorimétrica.

Comparações entre variações de entalpia determinadas em H<sub>2</sub>O e D<sub>2</sub>O permitem concluir que a reorganização do solvente é responsável em grande parte pela variação de entalpia observada<sup>14, 15</sup>. Além disso, moléculas de água podem melhorar a complementaridade da superfície de interação entre os componentes de um complexo uma vez que podem ligar seus componentes através de ligações de hidrogênio e formar uma rede tridimensional ao redor da superfície de interação. Este arranjo tridimensional de moléculas de água ao redor do complexo pode contribuir favoravelmente para a entalpia da interação<sup>16, 17</sup>, freqüentemente, compensadas por perdas entrópicas<sup>18</sup>. Acredita-se que, por esta razão, a energia livre da interação seja influenciada pela diminuição da atividade de água do sistema através da adição de glicerol ou outro osmólito à solução<sup>19, 20</sup>. Complexos com pequeno grau de complementaridade são tolerantes à pressão osmótica<sup>21</sup>.

Em geral, mudanças na variação de entalpia não trazem mudanças significativas na variação de energia livre. Uma das razões deste comportamento é a compensação entálpica/entrópica. Isto é, mudanças na variação de entalpia, favoráveis a uma interação, por exemplo, podem ser praticamente compensadas por perdas entrópicas. Interpretações moleculares para o fenômeno da compensação entálpica-entrópica isotérmica foram apresentadas por Jen-Jacobson e colaboradores<sup>22</sup>. Este comportamento pode ser observado na interação do citocromo c com o anticorpomonoclonal mAb 2B5 (Figura 1.4-A). Destaca-se,

13

entretanto, que os valores de  $\Delta H$  e  $-T\Delta S$  permanecem praticamente constantes com a temperatura no caso da interação do citocromo c com o anticorpomonoclonal mAb 5F8 (Figura 1.4-B).



Figura 1.4: Influência da temperatura nos parâmetros termodinâmicos da interação do citocromo c com anticorpos monoclonais. A) citocromo c e mAb 2B5: nesta interação observa-se o efeito da compensação entálpica/entrópica. B) citocromo c e mAb 5F8, nesta interação o valor de  $\Delta G$  da interação é mantido praticamente constante pelo fato dos valores de  $\Delta H$  e  $-T\Delta S$  permanecerem praticamente constantes com a temperatura (figura adaptada da referência 23).

Acredita-se que este comportamento reflita o papel majoritário exercido pelas moléculas de água na interação entre duas espécies químicas<sup>24, 25</sup>.

### 1.1.6.3 - Variações da Entalpia de van't Hoff e Calorimétrica

A formação de um complexo entre duas espécies químicas, entre duas proteínas, por exemplo, pode ser descrita como um processo composto por duas etapas, a saber, o encontro dos componentes do complexo seguido pela desolvatação da interface coberta pela interação. A variação da entalpia de

associação calculada pelo método de van't Hoff baseia-se na medida das alterações nos valores de propriedades físicas devido à formação do complexo, por exemplo, devido à supressão de fluorescência de resíduos de triptofano encobertos pela formação do complexo.

Por esta razão, somente se a interação química entre duas espécies seguir um mecanismo sem a formação de intermediários e com contribuições pequenas referentes à reorganização da água, mudanças conformacionais ou mudanças do estado de protonação das espécies envolvidas o valor da variação de entalpia determinada pelo método de van't Hoff,  $\Delta H_{vH}$ , deve ser igual ao valor da variação da entalpia determinada por calorimetria,  $\Delta H_{cal}$ , Eq. 1.12. Caso contrário,  $\Delta H_{vH}$  e  $\Delta H_{cal}$  serão diferentes. Chaires discute as possíveis causas da diferença entre os valores da variação de entalpia obtidas por estes dois métodos<sup>26</sup>.

$$\Delta H_{cal} / \Delta H_{vH} = 1$$
 Eq. 1.12

# 1.1.6.4 - Determinação do Número de Prótons Envolvidos em uma Interação Química

A interação entre as espécies químicas estudadas em um experimento de titulação calorimétrica pode envolver a troca de prótons dos constituintes do sistema avaliado com as espécies químicas responsáveis pela manutenção do pH da solução. Neste caso, a variação da entalpia observada,  $\Delta H_{obs}$ , varia com a entalpia de ionização do tampão usado no experimento,  $\Delta H_{ionização}$  (tampão), segundo a Equação 1.13, onde  $n_{H^+}$  é o número de prótons trocados entre as espécies do sistema avaliado com as espécies químicas responsáveis pela manutenção do pH.

$$\Delta H_{obs} = \Delta H_{interação} + n_{H^+} \Delta H_{ionização} (tampão)$$
 Eq. 1.13

Os valores da entalpia de ionização de vários tampões estão descritos na literatura<sup>27</sup> ou podem ser medidos por titulação calorimétrica<sup>20</sup>. Os valores de  $\Delta H_{interação} e^{n_{H^+}}$  podem ser determinados pela repetição da titulação calorimétrica no mesmo pH em tampões diferentes a partir da Eq. 1.13. O coeficiente angular obtido a partir do ajuste linear da curva dos valores da variação de entalpia observada pela entalpia de ionização dos tampões usados determina o número de prótons trocados entre o complexo e o tampão. A Figura 1.5 mostra um exemplo onde a interação entre duas proteínas é acompanhada pela liberação de um próton.



Figura 1.5: Mudança da entalpia observada para a interação entre a ferredoxina e a ferredoxina:NADP<sup>+</sup> oxidoredutase a 27 °C em função da variação de entalpia de ionização do tampão usado no experimento. Titulações calorimétricas realizadas em pH 7,5 em Tris (quadrado), Mops (triângulo), fosfato (círculo) e tampão cacodilato (diamante). A linha tracejada mostra o ajuste linear de quadrados mínimos para a Eq. 1.13. Coeficiente angular =  $0,96 \pm 0,03$  (figura adaptada da referência 20).

A condição de  $\Delta H_{obs} = \Delta H_{interação}$  será observada em qualquer tampão no caso da interação não envolver a troca de prótons entre as espécies do sistema

avaliado com as espécies químicas do tampão ( $n_{H^+} = 0$ ). Em outras palavras, podese concluir que a formação do complexo não envolve a troca de prótons com as espécies químicas do tampão se a variação de entalpia observada nas titulações calorimétricas realizadas em diferentes soluções tampão é constante.

### 1.1.6.5 - Variação da Capacidade Calorífica

Os calorímetros comerciais disponíveis atualmente permitem determinar a variação de entalpia de uma interação numa faixa de temperatura entre 5 e 70 °C, aproximadamente. A determinação da variação da entalpia de uma interação em função da temperatura permite o cálculo da variação da capacidade calorífica,  $\Delta C_{P}$ , conforme a Eq. 1.3. A variação da capacidade calorífica de formação de um complexo é quase sempre negativa se o complexo é considerado como o estado de referência. Apesar da interpretação molecular da variação da capacidade calorífica ser complexa, acredita-se que este fato seja causado, principalmente, pela mudança no grau de hidratação das superfícies dos componentes do complexo após a interação e, em menor extensão, das mudanças no número dos modos vibracionais moleculares excitáveis do complexo em relação aos seus constituintes antes da interação<sup>28, 29, 30</sup>.

A determinação da variação da capacidade calorífica permite avaliar se a mudança na hidratação das superfícies dos componentes do complexo após a interação decorre preponderantemente de regiões polares ou apolares<sup>31 32</sup>. Os valores de  $\Delta C_P$  para a hidratação de regiões de grupos polares são diferentes das regiões de grupos apolares<sup>33, 34</sup>. Neste aspecto, Madan e Sharp<sup>35, 36, 37</sup> propuseram modelos para explicar a relação dos fenômenos de hidratação de solutos polares e apolares pequenos com as variações nos valores de  $\Delta C_P$  enquanto outros procuraram explicar esta relação na interação de macromoléculas<sup>38, 39</sup>.

17

### 1.1.6.6 - Variação de Entropia

A variação de entropia pode ser calculada a partir dos valores de K e  $\Delta H$  segunda a Eq. 1.14:

$$\Delta S = \frac{\Delta H}{T} + R l n K_a$$
 Eq. 1.14

onde  $\mathbf{R}$  é a constante dos gases e  $\mathbf{T}$  é a temperatura termodinâmica (experimental).

A variação de entropia relativa à formação de um complexo é freqüentemente grande e positiva. O aumento da entropia é causado principalmente pela significativa redução do número de moléculas de água de hidratação dos grupos polares e apolares da superfície de interação na formação do complexo. Entretanto, algumas vezes, ocorre a formação de arranjos rígidos de moléculas de água na interface do complexo, o que contribui de modo desfavorável para entropia e favorável para a entalpia de formação do complexo<sup>18</sup>. Uma outra contribuição entropicamente desfavorável é a redução da mobilidade das cadeias laterais dos sítios de interação, isto é, restrições conformacionais decorrentes da formação do complexo.

Obviamente, um valor negativo da variação de entropia pode ter diferentes explicações, contudo, isto não indica necessariamente que a hidratação da superfície de interação permanece inalterada. Por outro lado, um valor positivo de  $\Delta S$  indica com maior segurança que moléculas de água foram expulsas da interface de interação durante a formação do complexo.

# 1.2 - APLICAÇÕES DA TITULAÇÃO CALORIMÉTRICA ISOTÉRMICA NA CARACTERIZAÇÃO DE INTERAÇÕES MOLECULARES

A titulação calorimétrica isotérmica tem contribuído para a elucidação das características energéticas da formação de complexos moleculares relacionados às mais diversas áreas do conhecimento. Destacam-se as ciências biológicas e as ciências dos materiais. Abaixo são descritos exemplos da aplicação da titulação calorimétrica isotérmica nestas duas importantes áreas do conhecimento humano.

# 1.2.1 - Exemplos da Aplicação da Titulação Calorimétrica Isotérmica nas Ciências Biológicas

O número de estruturas cristalinas de complexos de biomoléculas com alta resolução tem crescido rapidamente e há um grande número de bases de dados que descrevem a complementaridade das superfícies de interação destes complexos, o que inclui a descrição precisa da orientação dos grupos responsáveis pela interação em cada componente do complexo. Estes dados, embora estáticos, permitem compreender detalhadamente o modo como as biomoléculas interagem, contudo, não se compreende, do mesmo modo, as causas destas interações<sup>1</sup>.

Por esta razão, a compreensão dos complexos formados por biomoléculas exige o relacionamento das suas características estruturais às características termodinâmicas relacionadas a sua formação. Racionalizar esta relação tem sido tarefa difícil, apesar do desenvolvimento teórico promissor e da grande quantidade de dados experimentais acumulados. O tamanho das biomoléculas é uma das características importantes na descrição do seu comportamento. Proteínas e ácidos nucléicos devem ser considerados como sistemas macroscópicos individuais cercados por moléculas de solvente.<sup>40</sup> Eles se comportam de modo cooperativo e,

19

freqüentemente, sofrem mudanças estruturais durante as interações químicas que participam. Por exemplo, um domínio protéico responsável pela ligação com DNA pode apresentar estrutura irregular na proteína livre e adquirir estrutura regular após sua interação com o DNA<sup>41</sup>.

Alguns exemplos da aplicação da titulação calorimétrica isotérmica no estudo da desnaturação de proteínas e na compreensão da causa da formação de complexos entre biomoléculas estão descritos abaixo.

### 1.2.1.1 - Caracterização da Desnaturação Reversível de Proteínas

Entre as doenças neurodegenerativas cujo mecanismo envolve a agregação de proteínas e a formação de corpos de inclusão estão as doenças de Alzheimer, Parkinson, Huntington e a encefalopatia espongiforme transmissível<sup>42</sup>. Recentemente, a caracterização termodinâmica da formação de fibrilas amilóides de  $\beta_2$ -microglobulinas por titulação calorimétrica isotérmica foi relatada na literatura por Kardos e colaboradores<sup>43</sup>. Deve-se destacar que a estratégia usada neste trabalho pode ser usada no estudo da formação de amilóides em outros sistemas protéicos.

A titulação calorimétrica também foi aplicada na caracterização da desnaturação da creatina quinase do músculo de coelho (MM-CK). A dosagem no sangue da enzima creatina quinase é amplamente utilizada para diagnosticar e monitorar o infarto do miocárdio em humanos e avaliar lesões no músculo esquelético de animais<sup>44</sup>. Liang e colaboradores<sup>45</sup> verificaram que a desnaturação da MM-CK induzida por ácido é entalpicamente dirigida a 15 °C e torna-se entropicamente dirigida em temperaturas mais altas ( 25 °C , 30 °C e 37 °C). Notase que a variação da energia livre devido à desnaturação da MM-CK induzida por cloreto de guanidina (+ 6,24 kcal / mol) é duas vezes maior do que aquela induzida por ácido (+ 3,37 kcal / mol). Outras aplicações da titulação calorimétrica

isotérmica na caracterização energética da desnaturação de proteínas foram descritas recentemente por Yi Liang<sup>46</sup>.

### 1.2.1.2 - Caracterização das Interações Protéicas

Atualmente, a titulação calorimétrica isotérmica pode ser aplicada na avaliação de quaisquer processos que envolvam proteínas. Dentre estas aplicações estão a avaliação da interação entre proteínas e moléculas pequenas, DNA<sup>4</sup>, RNA<sup>47, 48</sup>, carboidratos e a determinação de parâmetros termodinâmicos e cinéticos de reações enzimáticas.

O ácido ferúlico é um composto fenólico com atividade farmacológica encontrado na parede celular de plantas. Yang e colaboradores<sup>49</sup> caracterizaram a interação do ácido ferúlico com o citocromo c bovino. Eles identificaram que a interação é entalpicamente favorável e ocorre com ganho de entropia. Medidas realizadas por calorimetria exploratória diferencial e dicroísmo circular mostraram que a interação entre o citocromo c e o ácido ferúlico aumenta a estabilidade térmica do citocromo c.

O uso da titulação calorimétrica isotérmica no estudo das reações enzimáticas constitui uma área promissora de pesquisa. A avaliação calorimétrica da fosforilação da glicose pelas isozimas de levedura Hxk1 e Hxk2<sup>50</sup> é um exemplo da aplicação da titulação calorimétrica na caracterização termodinâmica e cinética de reações enzimáticas. Dentre os resultados obtidos neste trabalho, uma diferença significativa na variação da entalpia de reação entre estas enzimas indicou diferenças entre seus mecanismos de atuação, por exemplo, devido à outra reação de fosforilação paralela. Verificou-se também que um único próton foi liberado durante a fosforilação da glicose tanto pela atuação da Hxk1 como pela Hxk2.

21

### 1.2.1.3 - Caracterização das Interações entre Proteínas e Íons

O uso da titulação calorimétrica isotérmica na caracterização termodinâmica da interação entre proteínas e íons é particularmente útil<sup>51</sup>. Os estudos descritos abaixo demonstram como a titulação calorimétrica foi usada para determinar a estequiometria, a constante de equilíbrio e as variações de entalpia e entropia destas interações. Alguns estudos descrevem também a determinação da variação da capacidade calorífica e do número de prótons trocados na interação por titulação calorimétrica isotérmica.

Algumas proteínas facilitam a entrada de íons na célula e são conhecidas como proteínas facilitadoras da difusão de cátions (CDF – *cation diffusion facilitator*). Certos membros desta família transportam  $Zn^{2+}$ , íon necessário para a atividade catalítica de inúmeras metaloproteínas<sup>52</sup>. Wei e Fu<sup>53</sup> caracterizaram a interação entre a proteína transportadora YiiP e três íons do grupo 12 da tabela periódica, a saber,  $Zn^{2+}$ , Cd<sup>2+</sup> e Hg<sup>2+</sup>. Os parâmetros termodinâmicos determinados foram diferentes para cada íon avaliado, o que pôde ser relacionado a uma "assinatura termodinâmica" característica da interação destes íons com os sítios de interação da YiiP. A relação das características químicas dos íons avaliados e dos valores dos parâmetros termodinâmicos medidos trouxeram novos conhecimentos sobre o mecanismo envolvido no reconhecimento molecular dos sítios de interação das proteínas facilitadoras da difusão de cátions e, em particular, da proteína YiiP.

O papel relevante da reorganização das moléculas de água na interação entre proteínas e íons tem sido destacado em vários trabalhos na literatura<sup>54 55</sup>. Dentre estes trabalhos está a caracterização termodinâmica de domínios protéicos que ligam íons zinco conhecidos como "dedos de zinco"<sup>56</sup>. Estes domínios consistem de aproximadamente 30 aminoácidos e possuem duas fitas  $\beta$  anti-paralelas (formando uma folha  $\beta$ ) e uma  $\alpha$ -hélice. Surpreendentemente, a afinidade por íons zinco do "dedo de zinco" derivado da proteína humana ZFY praticamente não sofreu
alteração após um resíduo de fenilalanina ser substituído por leucina devido à compensação entálpica-entrópica. Os autores propõe que diferenças na reorganização do solvente poderiam ser responsáveis pela compensação entálpica-entrópica verificada.

Outras aplicações da titulação calorimétrica isotérmica na caracterização termodinâmica da interação entre proteínas e íons foram descritas recentemente por Wilcox<sup>51</sup>.

### 1.2.1.4 - Outras Aplicações

Dentre as outras aplicações da titulação calorimétrica isotérmica nas ciências biológicas destaca-se o desenvolvimento de novos fármacos. As características termodinâmicas da interação entre um fármaco e sua molécula alvo revelam as contribuições entálpica e entrópica da variação da energia livre do processo de interação e indicam a natureza da força motriz responsável pela formação do complexo. A especificidade e as propriedades farmacológicas podem ser diferentes para fármacos que apresentam constantes de equilíbrio semelhantes em relação a uma molécula alvo. Nestes casos, as diferenças das propriedades podem decorrer dos valores diferentes das variações de entalpia e entropia de cada interação. Jonathan B. Chaires apresenta algumas estratégias usadas no desenvolvimento de novos fármacos a partir destas informações<sup>57</sup>.

As contribuições entálpicas estão geralmente associadas a força da ligação do fármaco com seu sítio de interação (ligações hidrogênio, interações de van der Waals) em relação as interações com as moléculas do solvente. Por sua vez, as contribuições entrópicas decorrem em geral da significativa redução do número de moléculas de água de hidratação dos grupos polares e apolares da superfície de interação na formação do complexo. A Figura 1.6 mostra o perfil termodinâmico

23

dos inibidores de protease de HIV de primeira geração, a saber, indinavir, nelfinavir, saquinavir, e ritonavir e o KNI-764 de segunda geração.



Figura 1.6: Otimização entálpica dos inibidores de protease de HIV. Perfil termodinâmico dos inibidores de protease de primeira geração (ritonavir, saquinavir, nelfinavir e indinavir) e segunda geração (KNI-764) (figura adaptada da referência 57).

A contribuição entrópica para todos os fármacos de primeira geração é predominante. Três dos quatro exemplos citados têm variação de entalpia desfavorável (saquinavir, nelfinavir e indinavir). As diferenças do perfil energético de interação da nova geração dos inibidores de protease de HIV são apresentadas na Figura 1.6 com o exemplo do KNI-764. A constante de interação do KNI-764 é maior comparada aos inibidores de primeira geração. Destaca-se, ademais, que a energia livre decorre quase igualmente das contribuições entálpica e entrópica.

A análise do perfil termodinâmico de uma série de inibidores de protease de HIV indicou que constantes de associação grandes estão associadas a interações entalpicamente favoráveis. Esta observação deu origem ao termo otimização entálpica<sup>58</sup>.

### **1.2.2** - Exemplos da Aplicação da Titulação Calorimétrica Isotérmica nas Ciências dos Materiais

A titulação calorimétrica tem contribuído também para a determinação das características termodinâmicas relacionadas à formação de inúmeros complexos supramoleculares nas ciências dos materiais com destaque para a ciência dos polímeros<sup>59</sup>, colóides e nanotecnologia. A seguir são descritos exemplos da aplicação da titulação calorimétrica isotérmica nestas áreas do conhecimento.

## 1.2.2.1 - Caracterização da Formação de Complexos de Ciclodextrina

Ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos formados por unidades  $\alpha$ -1,4-Dglicopiranose e são obtidas a partir da degradação do amido pela enzima glucosiltransferase<sup>60</sup>. As ciclodextrinas caracterizam-se por apresentar superfície externa hidrofílica e uma cavidade interna lipofílica. Estas características químicas permitem que estas últimas sejam usadas para aumentar a solubilidade de substâncias pouco solúveis em água uma vez que podem admitir moléculas hóspedes no interior da sua cavidade. A Figura 1.7 mostra a formação de complexos de ciclodextrina contendo moléculas hóspedes de interesse farmacêutico.



Figura 1.7: Formação de complexos de ciclodextrina e moléculas de interesse farmacêutico<sup>60</sup>.

O conhecimento das constantes de equilíbrio e das variações de entalpia e entropia envolvidas no fenômeno da inclusão de moléculas hóspedes na cavidade de ciclodextrinas desempenha um papel importante no entendimento das causas deste fenômeno<sup>61</sup>. Neste aspecto, a titulação calorimétrica isotérmica é uma das técnicas mais sensíveis usadas na caracterização termodinâmica do fenômeno de inclusão. Para isto, alíquotas de uma solução concentrada de ciclodextrina são adicionadas a uma solução da molécula hóspede contida na cela calorimétrica. Em alguns casos, os resultados da titulação calorimétrica indicam que cada molécula de ciclodextrina aloja em sua cavidade uma única molécula hóspede<sup>62, 63, 64</sup>. Muitos casos, contudo, não permitem estabelecer uma estequiometria definida para o complexo formado, como, por exemplo, a interação entre a molécula 2-hidroxi-5-metoxiacetofenona (Hma), freqüentemente usada como essência odorífera, e a  $\beta$ -ciclodextrina. Neste caso, a titulação calorimétrica indica a formação de complexos formados por uma molécula de  $\beta$ -ciclodextrina e uma ou duas moléculas de Hma<sup>65</sup>.

O uso da titulação calorimétrica permite comparar a espontaneidade da formação de complexos com diferentes moléculas hóspedes através da determinação da constante de equilíbrio e avaliar as contribuições entálpica e entrópica relacionadas a interação estudada<sup>66</sup>. A técnica também permite avaliar o efeito de modificações realizadas na estrutura da ciclodextrina na espontaneidade da inclusão de uma molécula hóspede<sup>67</sup>.

### 1.2.2.2 - Caracterização da Formação de Complexos Micelares

Moléculas de surfatantes são capazes de formar agregados quando sua concentração em solução encontra-se acima de uma faixa estreita de concentração, chamada concentração micelar crítica (cmc). O entendimento da formação estrutural e termodinâmica de micelas é importante uma vez que agregados micelares participam de inúmeros processos tecnológicos, tais como, detergência, emulsões e na recuperação terciária do petróleo<sup>68</sup>. Além disso, micelas são usadas como modelos para o estudo de membranas biológicas<sup>69</sup>, fotossíntese<sup>70</sup>, transporte de elétrons<sup>71</sup> e interações entre lipídios e proteínas<sup>72</sup>.

A titulação calorimétrica isotérmica é a única técnica capaz de fornecer os valores da cmc e da entalpia de micelização de um surfactante,  $\Delta_{mic}H$ , em um único experimento, sem a intervenção de qualquer espécie química como sonda. Tipicamente, a solução contendo as micelas é colocada na seringa e titulada em água. A concentração micelar da solução contida na seringa é escolhida de modo que a concentração micelar crítica seja atingida na cela calorimétrica durante a titulação. A entalpia de micelização é calculada a partir da diferença dos valores da entalpia final e inicial da curva de titulação (Figura 1.8 A) e a concentração micelar crítica é obtida diretamente a partir do valor máximo da primeira derivada da curva de titulação (Figura 1.8 B).



Figura 1.8: Dados típicos de uma curva de titulação calorimétrica para um surfatante adicionado em água. A-) determinação da variação da entalpia de micelização a partir da diferença dos valores da entalpia final e inicial da curva de titulação. B-) determinação da concentração micelar crítica do surfatante (cmc) - valor máximo da primeira derivada da curva de titulação (figura adaptada da referência 61).

A determinação experimental dos valores da entalpia de micelização e da cmc permite o cálculo da energia livre de micelização,  $\Delta_{mic} G$ , e da entropia de micelização,  $\Delta_{mic} S$ .<sup>61</sup> A variação da capacidade calorífica de micelização pode ser determinada pela Eq. 1.15.

$$\Delta C_{p,m} = \left(\frac{\partial \Delta H_m}{\partial T}\right)_p$$
 Eq. 1.15

A titulação calorimétrica isotérmica permite avaliar também a interação de surfatantes com moléculas tais como fármacos, polímeros e proteínas. A seguir são apresentados alguns exemplos relevantes do estudo destas interações em formulações farmacêuticas e materiais usados para liberação controlada de fármacos.

### 1.2.2.3 - Caracterização das Interações entre Fármacos e Surfatantes

Surfatantes aumentam a solubilidade de substâncias pouco solúveis em água. Muitas vezes, as interações entre fármacos e surfatantes são complexas e a escolha do surfatante mais adequado para aumentar a solubilidade de um determinado fármaco torna-se difícil. A caracterização termodinâmica destas interações, por sua vez, permite conhecer melhor a natureza das forças envolvidas no fenômeno. Neste sentido, o uso da titulação calorimétrica isotérmica permite determinar a entalpia da interação entre fármacos e surfatantes diretamente.

Alguns exemplos relevantes do uso da titulação calorimétrica foram a caracterização da interação do sulfato de salbutamol com Span®85 e da sinvastatina com inúmeros sistemas micelares<sup>73</sup>. A partir dos resultados foi possível estabelecer a relação entre a energia livre de transferência do fármaco para cada agregado de moléculas de surfatante e o aumento da solubilidade do fármaco. Sugere-se que o método desenvolvido permita a seleção do melhor surfatante para aumentar a solubilidade de um fármaco pouco solúvel em água.

### 1.2.2.4 - Caracterização das Interações entre Polímeros e Surfatantes

Polímeros e surfatantes são componentes presentes em um expressivo número de formulações de importância tecnológica como tintas, detergentes, cosméticos etc. Vários trabalhos tem sido realizados para descrever os complexos formados por estes compostos<sup>74</sup>. Contudo, questões fundamentais sobre as causas do fenômeno da associação das moléculas de surfatante devido à presença de polímeros e sobre o mecanismo de formação destes agregados foram pouco estudadas<sup>75</sup>. Torna-se importante, deste modo, a compreensão das forças que governam o processo de interação e as características da formação dos complexos constituídos por polímero e surfatante. Vários métodos têm sido utilizados no estudo destes sistemas, dentre eles: diálise, RMN, condutometria e titulação calorimétrica<sup>76</sup>. Por sua vez, a titulação calorimétrica isotérmica permite a medida direta da variação dos parâmetros termodinâmicos associados a formação destes complexos com grande sensibilidade<sup>77</sup>. Em geral, as interações entre polímeros e surfatantes podem ser divididas em duas categorias: i) interações entre polímeros e todos tipos de surfatantes<sup>61</sup>.

A caracterização termodinâmica da interação entre o surfatante catiônico brometo de dodeciltrimetilamônio (DTAB) e o poli(ácido acrílico)<sup>78</sup> e a interação entre o surfatante aniônico dodecil sultato de sódio (SDS) com o polissacarídeo catiônico quitosana<sup>79</sup> mostram o uso da titulação calorimétrica isotérmica no estudo da interação entre polímeros e surfatantes iônicos com cargas elétricas opostas.

A segunda categoria das interações entre polímeros e surfatantes envolve polímeros neutros como a celulose e seus derivados, a poli(vinil pirrolidona), o poli(propileno glicol), o poli(etileno glicol) entre outros. Recentemente, a interação entre dextrinas modificadas e surfatantes iônicos foi caracterizada através de espectroscopia de fluorescência e titulação calorimétrica isotérmica<sup>80</sup>. Além da determinação da entalpia de agregação e das concentrações críticas de formação de microdomínios no processo de formação dos complexos estudados foi possível avaliar a influência da razão molar entre o surfatante e as cadeias laterais hidrofóbicas do polímero no comportamento de formação destes complexos<sup>80</sup>.

### 1.2.2.5 - Caracterização das Interações entre Proteínas e Surfatantes

Surfatantes têm sido usados na manutenção das características estruturais e funcionais de proteínas<sup>81, 82</sup>. Inúmeras formulações farmacêuticas comerciais contém surfatantes não iônicos para evitar a agregação de proteínas<sup>83</sup>. Muitas vezes, contudo, os surfatantes podem prejudicar a atividade de enzimas e a estabilidade de proteínas.

Neste contexto, a titulação calorimétrica isotérmica pode auxiliar a avaliação dos mecanismos envolvidos nas interações entre proteínas e surfatantes e caracterizar a natureza das forças envolvidas nestas interações. A albumina de soro bovino<sup>84</sup> e a insulina<sup>85</sup> são geralmente usadas nesta caracterização pelo fato das suas estruturas e propriedades físico-químicas serem bem conhecidas. Tipicamente, a solução protéica é titulada com uma solução concentrada de surfatante. Apesar da simplicidade experimental a interpretação dos termogramas das interações entre proteínas e surfatantes é uma tarefa difícil uma vez que as mudanças conformacionais dos reagentes e o processo de micelização contribuem com o sinal térmico observado. Para interpretação molecular das variações energéticas observadas faz-se necessário associar a titulação calorimétrica com técnicas para determinação estrutural como espectroscopia de fluorescência,<sup>83, 86</sup> dicroísmo circular<sup>85</sup>, espalhamento dinâmico de luz<sup>87, 88</sup> entre outras. Somente a caracterização energética e estrutural das interações pode levar ao mecanismo e as características detalhadas da natureza das forças envolvidas na interação entre proteínas e surfatantes.

31

# 1.2.2.6 - Caracterização da Formação de Complexos de Polieletrólitos

A compreensão da formação espontânea de estruturas supramoleculares de polieletrólitos pela interação de poliíons de cargas opostas é um fenômeno físicoquímico fundamental não somente para o entendimento da transcrição de proteínas e reações entre antígeno e anticorpo como também no desenvolvimento de novos materiais liberadores de fármacos<sup>89</sup>, formação e estabilização de emulsões<sup>90</sup>, formação de géis<sup>91</sup> e complexos de policátions com ácidos nucléicos ou oligonucleotídeos como vetores na terapia gênica<sup>92</sup> etc.

Dentro deste contexto, o uso da titulação calorimétrica isotérmica tem contribuído com sucesso na caracterização termodinâmica da formação de complexos de polieletrólitos, apesar destas interações envolverem vários processos físico-químicos simultâneos. Dentre estes processos estão i) a formação do complexo devido às interações químicas, ii) mudanças conformacionais dos reagentes, iii) ionização de grupos polares e iv) interações com as espécies químicas presentes no meio.

A análise crítica dos parâmetros termodinâmicos de muitos trabalhos indica que as contribuições entrópicas e entálpicas envolvidas nas interações de polieletrólitos estão relacionadas a sua densidade de cargas. A formação de complexos entre polieletrólitos pouco carregados é dirigida pela entalpia devido a atração eletrostática entre as espécies e envolve uma contribuição entrópica pequena (com a liberação de contra-íons presentes na interface dos componentes da interação para a solução<sup>93</sup>). Por outro lado, a formação de complexos a partir de polieletrólitos contendo um grande número de cargas é entropicamente dirigida devido a grande contribuição da liberação de contra-íons para a solução e envolve uma variação positiva de entalpia<sup>94</sup>.

32

### 1.2.2.7 - Outras Aplicações

A titulação calorimétrica isotérmica também tem sido aplicada na caracterização de um grande número de sistemas contendo nanopartículas<sup>95, 96</sup>.

Outra aplicação da titulação calorimétrica isotérmica é a determinação da entalpia de transferência de um soluto em sistemas bifásicos água/solvente orgânico descrita por Sassonia, R. C.<sup>97</sup>. Neste trabalho, a estratégia usada nas medidas da entalpia de transferência do soluto para a fase orgânica foi separar as fases de um sistema bifásico em equilíbrio, dissolver uma quantidade do soluto na fase aquosa e titulá-la sobre um volume conhecido da fase orgânica contida na cela calorimétrica. O valor da variação da entalpia de transferência do soluto para a fase orgânica foi obtido pela divisão do calor do processo de transferência medido pelo número de moles do soluto transferido para a fase orgânica em cada adição. A quantidade de soluto transferida para fase orgânica foi calculada a partir dos valores do seu coeficiente de partição no sistema bifásico avaliado.

### **1.3 - AS EXPECTATIVAS PARA O FUTURO DA TITULAÇÃO** CALORIMÉTRICA ISOTÉRMICA

A titulação calorimétrica isotérmica tem ganhado destaque continuamente nos laboratórios de pesquisa e na indústria. A incorporação da manipulação automática da amostra tornará os calorímetros de titulação mais apropriados a indústria farmacêutica. Neste sentido, instrumentos para determinação da entalpia de interações de alto rendimento tem sido propostos, contudo, ainda com sensibilidade muito inferior aos microcalorímetros comerciais<sup>98</sup>. A combinação da titulação calorimétrica com outras técnicas não-invasivas em solução como RMN se mostra uma área promissora como demonstrado por Yung e colaboradores<sup>99</sup>.

A correlação entre os dados termodinâmicos e estruturais para prever fenômenos de interação *ab initio* permanece um objetivo distante, porém, torna-se factível a medida que mais dados calorimétricos são publicados. O trabalho desenvolvido por Talhout e colaboradores<sup>100</sup> exemplifica as limitações e as possibilidades deste tipo de estudo. O aprofundamento teórico dos fundamentos termodinâmicos que governam as interações entre fármacos e seus substratos é necessário para racionalizar o desenvolvimento de novos fármacos.



### 2.1 - OBJETIVO GERAL

Aplicação da técnica de titulação calorimétrica isotérmica na caracterização termodinâmica de reações de nitrosação de tióis e de interações proteína-proteína e proteína-íon.

### 2.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1-) Relatar uma metodologia para determinar através da técnica de titulação calorimétrica isotérmica (ITC) as variações de energia de Gibbs, entalpia e entropia da S-nitrosação da N-acetil-L-cisteína (NAC), L-cisteína (Cys), L-glutationa (GLU) e ácido mercaptosuccínico (AMS) pela ação de espécies nitrosantes formadas a partir da reação de íons nitrito em meio aquoso ácido.
- 2-) Verificar a existência e determinar os parâmetros termodinâmicos da interação química entre as proteínas Shc (<u>Src homology collagen-like</u>) e as proteínas glutationa S-transferase (GST) e ciclofilina A (CypA) por titulação calorimétrica isotérmica.
- 3-) Verificar a existência da interação por íons cálcio e magnésio da região Cterminal da proteína humana EFHC1 (EFHC1C) e avaliar o efeito nas características do termograma devido à presença na solução protéica do agente redutor 1,4-ditiotreitol (DTT).



### 3.1 - INSTRUMENTAÇÃO

### 3.1.1 - Calorímetro

Os experimentos foram realizados em um calorímetro de titulação isotérmica VP - ITC MicroCal Inc. (Northampton, Massachusetts, USA). A Figura 3.1 mostra o Módulo VP – ITC juntamente com um desenho de sua vista frontal.



Figura 3.1: Calorímetro de titulação isotérmica VP - ITC MicroCal. Fonte: Homepage do fabricante – MicroCal<sup>101</sup>.

O VP - ITC mede diretamente o calor liberado ou absorvido em amostras líquidas como resultado da mistura de duas quantidades conhecidas de reagentes. Ele é composto por um par de celas idênticas (Hastelloy ® Alloy C 276, 1,4 mL) com tubos de acesso longos e estreitos através dos quais referência e amostra são introduzidas e retiradas com o auxílio de seringas com agulha longa. Uma seringa que gira em torno do seu próprio eixo injeta e subseqüentemente mistura os reagentes na cela da amostra. A mistura dos reagentes ocorre devido ao formato helicoidal da extremidade da seringa<sup>102</sup>. A Figura 3.2 mostra a seringa e os detalhes da sua extremidade responsável pela mistura dos reagentes.



Figura 3.2: Seringa do calorímetro de titulação isotérmica VP - ITC MicroCal. No destaque: detalhe do formato helicoidal da extremidade da seringa que fica em contato com a amostra e é responsável pela mistura dos reagentes. Crédito fotográfico: Marciel Vilalta | AtualMídia - contato@atualmidia.com.br.

Durante um experimento, um circuito de autocompensação mantém nula a diferença de temperatura entre a cela da referência e a cela da amostra (calorímetro de compensação de calor). O calor liberado ou absorvido é proporcional à quantidade de reagente injetado<sup>103</sup>. A velocidade de rotação da seringa pode ser escolhida pelo usuário e varia entre 260 e 550 rpm. A faixa de temperatura de operação está entre 2 e 80 °C<sup>102</sup>. No sistema VP – ITC, o usuário determina os parâmetros experimentais: temperatura, agitação, número e volume das alíquotas de reagente injetadas, intervalo entre as adições, velocidade de injeção e a

sensibilidade de detecção. Um computador controla a execução do experimento de acordo com os dados fornecidos.

### 3.1.1.1 - Calibração do Calorímetro de Titulação Isotérmica

Calorímetros são normalmente calibrados com aquecedores elétricos (resistências), contudo, os valores obtidos da calibração podem não ser sempre representativos do processo químico ou biológico investigado. Deste modo, a calibração elétrica precisa ser verificada com processos padronizados de calibração química <sup>104</sup>. A calibração química usada no VP – ITC foi realizada pela medida da entalpia de diluição de uma solução aquosa contendo 1 % em massa de propan-1-ol (grau HPLC 99,8 % de pureza). Os resultados obtidos concordaram com o valor de referência apresentado na literatura <sup>104, 105</sup>, com desvio menor do que 2%.

### **3.2 – METODOLOGIAS**

### 3.2.1 - Caracterização Termodinâmica da S-nitrosação da N-acetil-L-cisteína, Cisteína, Glutationa e do Ácido Mercaptosuccínico por Titulação Calorimétrica Isotérmica

### 3.2.1.1 - Materiais

Foram utilizados neste trabalho NaNO<sub>2</sub> (Aldrich), L-cisteína (Sigma), Nacetil-L-cisteína (Sigma, mínimo 99%), L-glutationa reduzida (Sigma, mínimo 99%) e DL-ácido mercaptosuccínico (Acrós, 99%).

### 3.2.1.2 - Metodologia

### - Titulação Calorimétrica Isotérmica

#### Determinação da Entalpia de Diluição da Solução de Nitrito de Sódio

Tipicamente, 4  $\mu$ L de uma solução de nitrito de sódio 5,0 x 10<sup>-2</sup> mol L<sup>-1</sup> foi adicionada a 1,436 mL de água durante um intervalo de 8 s com intervalo entre injeções de 30 a 40 min para permitir o equilíbrio químico do sistema. O valor da entalpia de diluição da solução de nitrito de sódio em água foi subtraído dos valores das entalpias da curva de titulação relativa à S-nitrosação dos tióis antes do ajuste da curva para determinação dos parâmetros termodinâmicos da reação.

### Determinação dos Parâmetros Termodinâmicos das Reações de S-Nitrosação

Uma solução de nitrito de sódio  $1,2 \ge 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> foi usada como titulante. Na célula calorimétrica foram adicionadas as soluções de tiol preparadas pela dissolução da NAC ou Cys ou GLU ou AMS em uma solução de HCl 1,0 x  $10^{-1}$  mol L<sup>-1</sup>. O efeito da concentração de tiol nas características da curva de titulação calorimétrica e na qualidade do seu ajuste foram avaliados. Tipicamente, 3-5 µL de titulante foram adicionados durante 100 s com um intervalo entre injeções entre 30 a 40 min para permitir o equilíbrio químico do sistema. A solução de tiol na cela foi agitada com 300 rpm. A entalpia relativa aos processos da diluição da solução de nitrito de sódio e da formação das espécies nitrosantes foi subtraída dos valores da entalpia da titulação da solução do tiol. Os valores da entalpia de diluição de nitrito de sódio na mesma solução de HCl usada na preparação dos tióis. Nesta titulação foram mantidas as mesmas condições usadas na titulação dos tióis.

Os dados da entalpia *versus* razão molar foram ajustados pelo modelo de um sítio de interação através do software Origin fornecido pela MicroCal. A área dos picos foi ajustada manualmente. Após a subtração das entalpias de diluição e formação das espécies nitrosantes no mesmo pH da S-nitrosação dos tióis foi usado um algoritmo de mínimos quadrados não-linear para ajustar o fluxo de calor por alíquota de titulante adicionada as equações de equilíbrio químico e entalpia fornecendo os melhores valores de ajuste para a variação de entalpia e constante de equilíbrio da reação de S-nitrosação. A partir deste parâmetros, as variações da energia de Gibbs e entropia foram calculadas através das equações fundamentais da termodinâmica.

### Determinação dos Parâmetros Termodinâmicos da S-nitrosação da N-acetil-Lcisteína pelo Ácido Nitroso

1,436 mL de uma solução de NAC (6 x  $10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>) foi titulada com alíquotas de 4 µL de uma solução de nitrito de sódio (0,1 mol L<sup>-1</sup>) com intervalos entre adições de 80 min para permitir o equilíbrio químico do sistema. O pH da

solução de NAC foi determinado com pHmetro. Os dados da entalpia *versus* razão molar foram ajustados pelo modelo de um sítio de interação através do software Origin depois da subtração da entalpia de diluição do titulante e da formação do ácido nitroso em pH 3,0. Os valores da entalpia de diluição e formação do ácido nitroso foram obtidos pela titulação da solução de nitrito de sódio em solução HCl com pH 3,0.

### - Medidas Espectrofotométricas

O acompanhamento cinético da S-nitrosação dos tióis e da degradação dos nitrosotióis formados foram realizados a 25 °C em um espectrofotômetro HP8453 com arranjo de diodos e portador de cubeta com controle de temperatura. Tipicamente, 3,6 mL da solução de tiol  $(1,2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1})$  foram adicionados a uma cubeta de quatzo com caminho óptico de 1 cm e titulados com alíquotas de 10 µL de uma solução de nitrito de sódio 24,0 x 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> com intervalos de 40 min entre duas adições sucessivas sob agitação magnética. A solução de tiol foi preparada pela dissolução da NAC ou Cys ou GLU na mesma solução de HCl (1,0 x 10<sup>-1</sup> mol L<sup>-1</sup>) usada na preparação das soluções de tiol para os experimentos de calorimetria. A razão molar de cada adição da solução de nitrito de sódio à solução de tiol contida na cubeta foi a mesma usada na titulação calorimétrica. Foram obtidos espectros na faixa de 270 a 470 nm. O controle "branco" foi obtido contra o ar. As medidas cinéticas foram acompanhadas pelo monitoramento do aparecimento do nitrosotiol (RSNO) a 336 nm.

### 3.2.2 - Caracterização Termodinâmica da Interação entre as Proteínas SHC (SRC Homology Collagen Like) e Glutationa Stransferase por Titulação Calorimétrica Isotérmica

### 3.2.2.1 – Materiais e Métodos

## Transformação da Cepa de *Escherichia coli* Rosetta 2 com o Plasmídio pET28aShc

1 μL de solução do plasmídio pET-25a-(+)-Shc foi adicionado a 200 μL de células de *E. coli* Rosetta (Invitrogen) em um tubo *Eppendorf* de 1,0 mL. A dispersão de células foi deixada no gelo por 30 min. Após permanecer no gelo, o tubo *Eppendorf* foi colocado em banho termostatizado a 42 °C por 90 s e recolocado no gelo por 2 min. Após o que foram adicionados 800 μL de meio de cultura LB (1% de peptona, 0,5% de extrato de levedura e 0,5% de cloreto de sódio). As células foram, então, incubadas a 37 °C por 1 hora. O tubo contendo as células foi centrifugado (13000 rpm por 3 min) e a fase líquida descartada. As células foram, então, redispersas em 100 μL de meio de cultura LB e 50 μL do líquido foram usados para semear uma placa contendo meio de cultura sólido. A incubação foi realizada por 16 h a 37 °C.

### Expressão e Purificação da Proteína p52-Shc

Uma colônia isolada da cepa de *Escherichia coli* Rosetta 2 (Novagen) transformada com o plasmídio pET28aShc foi inoculada em uma pré-cultura de 10 mL por 16 h a 37 °C a 200 rpm. O pré-inóculo foi adicionado a 1 L de meio de cultura LB (1% de peptona, 0,5% de extrato de levedura e 0,5% de cloreto de sódio) contendo 50 µg/mL de cloranfenicol e 50 µg/mL canamicina. O crescimento da cultura foi realizado a 30 °C em agitador tipo *shaker* com agitação de 100 rpm

até o meio de cultura alcançar densidade óptica de 0,8 medida em 600 nm. A expressão da Shc foi induzida pela adição de isopropil tio- $\beta$ -D-galactosídeo (IPTG) ao meio de cultura até a concentração final de 0,75 mM. A cultura foi deixada crescer por 4 a 5 horas depois da adição do IPTG. As células foram separadas da fase líquida pela centrifugação do meio de cultura a 5000 rpm por 20 min a 4 °C e armazenadas a -20 °C.

Para purificação da Shc foram usadas células coletadas de quatro litros de meio de cultura. As células foram descongeladas em gelo e, em seguida, dispersas em 100 mL de tampão pH 8,0 contendo 50 mM Tris, 200 mM NaCl, 10% (V/V) glicerol e 1 mM dos inibidores de protease AEBSF, E64 e benzamidina. A ruptura das células foi realizada em sonicador Soniprep 150 MSE (10 ciclos: 10 s ligado / 50 s desligado) e os fragmentos das células removidos por centrifugação a 20000 rpm por 40 min a 4 °C.

Todos os procedimentos para purificação da Shc foram realizadas a 4 °C em um sistema cromatográfico FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) Amersham Pharmacia Biotech ÄKTA. O líquido sobrenadante contendo a proteína foi injetado numa coluna contendo 20 mL de resina Talon equilibrada com tampão A (50 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 8 e 0,1 mM dos inibidores de protease citados acima). A resina foi lavada com 200 mL do tampão A contendo 10 mM de imidazol. As frações contendo Shc foram recolhidas e aplicadas diretamente numa coluna Q-Sepharose de troca aniônica. A resina foi então lavada com 10 volumes de coluna de tampão A e eluída com a aplicação de um gradiente de NaCl de 100 mM a 500 mM em 11 volumes de coluna. A proteína Shc foi eluída a 290 mM de NaCl. As frações contendo Shc foram coletadas e concentradas em concentradores Millipore até o volume de 5 mL. Em seguida, a solução de Shc foi injetada em uma coluna de gel filtração Superdex 70 equilibrada com 50 mM Tris, 200 mM NaCl e 1 mM DTT (pH 8.0). As frações da proteína foram coletadas e estocadas a 4 °C. A quantidade de Shc purificada variou entre 2 e 5 mg por litro de cultura.

#### Expressão e Purificação da Proteína GSTT1-1

Uma cultura de pQE30 transformada em células hospedeiras de *E. coli* M15[pREP4] cresceu a 37 °C em meio de cultura LB (1% de peptona, 0,5% de extrato de levedura e 0,5% de cloreto de sódio) contendo 100  $\mu$ L/mL ampicilina e 25  $\mu$ L/mL canamicina até alcançar densidade óptica entre 0,8 e 0,9 em 600 nm. A expressão da GSTT1-1 foi induzida pela adição de isopropil tio- $\beta$ -D-galactosídeo (IPTG) até a concentração final de 0,1 mM. A cultura foi deixada crescer a 37 °C por 16 horas depois da adição do IPTG. As células foram separadas da fase líquida pela centrifugação do meio de cultura a 5000 rpm por 20 min a 4 °C e armazenadas a -20 °C.

Para extração das proteínas, as células foram descongeladas em gelo e, em seguida, dispersas em 100 mL de tampão pH 8 contendo 50 mM Tris, 200 mM NaCl, 10% (V/V) glicerol e 1 mM dos inibidores de protease AEBSF, E64 e benzamidina. A ruptura das células foi realizada com sonicador Soniprep 150 MSE (10 ciclos: 10 s ligado / 50 s desligado) e os fragmentos das células removidos por centrifugação a 20000 rpm por 40 min a 4 °C.

Os procedimentos para purificação da GSTT1-1 foram realizados a 4 °C em um sistema cromatográfico FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) ÄKTA Prime (Pharmacia). O líquido sobrenadante contendo a proteína foi injetado numa coluna contendo 20 mL de resina Talon equilibrada com tampão A (50 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 8 e 0.1 mM dos inibidores de protease citados acima). A resina foi lavada com 200 mL do tampão A contendo 10 mM de imidazol. As frações contendo GSTT1-1 foram coletadas e concentradas até o volume de 5 mL com o auxílio de um concentrador Millipore. A solução foi, então, injetada em uma coluna de gel filtração Superdex 70 equilibrada com tampão pH 8,0 contendo 50 mM Tris, 200 mM NaCl e 1 mM DTT. As frações contendo GSTT1-1 foram coletadas e avaliadas quanto a sua pureza em gel de SDS-PAGE.

49

### Determinação da Concentração das Soluções de Proteína

Os valores de concentração das soluções de proteína foram determinados num espectrofotômetro Cary UV. Os coeficientes de extinção molar a 280 nm usados foram 35135 mol L<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> e 41160 mol L<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> para Shc<sup>106</sup> e GSTT1-1<sup>107</sup>, respectivamente.

#### Titulação Calorimétrica Isotérmica

As titulações calorimétricas foram realizadas a 15 e 30 °C em um calorímetro VP-ITC (MicroCal). 1,463 mL de uma solução 18  $\mu$ M de Shc foi titulada com uma solução 120  $\mu$ M de GSTT1-1. Ambas as proteínas foram preparadas em tampão pH 8,0 contendo 50 mM Tris, 200 mM NaCl e 1 mM DTT. Tipicamente, 20 x 15  $\mu$ L de GSTT1-1 foram injetados durante um período de 30 s (período para cada injeção) em uma solução de Shc. O intervalo de tempo entre as injeções foi de 240 a 360 s. Foi realizada a titulação da solução de GSTT1-1 em tampão para determinação da sua entalpia de diluição. O valor obtido foi comparado aos valores de entalpia obtidos para a titulação da solução de GSTT1-1 na solução de Shc.

### 3.2.3 - Caracterização Termodinâmica da Interação entre as Proteínas SHC (SRC Homology Collagen Like) e Ciclofilina A (CYPA) por Titulação Calorimétrica Isotérmica

### 3.2.3.1 – Materiais e Métodos

#### Expressão e Purificação da Proteína p52Shc

A proteína Shc foi expressa e purificada conforme procedimento previamente descrito no item 3.2.2.1.

#### Expressão e Purificação da Proteína CypA

Uma colônia isolada da cepa de *Escherichia coli* Rosetta 2 ou BL21(DE3) (Novagen) transformadas com o plasmídio pET3aCypA foi inoculada em uma précultura de 10 mL por 16 h a 37 °C a 200 rpm. O pré-inóculo foi adicionado a 1 L de meio de cultura LB (1% de peptona, 0,5% de extrato de levedura e 0,5% de cloreto de sódio) contendo 50 µg/mL de cloranfenicol e 250 µg/mL carbenicilina até alcançar densidade óptica entre 0,8 e 0,9 em 600 nm. A expressão da CypA foi induzida pela adição de isopropil tio- $\beta$ -D-galactosídeo (IPTG) até a concentração final de 0,1 mM. A cultura foi deixada crescer a 37 °C por 16 horas depois da adição do IPTG. As células foram separadas da fase líquida pela centrifugação do meio de cultura a 5000 rpm por 20 mim a 4 °C e armazenadas a -20 °C.

Para extração das proteínas, as células foram descongeladas em gelo e, em seguida, dispersas em 100 mL de tampão pH 8 contendo 50 mM Tris, 200 mM NaCl, 10% (V/V) glicerol e 1 mM dos inibidores de protease AEBSF, E64 e benzamidine. A ruptura das células foi realizada com sonicador Soniprep 150 MSE (10 ciclos: 10 s ligado / 50 s desligado) e os fragmentos das células removidos por centrifugação a 20000 rpm por 40 min a 4 °C.

Os procedimentos para purificação da CypA foram realizados a 4 °C em um sistema cromatográfico FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) ÅKTA Prime (Pharmacia). O líquido sobrenadante contendo a proteína foi injetado numa coluna contendo 20 mL de resina Talon equilibrada com tampão A (50 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 8 e 0.1 mM dos inibidores de protease citados acima). A resina foi lavada com 200 mL do tampão A contendo 10 mM de imidazol. As frações contendo CypA foram coletadas e concentradas até o volume de 5 mL com o auxílio de um concentrador Millipore. A solução foi, então, injetada em uma coluna de gel filtração Superdex 70 equilibrada com tampão pH 8,0 contendo 50 mM Tris, 200 mM NaCl e 1 mM DTT. As frações contendo CypA foram coletadas e avaliadas quanto a sua pureza em gel de SDS-PAGE.

#### Determinação da Concentração das Soluções de Proteína

Os valores de concentração das soluções de proteína foram determinados num espectrofotômetro Cary UV. Os coeficientes de extinção molar a 280 nm usados foram 35135 mol L<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> e 8730 mol L<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> para Shc<sup>106</sup> e CypA<sup>108</sup>, respectivamente.

### Titulação Calorimétrica Isotérmica

As titulações calorimétricas foram realizadas a 6, 15 e 20 °C em um calorímetro VP-ITC (MicroCal). 1,463 mL de uma solução 10  $\mu$ M de Shc foi titulada com uma solução 97  $\mu$ M de CypA. Tipicamente, 20 x 15  $\mu$ L (exceções são indicadas) de CypA foram injetados num período de 30 s na solução de Shc. O intervalo de tempo entre as injeções foi de 180 s. Foi realizada a titulação da solução de CypA em tampão para determinação da sua entalpia de diluição. O valor obtido foi comparado aos valores de entalpia obtidos para a titulação da solução de CypA na solução de Shc.

### 3.2.4 - Caracterização Termodinâmica da Interação da Proteína EFHC1 com Íons Cálcio e Magnésio usando Titulação Calorimétrica Isotérmica

Os materiais, métodos, resultados e discussões desta parte do trabalho serão apresentadas conjuntamente na forma de artigo no item 4.3.



### 4.1 - CARACTERIZAÇÃO TERMODINÂMICA DA S-NITROSAÇÃO DA N-ACETIL-L-CISTEÍNA, L-CISTEÍNA, L-GLUTATIONA E ÁCIDO MERCAPTOSUCCÍNICO POR TITULAÇÃO CALORIMÉTRICA ISOTÉRMICA

### 4.1.1 – Considerações Iniciais

Nos últimos vinte anos verificou-se um crescimento surpreendente nas pesquisas que tomam o óxido nítrico como objeto de estudo. A descoberta em 1986/1987 de que células vasculares endoteliais são capazes de sintetizar NO a partir da L-arginina através da ação catalisadora da enzima óxido nítrico sintase (NOS) conduziu a um desenvolvimento admirável das pesquisas nesta área. Através destas investigações verificou-se que o óxido nítrico está envolvido em muitos processos fisiológicos no homem, que incluem neurotransmissão, controle da pressão sanguínea, coagulação do sangue e participação na capacidade do sistema imunológico de destruir células tumorais e parasitas intracelulares<sup>109</sup> Conseqüentemente, uma grande variedade de estados patológicos pode estar relacionada com um baixo ou alto nível de óxido nítrico no organismo, por exemplo, problemas cardiovasculares e cerebrais, doenças inflamatórias e infecciosas<sup>110</sup>. Devido à sua importância na biologia, a molécula de óxido nítrico

Contudo, pode-se deduzir que o óxido nítrico como um radical livre não exista em grande quantidade em meio fisiológico. Ele reage com oxigênio, superóxidos e com átomos de ferro de grupos heme e não-heme. Por este motivo, tem sido proposto que o NO liga-se a certas moléculas carregadoras que prolongam sua meia-vida e preservam sua atividade biológica<sup>112</sup>. Os candidatos mais plausíveis para desempenhar este papel são tióis com baixa massa molar, tais como

57

a cisteína (Cys) e a glutationa (GSH) que podem formar S-nitrosotióis (RSNOs). Acredita-se que os RSNOs estejam envolvidos no armazenamento, transporte e liberação de NO em meio fisiológico. Eles foram detectados no muco das vias respiratórios, em plaquetas e neutrófilos<sup>113</sup> e são vasodilatadores e inibidores da agregação plaquetária<sup>114</sup>. Estas funções dos RSNOs são comumente atribuídas a liberação de NO, embora alguns resultados sugiram que eles possam agir diretamente<sup>115,116</sup>.

A síntese de S-nitrosotióis é comumente realizada pela nitrosação de tióis por agentes nitrosantes tais como o ácido nitroso. Para isto, mistura-se uma solução de tiol a uma solução contendo o agente nitrosante. No caso do ácido nitroso, ele é produzido *in situ* pela adição de nitrito, geralmente nitrito de sódio, a uma solução aquosa de ácido clorídrico. A Equação 1 mostra a formação do ácido nitroso.

$$NO_2 + H_3O^+ = HNO_2 + H_2O$$
 (1)

Outros agentes nitrosantes podem ser formados pela presença de íons nitrito em meio ácido e a concentração de cada um destes agentes depende da concentração de íons H<sup>+</sup> na solução. De fato, estudos têm mostrado que várias reações de nitrosação ocorrem pela ação do cátion nitrosônio (H<sub>2</sub>O-NO<sup>+</sup>) como o agente nitrosante ao invés do ácido nitroso em condições extremamente ácidas<sup>117,118</sup>. A formação do cátion nitrosônio é mostrada pela Equação 2.

HONO + 
$$H_3O^+$$
  $\longrightarrow$   $H_2ONO^+$  +  $H_2O$  (2)

Os parâmetros cinéticos das reações de S-nitrosação estão bem descritos na literatura<sup>119,120</sup>, contudo, existem poucos estudos que relatam os parâmetros termodinâmicos desta classe de reações, em parte devido aos valores elevados das constantes de formação envolvidas (aproximadamente 10<sup>5</sup>). Beloso e Williams<sup>121</sup> descrevem um método para determinar a constante de equilíbrio da nitrosação do

ácido mercaptosuccínico e da cisteína, contudo, os resultados obtidos apresentam uma grande incerteza devido a oxidação rápida do tiol residual. Ademais, os valores das variações de entalpia e entropia desta classe de reações não foram encontrados na literatura consultada. Neste aspecto, este trabalho relata uma metodologia para determinar através da técnica de titulação calorimétrica isotérmica (ITC) as variações da energia de Gibbs, entalpia e entropia da Snitrosação da N-acetil-L-cisteína (NAC), L-cisteína (Cys), L-glutationa (GLU) e ácido mercaptosuccínico (AMS) pela ação de espécies nitrosantes formadas a partir da reação de íons nitrito em meio aquoso ácido. Foram realizados experimentos cinéticos da S-nitrosação dos mesmos tióis usados nos experimentos calorimétricos e da degradação dos RSNOs sintetizados.

### 4.1.2. - Resultados e Discussão

### - Titulação Calorimétrica Isotérmica

#### Determinação da Entalpia de Diluição da Solução de Nitrito de Sódio

O valor da contribuição entálpica devido exclusivamente à diluição da solução de nitrito de sódio foi de -  $0,18 \pm 0,03$  kJ mol<sup>-1</sup>. Este valor concorda com o valor descrito na literatura (- 0,20 kJ mol<sup>-1</sup>)<sup>122</sup> e representa uma contribuição pequena comparada aos valores das entalpias relativas à S-nitrosação dos tióis estudados.

#### Determinação dos Parâmetros Termodinâmicos das Reações de S-Nitrosação

As estruturas químicas dos tióis usados neste trabalho estão representadas na Figura 4.1.



Figura 4.1: Estrutura química dos tióis usados nos experimentos calorimétricos e espectrofotométricos: NAC = N-acetil-L-cisteína, CYS = L-cisteína, GSH = L-glutationa e AMS = DL-ácido mercaptosuccímico.

A Figura 4.2 apresenta os termogramas típicos da titulação com solução de nitrito de sódio para soluções de tiol com concentrações entre 0,05 - 0,5 mM em pH 1 a 25 °C.



Figura 4.2: Termogramas típicos da titulação calorimétrica isotérmica com solução de nitrito de sódio da N-acetil-L-cisteína (A), L-glutationa (B), L-cisteína (C) e ácido mercaptosuccínico (D) com concentrações entre 0,05 - 0,5 mM em pH 1 a 25 °C.

A Figura 4.3 apresenta os termogramas típicos da titulação com solução de nitrito de sódio das soluções de tiol com concentração de 24 mM em pH 1 a 25 °C.



Figura 4.3: Termogramas típicos da titulação calorimétrica isotérmica com solução de nitrito de sódio da N-acetil-L-cisteína (A), L-glutationa (B) e L-cisteína (C) 24 mM em pH 1 a 25 °C.

O sinal térmico total detectado na cela calorimétrica após cada adição da solução de nitrito de sódio à solução de tiol pode ser atribuído a três processos principais, a saber:

- 1) diluição da solução de nitrito de sódio,  $\Delta_{dil}H_{NaNO}$ ;
- 2) formação do ácido nitroso e cátion nitrosônio conforme as Equações 1 e 2;
- S-nitrosação do grupo tiol pelo ácido nitroso e cátion nitrosônio conforme apresentado pelas Equações 3 e 4.

$$RSH + HNO_2 \xrightarrow{H_3O^+} RSNO + H_2O$$
(3)

$$RSH + H_2ONO^+ \longrightarrow RSNO + H_3O^+$$
(4)

A contribuição térmica da diluição e da formação das espécies nitrosantes foi subtraída do sinal térmico total obtido na titulação da solução de tiol. Destaca-se, contudo, que em alguns casos esta contribuição não correspondia ao valor médio das entalpias após a saturação. Nestes casos, o valor médio das entalpias dos sinais térmicos após a saturação foi subtraído do sinal térmico total obtido na titulação da solução de tiol.

A formação do trióxido de dinitrogênio  $(N_2O_3)$  e a N-nitrosação da NAC, GLU, Cys e AMS foram avaliadas na análise dos resultados. Outras contribuições térmicas não foram consideradas significativas no sinal térmico total obtido nos experimentos para determinação dos parâmetros significativos da S-nitrosação dos tióis estudados.

O trióxido de dinitrogênio é uma espécie nitrosante que existe em solução aquosa em equilíbrio com o ácido nitroso, Equação 5.
$$2 \text{ HNO}_2 \implies N_2 O_3 + H_2 O \tag{5}$$

Contudo, a contribuição térmica atribuída a este processo foi desprezada uma vez que o valor da constante de equilíbrio da formação do  $N_2O_3$  é 3,0 x  $10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>

A contribuição térmica relativa à N-nitrosação também não foi considerada significativa em relação ao sinal térmico total obtido durante a titulação dos tióis estudados pelo fato da S-nitrosação ser mais favorável cineticamente (como esperado pela maior nucleofilicidade do enxofre). Trabalhos na literatura propõe que reações de S-nitrosação sejam tão favoráveis que sua velocidade seja controlada por difusão. Um dado que coopera para isto é o fato dos valores das constantes cinéticas da S-nitrosação de tióis com estruturas químicas diversas, incluindo a NAC, GSH e Cys, se encontrarem numa faixa bastante estreita de valores (1,0 a 2,7 x 10<sup>3</sup> dm<sup>6</sup> mol<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>)<sup>119</sup>. Outros experimentos descritos na literatura mostram a ocorrência preferencial da S-nitrosação de aminotióis em relação a sua N-nitrosação. Recentemente, Chipinda e Simoyi<sup>124</sup> verificaram que a formação de nitrosaminas a partir da reação entre a N-acetilpenicilamina e o ácido nitroso mão é significativa, mesmo com o excesso deste agente nitrosante. Ademais, o ácido nitroso em solução aquosa não é um reagente adequada para N-nitrosação de amidas<sup>125</sup>.

Os valores de K,  $\Delta G$ ,  $\Delta H$  e  $T\Delta S$  das reações de S-nitrosação obtidos para diferentes concentrações de NAC, GLU, Cys e AMS são apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Parâmetros termodinâmicos da S-nitrosação da N-acetil-L-cisteína (NAC), L-glutationa (GLU), L-cisteína (Cys) e ácido mercaptosuccínio (AMS) a  $25 \,^{\circ}$ C e pH 1,0 (n = 5).

Tiol	[R-SH] (mM)	N	K	Δ <b>G<sub>obs</sub></b> (kJ mol <sup>-1</sup> )	<b>ΔH<sub>obs</sub></b> (kJ mol <sup>-1</sup> )	<b>T∆S<sub>obs</sub></b> (kJ mol <sup>-1</sup> )
NAC	24	1,0	$5 \pm 1 \ge 10^{6}$	$-38,2 \pm 0,7$	$-65,2\pm0,3$	$-24 \pm 1$
	0,05	1,0	$3,2 \pm 0,5 \ge 10^6$	$-37,1\pm0,4$	-71,6 ±0,7	34 ± 1
GLU	24	0,99	$2,5 \pm 0,1 \ge 10^6$	$-36,5 \pm 0,1$	$-62,0\pm0,8$	- 25 ± 1
	0,5	0,99	$5,5 \pm 0,7 \ge 10^6$	$-38,5 \pm 0,4$	- 64 ± 1	- 25 ± 1
Cys	24	1,0	$3,5 \pm 0,9 \ge 10^6$	- 37,3 ± 0,9	$-60 \pm 2$	- 23 ± 4
	0,05	1,0	$0,3 \pm 0,1 \ge 10^6$	$-31,3 \pm 0,9$	- 70 ± 9	$-39 \pm 10$
AMS	0,5	1,0	$1,6 \pm 0,2 \ge 10^6$	$-35,4\pm0,3$	$-65,1\pm0,4$	- 29,7 ± 0,7

A redução da concentração dos tióis forneceu curvas com maior número de pontos na região da inflexão conforme pode ser observado pela comparação entre os gráficos mostrados pelas Figuras 4.2 e 4.3. De acordo com a Eq. 6, o valor do fator c diminui com a concentração de sítios de interação do titulado, M.

$$\boldsymbol{c} = \boldsymbol{K}_{\boldsymbol{a}}[\boldsymbol{M}]_{\boldsymbol{tot}} \qquad (6)$$

Valores do fator  $\mathbf{c}$  entre 10 e 500 resultam curvas cujo ajuste fornece valores confiáveis para a constante de equilíbrio<sup>126</sup>. Deste modo, a diminuição da concentração do titulado e, conseqüentemente, do valor do fator  $\mathbf{c}$ , constituiu uma estratégia adequada para melhorar a qualidade dos dados calorimétricos. Destaca-

se, contudo, que os valores de entalpia medidos em concentrações de tiol menores apresentaram desvios padrão maiores do que aqueles medidos em concentrações maiores devido, provavelmente, aos menores calores envolvidos em cada adição da solução de nitrito à solução de tiol. Quanto mais alto é a relação sinal-ruído, menor é o efeito do ruído de fundo sobre a detecção ou medição do sinal.

Os valores da variação de entalpia revelam que a S-nitrosação é um fenômeno exotérmico. Uma vez que a variação de entropia da reação é negativa, conclui-se que o processo é entalpicamente dirigido. Swientoslawski<sup>127</sup> determinou o valor de - 78,83 kJ mol<sup>-1</sup> e - 62,84 kJ mol<sup>-1</sup> para a variação de entalpia da N-nitrosação da N-etilfenilamina e da difenilamina (aminas secundárias) usando ácido nitroso, valores semelhantes encontrados para a entalpia da S-nitrosação dos tióis estudados. As constantes de equilíbrio da S-nitrosação da cisteína e do ácido mercaptosuccínico determinados por calorimetria foram menores do que os valores obtidos por Beloso e Williams (K = 0,6 x 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup> e 3 x 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>, respectivamente)<sup>121</sup> através do método espectrofotométrico. Interessante notar também que a cisteína apresenta constante de equilíbrio menor quando comparada a sua forma acetilada. O mesmo comportamento é observado entre as constantes de equilíbrio da nitrosação da penicilamina e N-acetil penicilamina (0,3 x 10<sup>6</sup> e 70 x 10<sup>6</sup>, respectivamente)<sup>125</sup>.

# Determinação do $pK_a$ do Ácido Nitroso e dos Parâmetros Termodinâmicos da S-nitrosação da N-acetil-L-cisteína pelo Ácido Nitroso

Em pH 1,0, a nitrosação dos tióis ocorre devido sua reação com o ácido nitroso e cátion nitrosônio e, por esta razão, os parâmetros termodinâmicos foram expressos como valores observados (**obs**) na Tabela 4.1. Riordan e colaboradores<sup>128</sup> verificaram que o ácido nitroso predomina em relação ao cátion nitrosônio em pH 3,0 em uma solução contendo íons nitrito em meio ácido. A

Figura 4.4 apresenta a fração molar do ácido nitroso, nitrito e cátion nitrosônio presentes em solução em função do pH.



Figura 4.4: Fração molar do ácido nitroso, nitrito e cátion nitrosônio presentes em solução em função do pH (adaptado da referência 18).

Deste modo, a S-nitrosação da NAC foi realizada em pH 3 para determinação dos parâmetros termodinâmicos da sua reação com o ácido nitroso. A Figura 4.5 mostra um termograma típico da titulação calorimétrica da NAC em pH 3,0.



Figura 4.5: Termograma típico da titulação calorimétrica isotérmica com solução de nitrito de sódio da N-acetil-L-cisteína em pH 3,0 a 25 °C.

Os valores de N, K,  $\Delta G$ ,  $\Delta H$  e  $T\Delta S$  da S-nitrosação da NAC pelo ácido nitroso são apresentados na Tabela 4.2.

[R-SH]  $\Delta_r G$  $\Delta_r H$  $T\Delta_r S$ N K Tiol (mM) $(kJ mol^{-1})$  $(kJ mol^{-1})$  $(kJ mol^{-1})$ NAC  $9 \pm 4 \ge 10^4$ 6  $0,66 \pm 0,03$  $-28 \pm 2$ - 77 ± 1  $-49 \pm 4$ 

Tabela 4.2: Parâmetros termodinâmicos da S-nitrosação da N-acetil-L-cisteína (NAC) a 25 °C e pH 3,0 (n = 5).

Os dados apresentados pela Tabela 4.2 permitem verificar que a S-nitrosação da NAC pelo ácido nitroso em pH 3,0 é menos favorável do que em pH 1,0 apesar de ser mais exotérmica. Ademais, pode-se concluir que o número estequiométrico, N, representa a fração de íons nitrito convertido em ácido nitroso, isto é,  $HNO_2/NO_2$ . Para isto, deve-se considerar que o valor de N foi calculado a partir da razão do número de moles de íons nitrito (titulante) pelo número de moles de tiol contido na cela calorimétrica. O valor de N permite estimar o valor do  $pK_a$  do ácido nitroso uma vez que  $pK_a = pH + log [HNO_2] / [NO_2]$ . Para este cálculo o **pH** foi considerado praticamente constante e igual a 3,0. O valor obtido (2,82 ± 0,03) concorda com o valor determinado pelo método espectrofotométrico recentemente reavaliado por Riordan e colaboradores  $(\boldsymbol{pK_a} = 2,8 \pm 0,1)^{128}$ . Deve-se destacar que a determinação do  $pK_a$  do ácido nitroso pelo método espectrofotométrico é difícil devido às dificuldades encontradas na determinação quantitativa das espécies envolvidas. Por esta razão, os valores do  $pK_a$  do ácido nitroso encontrados na literatura variam entre 2,3 e 5,22129. Os experimentos conduzidos por Riordan e colaboradores<sup>128</sup> permitiram determinar a quantidade de ácido nitroso em solução com maior exatidão e, conseqüentemente, o  $pK_a$  do ácido nitroso.

### - Medidas Espectrofotométricas

Experimentos para avaliar a estabilidade dos RSNOs sintetizados durante a titulação calorimétrica mostraram que nas condições experimentais utilizadas suas degradações não são significativas. As Figuras 4.6, 4.7 e 4.8 mostram o acompanhamento cinético da S-nitrosação dos tióis e da degradação dos nitrosotióis formados. Uma fração da solução ácida do tiol presente na cubeta é convertida em nitrosotiol após cada adição de uma alíquota de uma solução de nitrito de sódio. As medidas cinéticas foram acompanhadas pelo monitoramento do aparecimento do nitrosotiol a 336 nm.



Figura 4.6: Controle espectrofotométrico da decomposição da S-nitroso-N-acetil-Lcisteína em pH = 1 a 25 °C. O gráfico inserto apresenta a curva cinética de todo período avaliado para décima terceira adição de íons nitrito à cubeta.



Figura 4.7: Controle espectrofotométrico da decomposição da L-glutationa em pH = 1 a 25 °C. O gráfico inserto apresenta a curva cinética de todo período avaliado para décima terceira adição de íons nitrito à cubeta.



Figura 4.8: Controle espectrofotométrico da decomposição da L-cisteína em pH = 1 a 25 °C. O gráfico inserto apresenta a curva cinética de todo período avaliado para décima segunda adição de íons nitrito à cubeta.

A Figura 4.9 apresenta curva de absorção espectrofotométrica completa dos nitrosotióis formados. Praticamente todo tiol foi convertido em S-nitrosotiol após um período de 500 s.



Figura 4.9: Curva de absorção espectrofotométrica completa da S-nitrosação e da degradação dos nitrosotióis formados a 25 °C e pH 1.

A estabilidade dos RSNOs sintetizados durante a titulação calorimétrica revelou-se também no valor estável da linha base do termograma embora uma inclinação pequena tenha sido observada após a saturação, Figura 4.10.



Figura 4.10: Indicação da mudança no valor da linha base após a saturação em um experimento de titulação calorimétrica isotérmica.

Estes dados concordam com os valores obtidos por Grossi e colaboradores<sup>117</sup> que mostram que a S-nitrosocisteína não sofre degradação significativa em pH 1,5 por várias horas.

### 4.1.4 - Conclusão

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que a titulação calorimétrica isotérmica é uma técnica adequada e precisa para a determinação experimental dos parâmetros termodinâmicos da S-nitrosação da N-acetil-L-cisteína, L-cisteína e L-glutationa. Os valores da variação de entalpia revelaram que a S-nitrosação é um fenômeno exotérmico e como a variação de entropia é negativa a reação é entalpicamente dirigida nas condições em que foi estudada. O valor do  $pK_a$  do

ácido nitroso estimado por calorimetria correspondeu aquele determinado por espectrofotometria.

# 4.2 - CARACTERIZAÇÃO TERMODINÂMICA DE INTERAÇÕES PROTÉICAS

### 4.2.1 - Considerações Iniciais

Os resultados apresentados nesta parte do trabalho foram obtidos durante um estágio realizado no laboratório do Prof. Dr. John E. Ladbury do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da instituição *University College London*, Londres, Reino Unido. A expressão e purificação de proteínas heterólogas através de técnicas de biologia molecular e a caracterização termodinâmica da interação entre proteínas sinalizadoras por meio de calorimetria de titulação isotérmica foram as principais atividades realizadas durante o estágio.

O estágio possibilitou também o aprofundamento teórico de como parâmetros termodinâmicos relacionam-se aos aspectos estruturais na formação de complexos de importância biológica. O conhecimento desta relação ocupa um papel central em bioquímica uma vez que a determinação da estrutura de complexos moleculares presentes em organismos vivos fornece pouca informação sobre os componentes energéticos envolvidos na sua formação e dados termodinâmicos isolados são pouco proveitosos sem o conhecimento de informações estruturais. O modo como parâmetros termodinâmicos relacionam-se aos aspectos estruturais em um sistema biológico pode ser investigado através do uso conjunto de técnicas como titulação calorimétrica isotérmica (ITC), dicroísmo circular (CD), ressonância magnética nuclear (RMN) e de métodos baseados em biologia molecular.

Fazem parte da caracterização termodinâmica de interações protéicas neste trabalho a caracterização da interação entre a proteína sinalizadora Shc (<u>Src</u><u>homology</u> <u>c</u>ollagen-like) e a proteína glutationa S-transferase (GST) e a caracterização da interação entre a Shc e a proteína ciclofilina A (CypA).

75

### Sinalização Celular

A habilidade que as células possuem em perceber e responder ao seu ambiente é fundamental para o crescimento, reparação e outras funções de homeostasia nos tecidos. As células animais, por exemplo, trocam informações sobre a concentração de íons e glicose nos fluidos extracelulares e as células vegetais respondem aos hormônios de crescimento e às variações da luz solar. Em todos esses casos, um sinal representa uma informação que é detectada por receptores específicos e convertida em uma resposta celular que sempre envolve um processo químico. Essa conversão da informação em uma alteração química, a transdução de sinal, é uma propriedade universal das células vivas<sup>130 (a)</sup>.

Freqüentemente, o resultado final de uma via de sinalização é a fosforilação de poucas proteínas específicas das células-alvo. A fosforilação reversível dos resíduos de tirosina, serina e treonina nas proteínas sinalizadoras gera sítios de ancoragem para outras proteínas. Muitas proteínas sinalizadoras são multivalentes, o que as tornam capazes de interagir simultaneamente com várias proteínas diferentes para formar complexos multiprotéicos de sinalização<sup>130 (b)</sup>.

### **Receptores de Sinais Celulares**

As células recebem informação do ambiente através de uma classe de proteínas denominada receptores. As moléculas que ativam os receptores (ou em alguns casos, inibem) podem ser classificadas como hormônios, neurotransmissores, citocinas ou fatores de crescimento, mas todas elas são chamadas de ligantes de receptores. Os detalhes da interação receptor-ligante são essenciais no processo de sinalização celular<sup>130 (c)</sup>.

76

### Introdução à Metodologia do DNA Recombinante

### **Clonagem molecular**

A técnica central da metodologia do DNA recombinante é a clonagem molecular, a qual consiste no isolamento e propagação de moléculas de DNA idênticas <sup>131</sup>. Em geral, a clonagem molecular compreende dois estágios importantes:

i) a ligação de um fragmento de DNA de interesse, denominado inserto, a uma outra molécula de DNA, denominada vetor, a fim de formar uma terceira molécula, o DNA recombinante;

ii) a molécula do DNA recombinante é introduzida numa célula hospedeira compatível, geralmente a bactéria *Escherichia coli*, num processo chamado de transformação. A célula hospedeira que adquiriu a molécula do DNA recombinante é agora chamada de transformante ou célula transformada. Um único transformante pode sofrer muitos ciclos de divisão celular e produzir uma colônia com milhares de cópias do DNA recombinante.

### Vetores de Clonagem

Após o isolamento de uma informação genética, os fragmentos de DNA obtidos pela clivagem com enzimas de restrição devem ser inseridos numa outra molécula de DNA capaz de replicar esta informação genética em um grande número de cópias. Enzimas de restrição reconhecem seqüências nucleotídicas específicas de 4 a 8 pares de base em uma molécula de DNA (fita dupla) e cortam ambas as fitas da hélice, em lugares determinados. O processo de ampliação (replicação) é obtido através do uso de moléculas de DNA chamadas de vetores de clonagem molecular.

Vetores de clonagem são pequenas moléculas de DNA dupla fita contendo os elementos necessários para a sua replicação e pelo menos um gene marcador que confere resistência a antibiótico. Estas moléculas variam entre 5 a 400 quilobases e comumente estão presentes em duas ou mais cópias por célula. Os vetores de clonagem mais utilizados normalmente são os plasmídios de bactérias – moléculas de DNA circular existentes nesses microorganismos, fora dos seus cromossomos e capazes de se replicar de modo independente. A técnica de DNA recombinante tem um interesse especial se uma das suas fontes de DNA clivado for um plasmídio, justamente pelo seu potencial de replicação independente.

Muitos vetores de clonagem carregam genes que conferem resistência a diversos antibióticos tais como ampicilina, tetraciclina e canamicina<sup>131</sup>. As células transformadas com tais vetores são capazes de crescer num meio contendo o antibiótico, enquanto que as células não transformadas morrem.

#### Transformação Bacteriana

Atualmente, a transformação bacteriana constitui uma técnica rotineira nos laboratórios de biologia molecular. O objetivo desta técnica é introduzir um plasmídio exógeno dentro da bactéria e usar esta célula hospedeira para amplificálo, isto é, conseguir uma grande quantidade deste material genético. A eficiência da transformação é geralmente expressa como o número de células transformadas obtidas a partir de um micrograma de DNA plasmidial intacto.

Moléculas de DNA, por serem hidrofílicas, normalmente não atravessam a membrana celular de bactérias. Deste modo, é necessário propiciar condições que permitam que estas moléculas sejam incorporadas pelas bactérias. Diz-se que é necessário tornar as bactérias "competentes" para que as mesmas consigam incorporar moléculas de DNA. Para isto, são gerados orifícios na célula bacteriana dispersando-as em uma solução com alta concentração de cálcio. O DNA pode,

78

então, ser inserido no interior das células por choque térmico<sup>132</sup>. Para isto, as células e o DNA são incubados em banho de gelo, transferidos para um banho termostatizado a 42 °C, onde permanecem por um curto espaço de tempo, sendo, logo em seguida, recolocados no banho de gelo. Isto faz com que as células incorporem o DNA presente na solução. As células são, então, semeadas numa placa contendo meio de cultura sólido com antibiótico. A presença do antibiótico no meio de cultura faz com que somente cresçam as bactérias que adquiriram o plasmídio, enquanto que as células não transformadas morrem.

### Expressão de Proteínas Heterólogas

Proteínas heterólogas são assim denominadas por serem obtidas por células que não as produzem naturalmente. O sistema mais comumente utilizado para expressão de proteínas heterólogas é o que utiliza *E. coli* como célula hospedeira. Este sistema é amplamente difundido devido à facilidade e baixo custo de se cultivar esta bactéria e pela reprodutibilidade e quantidade de proteína produzida. Além disso, modificações nos vetores e linhagens de *E. coli* são freqüentemente feitas no sentido de aumentar a eficiência e versatilidade do sistema original.

Quando se pensa em expressão heteróloga espera-se que a proteína de interesse seja estável, não seja tóxica para a bactéria, seja solúvel, expressa em grande quantidade e possa ser facilmente purificada. Uma estratégia muito utilizada para purificar proteínas heterólogas é a incorporação de caudas de proteínas ou peptídeos à proteína de interesse. A proteína híbrida resultante, também chamada de proteína de fusão, apresenta características físico-químicas inerentes à cauda que facilitam a subseqüente purificação por técnicas tais como cromatografias de troca iônica, de interação hidrofóbica ou de afinidade<sup>133</sup>.

Deve-se ressaltar que existem proteínas produzidas em bactérias que têm a sua atividade biológica plenamente recuperada, enquanto outras são inativas.

Ademais, podem ser insolúveis, tóxicas para a célula hospedeira, expressas em pequena quantidade, formar agregados extremamente insolúveis mesmo na presença de agentes desnaturantes e até mesmo interagir com sua cauda e prejudicar sua purificação. Nestes casos, devem ser estudados procedimentos para resolver estes problemas de modo que não comprometam a pesquisa científica das proteínas de interesse.

## 4.2.1 - Caracterização Termodinâmica da Interação entre as Proteínas Shc (Src Homology Collagen Like) e Glutationa Stransferase por Titulação Calorimétrica Isotérmica

### 4.2.1.1 - Introdução

As vias de sinalização intracelular com a participação de proteínas tirosina quinases (PTKs) controlam a maioria dos processos celulares. A insulina é o hormônio anabólico mais conhecido e é essencial para a manutenção da homeostase de glicose e do crescimento e diferenciação celular<sup>134</sup>. Semelhante a outros fatores de crescimento, a insulina estimula a *mitogen-activated protein* (MAP) quinase. Essa via inicia-se com a fosforilação das proteínas IRS e/ou Shc, que interagem com a proteína Grb2<sup>135</sup>. Neste aspecto, a proteína adaptadora Shc (Src homology collagen-like) desempenha um papel fundamental. Uma vez ligada, a Shc pode ser fosforilada pelo receptor e conduzir o recrutamento do complexo Grb2/Sos e a ativação das vias Ras e MAP quinase<sup>106</sup>. A proteína Shc compreende um domínio de ligação à fosfotirosina (PTB) na região N-terminal, um domínio com homologia a Src 2 (SH2) na região C-terminal e na região central um domínio rico em prolina com homologia a colágeno 1 (CH1). O domínio CH1 contém três resíduos de tirosina que reconhecidamente sofrem fosforilação.

Dados obtidos através de *microarray* de proteína indicaram a interação entre as proteínas Shc e a glutationa S-tranferase (GST) da classe Omega. A GST é o principal grupo de proteínas solúveis do fígado, envolvidas na detoxificação celular de compostos eletrofílicos, geradas intracelularmente ou encontradas na forma de xenobióticos<sup>136</sup>. Elas possuem uma extensão N-terminal exclusiva e dados estruturais revelam um sítio ativo contendo um resíduo de cisteína diferentemente dos resíduos de tirosina e serina característicos de GSTs de outros eucariotos<sup>107</sup>.

81

Neste trabalho foram realizados experimentos de titulação calorimétrica para comprovar a interação entre as proteínas Shc e GST Omega indicada pelos dados de *microarray* de proteína.

### 4.2.1.2 – Resultados e Discussão

### Expressão e Purificação da Proteína p52Shc

Através da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) foi obtido o perfil protéico das soluções contendo a proteína Shc ao longo do seu processo de purificação após sua expressão em células de *E. coli* Rosetta 2 transformada com o plasmídio pET28aShc. A Figura 4.11 mostra o gel de SDS-PAGE usado na avaliação do processo de purificação da proteína Shc.



Figura 4.11: Gel de SDS-PAGE usado na avaliação do processo de purificação da proteína Shc: Linha 1: marcador de massa molar (kDa). Linha 2: lisado de *E. coli*. Linha 3: solução protéica após sua purificação por cromatografia de afinidade. Linha 4: solução protéica após sua purificação por cromatografia de troca iônica.

Linha 5: solução protéica após sua purificação por cromatografia de permeação em gel.

A falta de conhecimento das interações envolvendo a proteína Shc inteira deve-se em parte as dificuldades encontradas na sua produção em quantidades suficientes para a realização dos experimentos. Neste trabalho, a proteína Shc (resíduos 17-473) foi obtida com alta pureza (> 95%). A expressão foi confirmada por *western blotting* através de anticorpo monoclonal contra o domínio SH2 da proteína (dados não mostrados). A purificação da Shc foi realizada a 4 °C devido sua degradação ao longo do processo.

### Expressão e Purificação da Proteína GSTT1-1

A Figura 4.12 mostra o gel de SDS-PAGE usado na avaliação do processo de purificação da proteína GSTT1-1.



Figura 4.12: Gel de SDS-PAGE usado na avaliação do processo de purificação da proteína GSTT1-1. Linha 1: marcador de massa molar (kDa). Linhas 2 e 3: lisado de *E. coli*. Linha 4: solução protéica após sua purificação por cromatografia de afinidade. Linha 5, 6, 7 e 8: solução protéica após sua purificação por

cromatografia de permeação em gel (amostras de soluções coletadas a partir de diferentes frações dispostas no coletor do equipamento FPLC).

A Figura 4.12 mostra que a maior parte das impurezas foi eliminada na etapa da purificação por cromatografia de afinidade. O gel apresenta certas distorções que, provavelmente, devem ter sido causadas pelo ajuste inapropriado dos valores da diferença de potencial e corrente da corrida. Contudo, a pureza da solução de GSTT1-1 mostrou-se apropriada para avaliar sua interação com a proteína Shc.

### Titulação Calorimétrica Isotérmica

A Figura 4.13 mostra os resultados obtidos para a titulação calorimétrica isotérmica da Shc com uma solução da proteína GST omega.



Figura 4.13: Termogramas típicos para adição de uma solução de GST omega a uma solução de Shc. <u>Painel A</u>: titulação realizada 15 °C. <u>Painel B</u>: titulação realizada a 30 °C. Ambas as proteínas foram preparadas em tampão pH 8,0 contendo 50 mM Tris, 200 mM NaCl e 1 mM DTT. Tipicamente, 20 x 15 µL de

uma solução 120  $\mu$ M de GSTT1-1 foram injetados durante um período de 30 s (período para cada injeção) em uma solução 18  $\mu$ M de Shc. O intervalo de tempo entre as injeções foi de 240 a 360 s. A parte superior do gráfico mostra os dados conforme são coletados pelo equipamento (dQ/dt x t) e na parte inferior estão mostrados os valores de entalpia em diferentes proporções em mol de GST omega em relação à proteína Shc na cela calorimétrica.

Não foi verificado para as proteínas estudadas o perfil sigmóide característico de uma interação entre duas espécies químicas tanto para a temperatura de 15 °C quanto para a temperatura de 30 °C. A Figura 4.14 mostra os resultados calorimétricos obtidos para a diluição da solução de GST omega no tampão de preparação da Shc (50 mM Tris, 200 mM NaCl e 1 mM DTT, pH 8,0).



Figura 4.14: Termogramas obtidos para a diluição da solução de GST omega no tampão de preparação das proteínas (foi usada a mesma solução de GST usada na titulação da solução da proteína Shc). <u>Painel A</u>: titulação realizada a 15 °C. <u>Painel</u>

<u>B</u>: titulação realizada a 30 °C. 20 x 15  $\mu$ L da solução de GST foram injetados durante um período de 30 s (período para cada injeção) em 1,463 mL de tampão pH 8,0 contendo 50 mM Tris, 200 mM NaCl e 1 mM DTT. Para os cálculos foram mantidos os valores da razão molar usada na titulação da Shc pela GST.

### 4.2.1.3 - Conclusão

Conforme pode ser verificado pelas Figuras 4.13 e 4.14, as entalpias relativas a adição da solução da proteína GST omega a proteína Shc são praticamente iguais as entalpias de diluição da proteína GST omega em tampão para as duas temperaturas estudadas (15 °C e 30 °C). Este dado confirma o fato de que muito provavelmente não haja interação entre as proteínas Shc e GST omega nas condições estudadas.

### 4.2.2 - Caracterização Termodinâmica da Interação entre as Proteínas Shc (Src Homology Collagen Like) e Ciclofilina A (Cypa) por Titulação Calorimétrica Isotérmica

### 4.2.2.1 – Introdução

A ciclofilina A (CypA) pertence a uma família de proteínas muito comum tanto em procariotos quanto em eucariotos<sup>137, 138</sup>. Ciclofilinas são peptidil prolil *cis/trans* isomerases (PPIases)<sup>139, 140</sup> que catalisam a isomerização *cis/trans* de ligações prolil peptídicas (Xaa-Pro), onde Xaa pode ser qualquer aminoácido. A ciclofilina humana, uma isomerase citosólica, ganhou inicialmente destaque quando se descobriu que ela era o alvo da ciclosporina A (CsA)<sup>141</sup>, um imunossupressor usado para impedir a rejeição de órgãos transplantados. A inibição da atividade das PPIases não está relacionada ao seu papel imunossupressor. Por sua vez, verificou-se que a formação do complexo CypA/CsA inibe a atividade fosfatase da calcineurina<sup>142</sup>, o que causa a inibição da expressão de genes de proteínas nucleares envolvidas na ativação celular e formação de linfócitos T citotóxicos.

Apesar das características *in vitro* das PPIases serem bem conhecidas, sua atividade biológica *in vivo* ainda é controversa<sup>143</sup>. Vários relatos na literatura têm descrito a participação das ciclofilinas em várias vias de sinalização intracelular<sup>144, 145 e 146</sup>. Neste aspecto, este trabalho procurou avaliar a participação da proteína CypA na via de sinalização da proteína Shc (<u>Src homology c</u>ollagen-like) através da técnica de titulação calorimétrica isotérmica.

### 4.2.2.2 – Resultados e Discussão

### Expressão e Purificação das Proteínas p52Shc e CypA

A Figura 4.15 mostra o gel de SDS-PAGE usado na avaliação do processo de purificação das proteínas Shc e CypA.



### A

В

Figura 4.15: <u>A</u>- avaliação do processo de purificação da proteína Shc através da técnica de gel SDS-PAGE. Linha 1: marcador de massa molar (kDa). Linha 2: lisado de *E. coli*. Linha 3: solução protéica após sua purificação por cromatografia de afinidade. Linha 4: solução protéica após sua purificação por cromatografia de troca iônica. Linha 5: solução protéica após sua purificação por cromatografia de permeação em gel. <u>B</u>- avaliação do processo de purificação da proteína CypA através da técnica de gel SDS-PAGE. Linha 1: marcador de massa molar. Linha 2: lisado de *E. coli*. Linha 3: solução protéica após sua purificação por cromatografia de permeação em gel. <u>B</u>- avaliação do processo de purificação por cromatografia de permeação de gel SDS-PAGE. Linha 1: marcador de massa molar. Linha 2: lisado de *E. coli*. Linha 3: solução protéica após sua purificação por cromatografia de afinidade. Linha 4: solução protéica após sua purificação por cromatografia de afinidade. Linha 4: solução protéica após sua purificação por cromatografia de afinidade. Linha 4: solução protéica após sua purificação por cromatografia de permeação em gel.

A partir dos dados apresentados pela Figura 4.15 verifica-se que a purificação das proteínas Shc e CypA foi realizada com sucesso. A massa molar das proteínas isoladas nas linhas 5 do gel A e 4 do gel B correspondem às massas molares das proteínas Shc e CypA, cujos valores são 52 e 18 kDa, respectivamente.

### Titulação Calorimétrica Isotérmica

A Figura 4.16 mostra os resultados obtidos para a titulação calorimétrica isotérmica da Shc com uma solução da proteína CypA a 15 °C.



Figura 4.16: Termogramas da adição de uma solução de CypA a uma solução de Shc a 15 °C. Ambas as proteínas foram preparadas em tampão pH 8,0 contendo 50 mM Tris, 200 mM NaCl e 1 mM DTT. Tipicamente, 20 x 15  $\mu$ L (exceções são indicadas) de uma solução 97  $\mu$ M de CypA foram injetados durante um período de 30 s (período para cada injeção) em uma solução de 10  $\mu$ M de Shc. O intervalo de tempo entre duas injeções foi de 180 s.

Para um dos termogramas das titulações da proteína Shc com CypA foi verificado o perfil sigmóide característico de uma interação entre duas espécies químicas, contudo, para a repetição do mesmo experimento, realizada com um lote diferente de proteína, o mesmo comportamento não foi verificado. Titulações em outras temperaturas foram realizadas para confirmar a existência da interação entre as proteínas estudadas.

A Figura 4.17 mostra os resultados obtidos para a titulação calorimétrica isotérmica de uma solução de Shc com uma solução da proteína CypA a 6 e 20 °C.



Figura 4.17: Termogramas da titulação calorimétrica de uma solução de Shc com uma solução da proteína CypA a 6 e 20 °C. Ambas as proteínas foram preparadas em tampão pH 8,0 contendo 50 mM Tris, 200 mM NaCl e 1 mM DTT. Tipicamente, 20 x 15  $\mu$ L (exceções são indicadas) de CypA foram injetados durante um período de 30 s (período para cada injeção) em uma solução de Shc. O intervalo de tempo entre duas injeções foi de 180 s.

Pelo fato de não haver sido verificado o perfil sigmóide da curva de titulação calorimétrica característico de uma interação entre duas espécies químicas e das entalpias relativas a adição da solução da proteína CypA a proteína Shc serem praticamente iguais as entalpias de diluição da proteína CypA (dados não mostrados) confirma-se o fato de que muito provavelmente não haja interação entre as proteínas Shc e CypA nas condições estudadas.

### 4.2.3 - Conclusão

A titulação calorimétrica isotérmica mostrou-se eficiente para avaliar a existência de interação entre duas proteínas. Verificou-se pelo uso desta técnica que muito provavelmente não haja interação entre as proteínas Shc (src homology collagen like) e glutationa S-transferase (classe omega) e entre a Shc e a proteína ciclofilina A (CypA) nas condições estudadas. Os procedimentos usados para a expressão e purificação das proteínas heterólogas estudadas permitiram a obtenção de soluções protéicas numa concentração e pureza adequadas para sua utilização nos experimentos de titulação calorimétrica isotérmica.

# 4.3 - CARACTERIZAÇÃO TERMODINÂMICA DA INTERAÇÃO DA PROTEÍNA EFHC1 COM ÍONS CÁLCIO E MAGNÉSIO USANDO TITULAÇÃO CALORIMÉTRICA ISOTÉRMICA

### 4.3.1 - Considerações Iniciais

Os resultados apresentados neste capítulo foram obtidos em colaboração com o grupo de pesquisa da Profa. Iscia Lopes-Cendes da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas e foram publicados no periódico *Archives of Biochemistry and Biophysics* (2008, 477, 131-138). O artigo publicado intitula-se "*Characterization of the C-terminal half of human juvenile myoclonic epilepsy protein EFHC1: Dimer formation blocks Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> binding to its functional EF-hand*".

Uma cópia do referido artigo integra este capítulo. O artigo é precedido por um texto introdutório a respeito da natureza das proteínas ligantes de íons metálicos, com destaque àquelas ligantes de cálcio, e descreve como a interação entre estas proteínas e íons pode ser avaliada por titulação calorimétrica isotérmica.

Minha participação neste trabalho em colaboração com a Profa. Iscia abrangeu principalmente a elaboração e execução dos ensaios calorimétricos para caracterização termodinâmica da interação entre a proteína EFHC1 e íons cálcio e magnésio e a determinação do número de cisteínas reduzidas presentes na estrutura molecular da EFHC1. Abrangeu também a interpretação e discussão dos resultados experimentais obtidos em relação a aqueles encontrados na literatura. Apresentei minha parte do trabalho na forma de um texto em inglês e participei da revisão do texto completo do manuscrito submetido para publicação.

### 4.3.2 - Introdução

Metaloproteínas desempenham funções importantes em inúmeros processos biológicos e sabe-se que aproximadamente 40% de todas as proteínas ligam-se a íons metálicos<sup>147</sup>. Este grupo de proteínas pode ser classificado entre metaloproteínas e proteínas ligantes de íons. A classificação não é precisa, contudo, diz-se freqüentemente na literatura, que metaloproteínas apresentam interação química forte pelo íon metálico enquanto proteínas ligantes de íons apresentam interação fraca. Íons metálicos importantes em organismos vivos como Mg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> e Mn<sup>2+</sup> ligam-se, freqüentemente, à proteínas de modo seletivo e com configurações geométricas diferentes. Diferenças também podem ser observadas nos tipos de átomos usados na ligação, dentre eles, destacam-se os átomos de oxigênio, nitrogênio e enxofre das cadeias laterais e os átomos de oxigênio dos grupos carbonílicos da cadeia principal.

Íons cálcio estão entre os mais importantes íons associados a funções biológicas. Variações na concentração intracelular de cálcio estão envolvidas na contração muscular, transmissão de impulsos nervosos, formação de microtúbulos, respostas hormonais, exocitose, fertilização e adesão celular. Processos extracelulares, como a coagulação, também têm a participação de íons cálcio<sup>148</sup>.

### Proteínas Ligantes de Cálcio

As proteínas que interagem com íons cálcio podem ser divididas em duas principais subfamílias identificadas pela presença do domínio estrutural *EF-hand*. As proteínas ligantes de cálcio que contém o domínio *EF-hand* podem ser classificadas, por sua vez, conforme atuem como reguladoras da concentração deste íon no ambiente celular ou na sinalização celular.

A manutenção dos processos celulares que envolvem íons cálcio exige um controle rigoroso da sua concentração. Esta função é exercida por proteínas ligantes

94

de cálcio especializadas na manutenção da concentração adequada deste íon em um ambiente celular específico. Outra função das proteínas ligantes de cálcio é traduzir variações da concentração deste íon em respostas fisiológicas apropriadas. Uma série de sinais extracelulares como luz, hormônios, fatores de crescimento, atividade elétrica e neurotransmissores provocam alterações específicas na concentração intracelular de cálcio e são moduladas por proteínas especializadas em sinalização celular<sup>149</sup>.

Estas duas classes de proteínas diferem quanto a sua função, contudo, apresentam também diferenças estruturais. As proteínas ligantes de cálcio envolvidas na manutenção da concentração destes íons no ambiente celular têm normalmente estrutura terciária compacta e não sofrem mudanças conformacionais após sua interação com os íons cálcio. A parvalbumina é um exemplo desta classe de proteínas. Por outro lado, as proteínas ligantes de cálcio envolvidas na sinalização celular têm estrutura terciária estendida e sofrem mudanças conformacionais após sua interação com estes íons. Estas mudanças conformacionais permitem sua interação com alvos intracelulares. A calmodulina<sup>150</sup> e a troponina C<sup>151</sup> são exemplos desta classe de proteínas. A Figura 4.18 ilustra as diferenças estruturais apresentadas pelas proteínas ligantes de cálcio.



Figura 4.18: Estrutura das proteínas ligantes de cálcio. A-) forma estendida da calmodulina (código PDB: 1CLL) e B-) forma não-estendida proteína 2 de ativação da guanilato ciclase (código PDB: 1JBA). As cores designam estruturas protéicas, a saber,  $\alpha$ -hélices são mostradas em ciano, folhas- $\beta$  em amarelo e a região intermediária entre os domínios C-terminal e N-terminal em vermelho. A interação da calmodulina com íons cálcio altera a estrutura da região intermediária entre os domínios C-terminal (Figura 4.1 - A, em vermelho).

### Características dos Domínios Protéicos EF-hand

Os sítios *EF-hand* caracterizam-se por uma região contínua de 29 aminoácidos que contém duas  $\alpha$ -hélices ladeando uma alça na qual se localizam os aminoácidos responsáveis pela coordenação do íon. As  $\alpha$ -hélices têm a função de ancorar a alça na conformação correta e comunicar às demais partes da molécula as mudanças conformacionais geradas pela ligação dos íons. Os aminoácidos que participam da coordenação podem ser representados em torno do íon como em um sistema de coordenadas em que o íon ocupa o centro do sistema de eixos e os aminoácidos ocupam posições nos eixos X, Y e Z<sup>152</sup>.

### O papel das proteínas ligantes de cálcio na Epilepsia

Canais iônicos desempenham um papel fundamental no controle da excitação neuronal. Quatro epilepsias humanas com base genética foram relacionadas a mutações em genes de canais iônicos. Recentemente, foi verificado que a proteína humana EFHC1 ou mioclonina 1 poderia estar envolvida na fisiopatologia da epilepsia mioclônica juvenil (EMJ)<sup>153</sup>. Análises de interação da proteína EFHC1 com canais de cálcio voltagem-dependentes revelaram que a primeira aumenta o influxo de cálcio pelo canal, acarretando, dessa forma, morte celular programada<sup>153</sup>. Entre as epilepsias idiopáticas generalizadas, a EMJ é a mais comum, somando 5 a 10% do total dos casos de epilepsia no mundo ocidental<sup>154</sup>. A região 6p12-p11 do cromossomo 6 humano foi identificada como responsável pela doença.

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo verificar a existência da interação por cálcio da proteína EFHC1 uma vez que foi identificado um sítio *EF hand* potencial na avaliação da sua seqüência primária. Foi caracterizada a porção C-terminal da EFHC1 (resíduos 403 a 640; chamada EFHC1C). Os experimentos foram realizados na presença e ausência de 1,4-ditiotreitol (DTT) para simular os ambientes redutor e oxidante, respectivamente. Como sítios *EF hand* podem ser específicos para cálcio ou ligar cálcio e magnésio, foram realizadas titulações calorimétricas com ambos os íons.

**4.3.3** – Apresentação do Artigo "Characterization of the C-terminal half of human juvenile myoclonic epilepsy protein EFHC1: Dimer formation blocks  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  binding to its functional EF-hand". <u>Archives of Biochemistry and</u> <u>Biophysics</u>, **2008**, 477, 131-138.

Archives of Biochemistry and Biophysics 477 (2008) 131-138



### Characterization of the C-terminal half of human juvenile myoclonic epilepsy protein EFHC1: Dimer formation blocks Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> binding to its functional EF-hand

Marcelo J. Murai<sup>a</sup>, Rogério C. Sassonia<sup>c</sup>, André H. Zamboni<sup>a</sup>, Fábio F. Conte<sup>a</sup>, Daniel Martins-de-Souza<sup>b</sup>, Ricardo Aparicio<sup>c</sup>, Marcelo G. de Oliveira<sup>c</sup>, Iscia Lopes-Cendes<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Medical Genetics, Faculty of Medical Sciences, Tessália Vieira de Camargo, 126, CEP 13083-970, University of Campinas, UNICAMP, Campinas, SP, Brazil <sup>b</sup> Department of Biochemistry, Institute of Biology, University of Campinas, UNICAMP, Campinas, SP, Brazil \* Institute of Chemistry, University of Campinas, UNICAMP, Campinas, SP, Brazil

#### ARTICLE INFO

Artide history Received 19 March 2008 and in revised form 12 June 2008 Available online 19 June 2008

#### Keywords: EFHC1 DM10 domain EF-hand motif Divalent ion binding Dimerization Isothermal titration calorimetry

#### ABSTRACT

Human EFHC1 is a member of the EF-hand superfamily of Ca2+-binding proteins with three DM10 domains of unclear function. Point mutations in the EFHC1 gene are related to juvenile myoclonic epilepsy, a fairly common idiopathic generalized epilepsy. Here, we report the first structural and thermodynamic analyses of the EFHC1C-terminus (residues 403-640; named EFHC1C), comprising the last DM10 domain and the EF-hand motif. Circular dichroism spectroscopy revealed that the secondary structure of EFHC1C is composed by 34% of α-helices and 17% of β-strands. Size exclusion chromatography and mass spectrometry showed that under oxidizing condition EFHC1C dimerizes through the formation of disulfide bond. Tandem mass spectrometry (MS/MS) analysis of peptides generated by trypsin digestion suggests that the Cys575 is involved in intermolecular S-S bond. In addition, DTNB assay showed that each reduced EFHC1C molecule has one accessible free thiol. Isothermal titration calorimetry (ITC) showed that while the interaction between  $Ca^{2+}$  and EFHC1C is enthalpically driven ( $\Delta H = -58.6$  to -67 kJ/mol and TΔS = -22.5 to -31 kJ/mol) the interaction between Mg2\* and EFHC1C involves an entropic gain, and is  $\sim$ 5 times less enthalpically favorable ( $\Delta H = -11.7$  to -14 kJ/mol and  $T\Delta S = 21.9$  to 19 kJ/ mol) than for Ca2+ binding. It was also found that under reducing condition Ca2+ or Mg2+ ions bind to EFHCIC in a 1/1 molar ratio, while under oxidizing condition this ratio is reduced, showing that EFHCIC dimerization blocks Ca2+ and Mg2+ binding.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Different EFHC1 gene mutations have been described in juvenile myoclonic epilepsy (JME)<sup>1</sup> [1], the most common form of idiopathic generalized epilepsy (IGE) [2]. The gene encodes a non-ion channel protein of 640 amino acids with three DM10 domains of unknown function and a putative EF-hand Ca2+-binding motif at the C-terminal portion [2].

Although there is very compelling evidence for the involvement of EFHC1 in JME [2], its functions are much less clear. Suzuki et al. [1] showed that EFHC1 protein localizes in different brain regions in the dendrites and in the soma of neuronal cells and it is associated to a regulatory apoptotic system with an R-type voltage-dependent Ca2+ channel Ca22.3. The overexpression of the mutated forms decreased cell death in

primary neuronal cultures, probably through a reduction of Ca2+ influx through the channel. According to these authors, EFHC1 apoptotic activity may be related to the elimination of certain neurons during the development of the central nervous system. Ikeda et al. [3] proposed another functional role of EFHC1 based on sequence similarity (40% identity) and domain composition, suggesting that EFHC1 is closely related to the flagella axoneme component Rib72. Expression and immunofluorescence data showed that it is located in the cilia of tracheal epithelia, sperm flagella and within motile cilia of other tissues, including brain, but in a less extended way [3]. In addition, there is experimental evidence showing that EFHC1 associates to the mitotic apparatus and centrosome, suggesting a possible role during cell division [4].

Ca2+-binding proteins frequently serve as effectors or modulator proteins to transduce Ca2+ signals into appropriate physiological answers. Over the years an enormous number of these Ca2+ binding molecules have been identified, reflecting the importance of Ca<sup>2</sup> and its regulative function in the cell [5].

<sup>\*</sup> Corresponding author. Fax: +55 19 32891818.

E-mail address: icendes@unicamp.br (I. Lopes-Cendes).

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Abbreviations used: JME, juvenile myoclonic epilepsy; CD, circular dichroism; DTT, dithiothreitol; DTNB, 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid); IGE, idiopathic generalized epilepsy; ITC, isothermal titration calorimetry.

<sup>0003-9861/\$ -</sup> see front matter @ 2008 Elsevier Inc. All rights reserved. doi:10.1016/j.abb.2008.05.008
132

## Materials and methods

## Plasmid construction

Total RNA was extracted from human hippocampus using TRIzol reagent (Invitrogen), according to manufacturer instructions. cDNA was generated by reverse transcriptase reaction using ImProm-II Reverse Transcription System (Promega). The C-terminus of EFHC1, EFHC1C, comprising amino acids 403-640 was PCR amplified using forward primer OMM24 (5'-TTTGGGTCTCCCATGAAAGCTCCAAAAAAAGACG-3') and reserve primer OMM25 (5'-ATCCTCGAGTCAGTTTGAGAAAGCACGA-3'). The resulting amplicon was cloned into pGEM-T easy vector system (Promega), creating plasmid pGEM-EFHC1C that was used as template for subcloning into pET SUMO (Champion pET SUMO Protein Expression System, Invitrogen), and generating pETSUMO-EFHC1C. Both constructs were verified by restriction enzyme digestion and automatic DNA sequencing. Normal hippocampal tissue samples were obtained from autopsy material. This study was approved by our Institutional Research Ethics Committee.

## Protein expression and purification

Protein was expressed using Escherichia coli strain BL21(DE3). Competent cells carrying the plasmid pRARE (Novagen) were transformed with recombinant plasmid. Single bacterial colonies were cultured overnight at 37 °C in LB broth added to 50 µg/mL kanamycin and 34 µg/mL chloramphenicol. This preinoculum was transferred to 2 L of LB broth supplemented with kanamycin and chloramphenicol at the same concentration. When cultures reached an A600 of 0.6, expression was induced by adding 0.5 mM IPTG (isopropyl B-D-thiogalactopyranoside), 30 °C for 4 h and shaking at 200 rpm. Cells were then harvested by centrifugation at 5000g for 10 min at 4 °C and stored at -20 °C. Induced bacterial cells were resuspended in affinity chromatography buffer (50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.2, 300 mM NaCl, 5% glycerol) containing PMSF (phenylmethylsulphonyl fluoride) and lysozyme to concentrations of 0.5 mM and 1 mg/mL, respectively. The suspension was sonicated, clarified by centrifugation at 20000g and the supernatant was used for protein purification. The extract from 1 L of LB cultures was incubated with 3 mL of Ni-NTA (Ni2+-nitrilotriacetic acid) Superflow resin (Qiagen) for 1 h at 25 °C; transferred to a spin column, washed with 20 column volumes (cv) of affinity buffer and eluted with increasing imidazole concentrations (up to 250 mM) in the same buffer.

#### Cleavage and separation of fusion tag from human EFHC1C

The affinity-purified protein was incubated with SUMO protease-1 (Life Sensors) in a 1:100 (w/w) enzyme-to-substrate ratio; and dialyzed overnight at 4 °C against buffer A, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 20 mM NaCl, 1 mM DTT (dithiothreitol). The cleavage reaction was passed by gravity through 3 mL of Ni-NTA column pre-equilibrated with buffer A. Flow-through fraction was collected and applied onto a 1-mL HiTrap Q FF column (Amersham Biosciences) pre-equilibrated with buffer A. The column was washed with 4 cv using FPLC system (Amersham Biosciences) and proteins were eluted with 15 cv linear gradient (0–30%) of buffer B, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 M NaCl, 1 mM DTT. Fractions enriched with the protein were pooled and concentrated using Amicon Ultra-4 centrifugal filter device (Millipore). Purification efficiency was analyzed by SDS-PAGE [6] followed by Coomassie staining.

## Protein quantitation

Protein concentration was estimated measuring the absorbance at 205 nm ( $A_{205}$ ), according to the method described by Scopes [7], and at 280 nm ( $A_{200}$ ), considering the extinction coefficient calculated from the composition of the protein using Protparam tool (http://www.expasy.org/tools/protparam.html).

## Western blot analysis

Protein samples were fractionated by SDS-PAGE and transferred onto a nitrocellulose filter using a horizontal semi-dry electroblot apparatus (Amersham Biosciences). The filter was incubated for 2 h at 25 °C in blocking solution (3% non-fat dry milk powder in 25 mM Tris-buffered saline, pH 7.4). The membrane was processed through sequential incubations with primary antibody for 16 h, and then with an alkaline phosphatase-conjugated, affinity-purified goat anti-rabbit IgG antibody (Sigma-Aldrich). Immunoreacted bands were detected using BCIP/NBT (5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate/nitroblue tetrazolium) substrate (Fermentas). Polyclonal anti-Efhc1 antibody was a gift from Dr. Ritsu Kamiya (University of Tokyo).

## Mass spectrometry (MS) analyses

For peptide mass fingerprinting identification, peptides were generated and extracted from the gel-separated proteins following in-gel trypsin digestion protocol [8] using sequencing grade modified porcine trypsin from Promega. EFHC1C mass spectra were acquired using a MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ ionization-time-of-flight) Voyager DE-Pro mass spectrometer (Applied Biosystems). Measurements were performed with laser in positive linear mode with a 20-kV acceleration voltage. To MS spectrum 100 shots were accumulated. Data Explorer software was used to process MS data.

For cross-linked peptide analyses, enriched dimeric bands were subjected to in-gel trypsin digestion as mentioned above under two different conditions: in the first condition the protein band was reduced with 10 mM DTT and alkylated with 55 mM iodoacetamide; whereas, in the second condition no treatment was performed, ESI-MS/MS (electrospray ionization) was carried out on a Q-Tof Ultima API mass spectrometer (Waters/Micromass) with a nanoflow interface. The digested sample (10 µL) was desalted using a Waters Opti-Pak C-18 trap column for 5 min. The sample was eluted from the C18 trap column at a 250-nL/min flow with a mobile phase containing water/acetonitrile (1:1, v/v) and 0.1% formic acid. The instrument conditions were 3 kV for the spray voltage, 100 V for the cone voltage, cone gas at 30 L/h, and source temperature of 100 °C. The final spectra were processed using the Mascot Distiller program (Matrix Science). The program SearchX-Links (http://www.searchxlinks.de) was used to analyze the mass spectra of protein digests with regard to the presence of disulfide-linked peptides.

## Determination of free cysteines in EFHC1C with DTNB

The number of free cysteine residues per EFHC1C molecule was determined using the DTNB assay [9]. EFHC1C was previously treated with 1 mM DTT and extensively dialyzed against 20 mM Tris-HCl, pH 7.2, 50 mM NaCl. A solution of EFHC1C 15  $\mu$ M was incubated with 50 times molar excess of DTNB in PBS solution (pH 7.27) containing 1 mM EDTA. Free thiols were quantified through the absorbance at 412 nm ( $A_{412}$ ) due to formation of 2-nitro-5-thiobenzoate anion (TNB<sup>2-</sup>) using a Hewlett-Packard 8453 spectrophotometer.

Size exclusion chromatography (SEC)

Determination of the Stokes' radius (Rs) of the purified EFHC1C in solution was carried out on a Superdex 200 HR 10/30 column (Amersham Biosciences) at room temperature using as mobile phase buffer D, 20 mM Tris-HCl, pH 7.2, 50 mM NaCl, in the presence and absence of 1 mM DTT. Recombinant protein was previously treated with 0.5 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) and injected in a volume of 120 µL using FPLC system and eluted at a flow rate of 0.5 mL/min. The column was pre-equilibrated with 2 cv of corresponding buffer between the runs. The partition coefficient  $(k_{av})$  [10,11] was calculated using equation  $k_{av} = (v_e - v_o)/(v_c - v_o)$ , where  $v_e$  is the elution volume of each protein standard and vc is the total volume of the column. Blue dextran (2000 kDa) was used to determine the void volume (vo). Stokes' radii were calculated using a standard curve  $\sqrt{-\log(k_{av})}$ versus Rs of the standard proteins: ferritin (61.0 Å), aldolase (48.1 Å), ovalbumin (30.5 Å), chymotrypsinogen A (20.9 Å), and ribonuclease A (16.4 Å) (Amersham Biosciences) (1 Å is equal to 10-10 m). The column was calibrated prior to the analysis and reproducibility of the calibration was tested between series of the experiments. It was virtually identical in the presence or absence of DTT. Experiments were repeated twice to ensure consistency and accuracy.

## Far-UV circular dichroism (CD) spectroscopy

CD spectra were acquired on a I-810 spectropolarimeter (lasco) coupled to a Peltier Jasco PFD-425 system for temperature control. Protein samples were prepared at 4 µM in 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4). The spectra were collected at 20 °C using 0.1 cm path length cell over the range of 190-260 nm, and a 1nm bandwidth with step size of 0.5 nm and speed of 100 nm/ min. For each measurement, the mean values of sixteen spectra were taken to improve signal-to-noise ratio. The ellipticity was expressed as the mean residue ellipticity  $[\theta]$  (deg cm<sup>2</sup> dmol<sup>-1</sup>). Prediction of secondary structure elements was performed using PSIPRED (http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/psiform.html) and PHD (http://www.predictprotein.org/). Data deconvolution was carried out using DICHROWEB web server (http://public-1.cryst.bbk. ac.uk/cdweb) using the CONTINLL [12,13] and CDSSTR [14,15] algorithms. All buffers used were of analytical grade and were filtered before use to avoid light scattering by small particles.

## Isothermal titration calorimetry (ITC) measurements

Calcium chloride >99% pure (USB Corp.) and magnesium chloride >99% pure (Merck) were used as received. Protein solutions were prepared as described above, with a final treatment with 0.5 mM EDTA, extensively dialyzed against buffer D with or without 1 mM DTT, and degassed before use. Recipients and concentrators were previously treated with 1 M HCl. All ITC measurements were carried out at 25 °C on a VP-ITC system (MicroCal). 1.5 mM CaCl2 or MgCl<sub>2</sub> solution was titrated into 70 µM EFHC1C in the sample cell (1.436 mL), using 4 or 10 µL of titrant per injection over 12 or 30 s. Time intervals of 420-600 s were used between injections to allow complete thermal equilibration. After subtracting the heat of injection, data were fit using a non-linear least-squares algorithm packaged with the Origin® software, provided with the VP-ITC system. The areas of the picks were adjusted manually. The stoichiometry (N), association constant  $(K_a)$ , and enthalpy change ( $\Delta H$ ) were each obtained directly from the titration data, while the entropy change ( $\Delta S$ ) and Gibbs free energy change ( $\Delta G$ ) were calculated using the equations  $\Delta G = -RT \ln K_a$  and  $\Delta G =$  $\Delta H - T\Delta S$ , respectively. The dissociation constant (K<sub>d</sub>) was calculated as 1/K2. One site model, two independent sites model and multiple sequential sites model, which have different assumptions and number of fit parameters, were tried in the fittings. The quality of the fitting was evaluated based on the  $\chi^2$  parameter, All solutions were prepared with Milli-Q<sup>®</sup> water and degassed before use.

## **Results and discussion**

## Expression and purification of human EFHC1C fusion protein

The EFHC1 protein belongs to a poorly characterized class of DM10 domain-containing proteins with an unknown function. The DM10 domain contains ~105 residues and has been identified in only one copy in the N-terminal portion of nucleoside-diphosphate kinase (NDK) of human nm23-H7 [16,17] and Chlamydomonas reinhardtii flagellar axoneme associated protein p40 [18]. In mouse Effic1 and Chlamydomonas Rib72 there are three repeats within this domain [3,18]. Proteins that have DM10 domains interact with doublet microtubules [3,19], raising a possible function in axonemal assembly or regulating NDKs [20]. EF-hand motif is the largest utilized Ca2+-binding motif found in proteins [21] and is characterized by a helix-loop-helix structure [22,23]. The EF-hand superfamily regulates many aspects of cell function, such as Ca24 buffering in the cytosol, cell proliferation and signal transduction [24,25]. In the central nervous system, calmodulin and the related EF-hand containing neuronal Ca2+-sensor proteins have many important roles in neuronal signaling [26,27]. The basic functional unit consists in a pair of EF-hand motifs [23], but in the case of human EFHC1 it is not clear if it is present in pairs or not.

The C-terminal half of EFHC1 (EFHC1C) was expressed as a fusion protein with an N-terminal SUMO tag. SUMO has been described as a solubility enhancer, favoring proper folding of the passenger protein in bacterial expression system [28]. Recombinant vector was cotransformed with pRARE into BL21(DE3), because EFHC1C sequence presents codons that are rare in E. coli. The expression of SUMO-EFHC1C was induced by 0.5 mM IPTG at 30°C by 4 h. The recombinant protein yielded ~70 mg of protein per liter of culture after a single affinity step (Fig. 1a, lane 2). The crude cell lysate was incubated in a batch preparation procedure with Ni-NTA resin for 1 h at room temperature, followed by washing the packed resin with affinity chromatography buffer. The human EFHC1C protein was eluted from the Ni-NTA column by a gradient of 5-250 mM imidazole and exhibited a satisfactory purity level for cleavage and removal of tag (Fig. 1a, lane 2).

## Cleaved EFHC1C remains in the soluble fraction

Eluted fractions from first affinity purification step were successfully cleaved with SUMO protease-1. Both SUMO fusion tag and SUMO protease-1 contain an N-terminal polyhistidine tag that facilitates capture with Ni–NTA resin. EFHC1C protein passed through the column and was collected in the flow-through fraction (Fig. 1a, lane 3). Final purification steps were performed using ion exchange Q FF chromatography column, separating trace contaminant proteins (Fig. 1a, lane 4). The final amount of purified EFHC1C protein was ~2.7 mg/L of initial bacterial broth.

## EFHC1C identification by Western blot analysis and MS

Western blot analysis confirmed that human EFHC1C was identified by an anti-Efhc1 antibody [3] (Fig. 1b). This polyclonal antibody was raised against the EF-hand motif sequence of mouse Efhc1 (Fig. 2). Mouse Efhc1 and human EFHC1 share 76% amino acid identity and 86% similarity, the reason why the polyclonal mouse antibody recognized the human protein, although the



Fig. 1. Purification of recombinant EFHC1C and Western blot analysis identification. (a) Analysis of purification steps by 10% SDS–PAGE under reducing conditions, stained with Coomassie Brilliant Blue. Lane 1, soluble fraction extracted from bacterial lysis (~60 µg); lane 2, fraction collected from affinity chromatography during the elution step with imidazole concentration of 100 mM (~15 µg); lane 3, cleaved EFHC1C that passed through affinity chromatography column to remove tag (~5 µg); lane 4, final purified protein eluted from ion-exchange chromatography (~20 µg). Molar mass markers are indicated. (b) Western blot analysis of the separated proteins in (a) using polyclonal mouse anti-Effc1 antibody [3]. See legend above. Some contaminant bands were also detected in lane 1. Certain non-specificity of the polyclonal antibody was reported by Kamiya's group [3]. PMSF was not capable to stop unspecific cleavage of tagged protein as seen in lane 2.



Fig. 2. Sequence alignment comparison between human and mouse proteins. Amino acid sequence comparison of human EFHC1 (amino acids 403–640; GenBank Accession No. NM018100) and mouse Efhc1 (amino acids 403–640; GenBank Accession No. XM990358). The sequence alignment was carried out using CLUSTALW. Letters shaded in black indicate amino acids that are identical. Letters shaded in gray indicate similar amino acids. Second ary structure elements (E = β-sheet, H = α-helix) are indicated above the predict structure deduced from the human EFHC1 sequence (by PSIPRED and PHD servers). Dotted line, DM10 domain; solid line, EF-hand motif; dashed line, mouse Efhc1 sequence recognized by polyclonal antibody [3]. DM10 domain and EF-hand motif were predicted by PROSITE (http://expasy.org/prosite/) and SMART (http://smart.embl-heidelberg.de/). Cysteine residues are marked with an asterisk. The Ca<sup>2+</sup> binding loop of the EF-hand is highlighted by a box.

mouse protein presents some extra amino acids. Peptide mass fingerprinting was also performed by mass spectrometry and correctly identified our clone construction (Supplementary Fig. 1).

## EFHC1C secondary structure

Far-UV CD spectrum at 20 °C of cleaved EFHC1C shown in Fig. 3 exhibits two minima centered around 208 and 225 nm, suggesting the presence of helical structure along with other secondary structure elements. However, the CD signal at 225 nm is not so pronounced as the 208 nm signal. Minimal differences were observed in the CD spectrum of EFHC1C treated with EDTA (Fig 3), relative to EFHC1C without treatment. It was also observed that both frozen protein at -20 °C and stored protein at 4 °C for 19 days showed just modest decrease in secondary structure elements (Supplementary Fig. 2), suggesting a stable conformation. EFHC1C protein not only presents secondary but also tertiary structure: preliminary one-dimensional <sup>1</sup>H NMR spectroscopy showed that EFHC1C is folded, as detected by characteristic spectrum (Supplementary Fig. 3).



In order to estimate the content of different types of secondary structures in EPHC1C, the far-UV CD spectrum of the protein was

Fig. 3. Far-UV CD spectra of cleaved purified EFHC1C. Far-UV CD spectroscopy of EFHC1C obtained in 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4). Protein concentration was 4 µM. The spectra were accumulated 16 times and buffer corrected. Two different conditions were measured: non-treated protein (■) and EDTA treated (□).

analyzed using the routines available at DICHROWEB. The values obtained for the secondary structures ( $\alpha$ -helix 34 ± 1% and  $\beta$ -sheet 17 ± 2%) are in agreement with secondary structure predictions by PSIPRED and PHD (Fig. 2). The high  $\alpha$ -helical content is characteristic of the EF-hand family of proteins [29]. It is predicted that DM10 domain contributes totally to  $\beta$ -sheet elements (see Fig. 2 and reference [20]) but unfortunately there is no CD information

published on this domain, so it is not possible to correlate our data with other DM10 domain proteins.

EFHC1C dimerization characterized by SEC and MS

Many EF-hand proteins naturally occur as dimers [30]. We first observed the dimeric protein by non-reduced SDS-PAGE and Wes-



Fig. 4. Formation of disulfide dimers. (a) Size exclusion chromatograms of EFHC1C with 1 mM DTT (dotted line) and without DTT (solid line). 120 µL of ~400 µM protein solution were applied onto Superdex 200 HR 10/30 column (Amersham Biosciences) pre-equilibrated with buffer D (20 mM Tris-HCL pH 7.2, 50 mM NaCl). In the presence of DTT elution volume of EFHC1C is 14.1 mL corresponding to the monomer (peak M), and in the absence of DTT it elutes as a dimer (elution volume 15.3 mL; peak D) and a monomer (peak M). Standard proteins used were ferritin (F), aldolase (A), ovablumin (O), chymotrypsinogen A (C), and ribonuclease A (R). Blue dextran (BD) was used to obtain the volume of the column. Inset: Dimerization of purified EFHC1C (~80 µg per lane) on a 10% SDS-PAGE stained with Coomassie, in the presence (+) and in the absence (c) of reducing agent. Protein oxidation allowed the detection of dimer state even in the presence of DTT (b).

tern blot analyses. The presence of the reducing agent DTT in the protein solution assures that the EFHC1C molecules are kept in their reduced forms with preserved sulfhydryl (-SH) groups in their three cysteine residues (Fig. 2). In the absence of DTT, EFHC1C undergoes dimerization in aerated solution, through the formation of disulfide bond, as already reported for other members of EF-hand superfamily [31,32].

Dimerization of EFHC1C was confirmed by high resolution SEC in the presence and absence of DTT (Fig. 4a). The Stokes' radii ( $R_s$ ) obtained were 31.6 ± 0.9 and 39 ± 1 Å for the monomer and dimer, respectively (Supplementary Fig. 4). As the calculated molar mass based on the amino acid sequence of EFHC1C is ~27 kDa, these results suggest that EFHC1C is a non-globular protein.

Mass spectra of the monomeric and dimeric forms of EFHC1C are shown in Fig. 4b and c. It can be seen that the mass obtained for the expected dimer (55,489.2 Da) is approximately twice the mass of the monomer (27,744.6 Da), supporting the evidences of dimerization in the absence of DTT, shown in Fig. 4a.

## MS of disulfide-linked peptide and determination of free cysteine with DTNB

In order to know which of the cysteine residues of the protein forms intermolecular or intramolecular disulfide bonds, EFHC1C dimer was isolated in non-reducing SDS–PAGE and the corresponding band was subjected to in-gel digestion with trypsin in two different conditions: reduction by DTT, followed by alkylation with iodoacetamide; and with no treatment. ESI-MS/MS peak lists of the tryptic peptides were analyzed with the aid of SearchXLinks program. In the reduced and alkylated sample, it was observed a signal at mass/charge ratio (m/z) 646.25 and at m/z 905.39, which can be assigned to alkylated peptides 572–576 (DHSCK) and 621–628 (MCSHGEGK), respectively (Table 1). The second cysteine residue (Cys603) was not detected.

In the oxidized sample, a peak with *m*/z 848.37 was observed, which can be assigned to peptide 621–628 (MCSHGEGK). Also, a peak *m*/z at 1175.45 was detected and can be assigned to the dimer formed by the intermolecular disulfide bond (Cys575–Cys575) between the peptide 572–576 (DHSCK) of the first chain, with the same peptide of the second chain (Table 1). Again, the peptide that should contain the Cys603 was not detected at all and no intramolecular disulfide-linked peptide was identified. In addition, the evidence that there is no internal disulfide bond is also supported by the identification of the last cysteine (Cys622) residue-containing peptide (MCSHGEGK).

Reactions with excess DTNB were performed in PBS to determine how many free cysteines are present per molecule of protein and, therefore, the number of potential dimerization sites. Although EFHC1C has three cysteine residues, DTNB assay showed just one accessible free thiol per molecule, even after DTT treatment. This single free thiol is likely to be Cys575, which is involved in the disulfide bonding. As mass spectrometry indicates that there is no internal disulfide bond, a possible interpretation for this result is that the two cysteine residues (Cys603 and Cys622) can not be detected by DTNB because they are located in an inaccessible site, as already observed in the case of BSA [33].

## Stoichiometry and thermodynamics of EFHC1C: divalent ion binding

Fig. 5 shows representative thermograms of the titration of EFHC1C solution with Ca2+ (a and c) and Mg2+ (b and d) solutions in the presence and absence of DTT, respectively. The only model which fit the experimental data was the single site binding model. In all titrations, the binding process was exothermic. In addition, it can be seen that the interaction between Ca2+ and EFHC1C is enthalpically driven ( $\Delta H = -58.6$  to -67 kJ/mol and  $T\Delta S = -22.5$ to -31 kJ/mol) while the interaction between Mg2+ and EFHC1C involves an entropic gain, and is ~5 times less enthalpically favorable ( $\Delta H = -11.7$  to -14 kJ/mol and  $T\Delta S = 21.9$  to 19 kJ/mol) than for Ca2+. It must be noted that, in general, metal binding to proteins is an endothermic process ( $\Delta H > 0$ ). However, the process may become exothermic ( $\Delta H < 0$ ) depending on changes in protein conformation [34]. Thus, the observed larger exothermic gain in the Ca2+-EFHC1C interaction relative to Mg2+-EFHC1C interaction may indicate that Ca2+ binding is associated with a higher degree of EFHC1C conformational change, like calmodulin, the most prominent member of the Ca2+-sensing EF-hand proteins. In contrast to Ca2+-buffer proteins, Ca2+-sensors change their conformation upon Ca2+-binding, thereby enabling their interaction with intracellular targets [5]. As observed by Suzuki et al. [1], full EFHC1 coimmunoprecipitates with the C-terminus of the Ca2+ channel Ca,2.3.

ITC data also shows that under reducing condition (in the presence of DTT) EFHC1C binds to Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> ions in a 1/1 molar ratio, showing that the stoichiometry of the reaction between reduced EFHC1C, in its monomeric form, and Ca<sup>2+</sup> or Mg<sup>2+</sup> ions is 1:1. It is not currently known if the EF-hand motif of human EFHC1 occurs in adjacent pairs or not, but secondary structure prediction (Fig. 2) shows two sets of helix–loop–helix in tandem, indicating that it is likely a pair of motifs. Thus, if the second EF-hand exists at all it is non-functional. Another example of a rare single functional EF-hand is found in the C-terminal domain of Ca<sub>v</sub>1.2 subunit of the voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channel of myocytes [35], which probably plays a role in Ca<sup>2+</sup> homeostasis. Under oxidizing condition (in the absence of DTT), the Ca<sup>2+</sup> or Mg<sup>2+</sup>/EFHC1C molar ratio was reduced to ~0.3 (Table 2), what means that the amount of EFHC1C capable of binding to Ca<sup>2+</sup> or Mg<sup>2+</sup> was reduced, relative

Ta	ble	1
1911.		

Theoretical and observed m/z of tryptic peptides calculated by SearchXLinks program

Condition	Peptide from-to	Theoretical m/z	Observed m/z	Error (ppm)	Sequence
Single molecule (non-reduced)	572-576	588.23	-	-	DHSCK
	602-616	1629.83	10000		ICESLN VPV DD SLVK
	621-628	848.34	848.37	30	MCSHGEGK
Intrapeptide cross-link (non-reduced)	572-576, 602-616	2217.51	-	-	DHSCK, ICESLNVIVDDSLVK
	572-576, 621-628	1434.60	-	-	DHSCK, MCSHGEGK
	602-616, 621-628	2476.84	-	-	ICESLNVPVDDSLVK, MCSHGEGK
Interpeptide cross-link (non-reduced)	572-576, 572-576	1175.43	1175.45	22	DHSCK, DHSCK
	572-576, 602-616	2217.51	-	-	DHSCK, ICESLNVPVDDSLVK
	572-576, 621-628	1434.60	-	-	DHSCK, MCSHGEGK
	602-616, 602-616	3259,74	-	-	ICESLNVPVDDSLVK, ICESLNVPVDDSLVK
	602-616, 621-628	2476.84	-	-	ICESLNVPVDDSLVK, MCSHGEGK
Single molecule (reduced and alkylated)	572-576	646.26	646.25	12	DHSCK
	602-616	1686.85	-	-	<b>ICESLNVPVDDSLVK</b>
	621-628	905.36	905.39	22	MCSHGEGK





Fig. 5. ITC thermograms of the divalent ion binding to EFHC1C. Calorimetric titration of 24 × 10 µL aliquots of 1.5 mM CaCl<sub>2</sub> (a), and 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> (b), into 70 µM EFHC1C in 20 mM Tris-HCL 50 mM NaCl (pH 7.5), 1 mM 0TT; and titration of 40 × 4 µL aliquots of 1.5 mM CaCl<sub>2</sub> (c), and 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> (d), into 70 µM EFHC1C in 20 mM Tris-HCL 50 mM NaCl (pH 7.5), without DTT. Titrations were performed at 25 °C. The upper panel in each frame represents the raw data, whereas the lower panel stands for the fitted data.

to the amount of EFHC1C considered as being in the monomeric form (used in the calculation). The reduction in the amount of EFHC1C capable of binding to  $Ca^{24}$  or  $Mg^{2+}$  is in accordance with the partial dimerization of EFHC1C (as shown by MS and SEC)

and shows that EFHC1C dimerization blocks  $\mbox{Ca}^{2+}$  or  $\mbox{Mg}^{2+}$  ions binding.

Although  $Ca^{2+}$  binding to proteins is often selective,  $Mg^{2+}$  may be an effective competitor for the  $Ca^{2+}$  sites, which may result in

Thermodynamic parameters for binding of EFHCIC with Ca** or Mg	*

Experiment	N	<i>K</i> <sub>d</sub> (μM)	Δ <i>H</i> (k]/m ol)	TAS (Id/mol)	ΔG (kJ/mol)
Binding of Ca <sup>2+</sup> to apo-EFHCIC + DTT	0.9±0.1	0.5±0.1	-58.6±0.4	-22.5±0.7	-36.1±0.3
Binding of Mg2* to apo-EFHCIC + DTT	$0.9 \pm 0.1$	$1.3 \pm 0.1$	$-11.7 \pm 0.1$	21.9±0.2	-33.6±0.1
Binding of Ca2* to apo-EFHCIC	$0.3 \pm 0.1$	0.5 ± 0.1	-67±2	-31±2	-35.7±0.3
Binding of Mg2* to apo-EFHCIC	0.3 ± 0.1	1.8±0.3	-14±1	19±1	-32.8 ± 0.4

Thermodynamic data generated by ITC at pH 7.5 in 20 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl with and without 1 mM DTL All experiments were performed, at 25 °C.

inhibition, given that the concentration of Mg2+ inside cells is much higher than that of  $Ca^{2+}$  [36]. However, the Gibbs free energies ( $\Delta G$ ) calculated for the  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  binding processes were negative in both cases (Table 2), showing that both ions have high affinity for the EF-hand of EFHC1C. The calculated dissociation constant (K<sub>d</sub>) for Ca<sup>2+</sup>-binding (0.5  $\pm$  0.1  $\mu$ M) was ~2.5 times lower than that for Mg2+-binding (1.3 ± 0.1 µM) to EF-hand under reducing condition (Table 2). In the absence of DTT, the K<sub>d</sub> for Ca<sup>2+</sup>-binding  $(0.5 \pm 0.1 \,\mu\text{M})$  was ~3.5 times lower than the calculated value for Mg<sup>2+</sup>-binding (1.8 ± 0.3  $\mu$ M). The difference observed in K<sub>d</sub> shows a higher affinity for Ca2+ than Mg2+ both in the presence and in the absence of DTT (Table 2).

## Conclusions

Most of the genes responsible for IGEs identified so far encode ion channel proteins [37]. EFHC1 gene is one in a few that is a non-ion channel protein related to epilepsy. We report here the first structural and thermodynamic analyses of human EFHC1C-terminus (referred as EFHC1C), containing the last DM10 domain and the EF-hand motif. The target protein was expressed mainly in the soluble form and purification protocol including tag removal was successfully established. The final purified protein presented high stability. The secondary structure was measured by CD spectroscopic, showing 34% of α-helices and 17% of β-strands. It was demonstrated that the protein can form dimers in the absence of DTT. Tandem mass spectrometry (MS/MS) analysis with the help of SearchXLinks program suggests that Cys575 participates in intermolecular S-S bond formation. In addition, DTNB assay showed that reduced EFHC1C has only one accessible free thiol per molecule. ITC data showed that reduced EFHC1C binds to just one divalent ion (Ca2+ or Mg2+); whereas, in an oxidized (dimeric) state EFHC1C has its ion binding site blocked.

To date, it is not clear if EFHC1 is a Ca2+-sensor or a Ca2+-buffer protein. However, full EFHC1 presents 19% identity and 44% similarity with the Ca2+-regulator calmodulin, the classical example of EF-hand protein that suffers conformational changes after ion binding [22]. Additional experiments should be performed in order to better determine the influence of Ca2+ or Mg2+ binding in EFHC1C dimerization process. Whether dimerization is a physiological conformation remains to be elucidated.

Finally, crystallization trials are in progress in our laboratory in order to determine the three-dimensional structure of EFHC1C, and hopefully shedding light into DM10 domain function in JME.

## Acknowledgments

The use of the CD and NMR facilities at Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS) are acknowledged, as well as Dr. Watson Loh, Head of the Calorimetry Facility at Institute of Chemistry of Unicamp. This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP: 04/03600-0 I.L.-C. and 05/03234-6 R.A.). M.J.M. is recipient of fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). LL-C. is a recipient of a research fellowship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.abb.2008.06.008.

## References

- T. Suzuki, A.V. Delgado-Escueta, K. Aguan, M.E. Alonso, J. Shi, Y. Hara, M. Nishida, T. Numata, M.T. Medina, T. Takeuchi, R. Morita, D. Bai, S. Ganesh, Y. Sugimoto, J. Inazawa, J.N. Bailey, A. Ochoa, A. Jara-Prado, A. Rasmussen, J. Ramos-Peek, S. Cordova, F. Rubio-Donnadieu, Y. Inoue, M. Osawa, S. Kaneko, H. Oguni, Y. Mori, K. Yamakawa, Nat. Genet. 36 (2004) 842-849.
- M. Gardiner, Epilepsia 46 (Suppl. 9) (2005) 15–20.
  T. Ikeda, K. Ikeda, M. Enomoto, M.K. Park, M. Hirono, R. Kamiya, FEBS Lett. 579 (2005) 819-822.
- [4] L. de Nijs, B. Lakayea, B. Coumansa, C. Léona, T. Ikeda, A.V. Delgado-Escueta, T. Grisar, G. Chanasa, Exp. Cell Res. 312 (2006) 2872-2879 K-H. Braunewell, E.D. Gundeffinger, Cell Tissue Res 295 (1999) 1–12. U.K. Laemmli, Nature 227 (1970) 680–685. 151
- [6]
- RK. Scopes, Anal. Biochem. 59 (1974) 277-282. A. Shevchenko, M. Wilm, O. Vorm, M. Mann, Anal. Chem. 68 (1996) 850-858.
- [9] P.W. Riddles, R.I. Blakeley, B. Zerner, Methods Enzymol. 91 (1983) 49-60.
- L.M. Siegel, KJ. Monty, Biochim. Biophys. Acta 112 (1966) 346-362.M. Le Maire, E. Rivas, J.V. Moller, Anal. Biochem. 106 (1980) 12-21. [10]
- 111
- S.W. Provencher, J. Glockner, Biochemistry 20 (1981) 33-37. LH.M. van Stokkum, H.J.W. Spoelder, M. Bioemendal, R. van Grondelle, F.C.A. Groen, Anal. Biochem. 191 (1990) 110-118.
- P. Manavalan, W.C. Johnson Jr., Anal. Biochem. 167 (1987) 76–85.N. Sreerama, R.W. Woody, Anal. Biochem. 282 (2000) 252–260.
- [16] R.S. Patel-King, O. Gorbatyuk, S. Takebe, S.M. King, Mol. Biol. Cell 15 (2004) 3891-3902.
- [17] A. Munier, C. Serres, M. Kann, M. Boissan, C. Lesaffre, J. Capeau, J. Fouquet, M. Lacombe, Exp. Cell Res. 289 (2003) 295-306 [18] R.S. Patel-King, S.E. Benashski, S.M. King, J. Biol. Chem. 277 (2002) 34271-
- 34279.
- [19] K. Ikeda, J.A. Brown, T. Yagi, J.M. Norrander, M. Hirono, E. Eccleston, R. Kamiya, R.W. Linck, J. Biol. Chem. 278 (2003) 7725–7734. [20] S.M. King, Cell Motil. Cytoskeleton 63 (2006) 245-253.
- A Lewit-Bentley, S. Réty, Curr. Opin. Struct. Biol. 10 (2000) 637–643. Z. Grabarek, J. Mol. Biol. 359 (2006) 509–525.
- [23] S. Bhattacharya, C.G. Bunick, W.J. Chazin, Biochim. Biophys. Acta 1742 (2004) 69 - 79
- [24] N.J. Skelton, J. Kördel, M. Akke, S. Forsén, W.J. Chazin, Nat. Struct. Biol. 1 (1994) 239-245
- M.J. Berridge, P. Lipp, M.D. Bootman, Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 1 (2000) 11-21. [25]
- [26] I.B. Levitan, Neuron 22 (1999) 645–648.
  [27] R.D. Burgoyne, D.W. O'Callaghan, B. Hasdemir, L.P. Haynes, AV. Tepikin, Trends Neurosci. 27 (2004) 203-205
- [28] T.R. Butt, S.C. Edavettal, J.P. Hall, M.R. Mattern, Protein Expr. Purif. 43 (2005) 1-
- [29] M.J. Hunter, W.J. Chazin, J. Biol. Chem. 273 (1998) 12427-12435
- R. Donato, Biochim. Biophys. Acta 1450 (1999) 191-231. H. Todoroki, R. Kobayashi, M. Watanabe, H. Minami, H. Hidaka, J. Biol. Chem. 131 266 (1991) 18668-18673.
- [32] B.W. Schäfer, J.M. Fritschy, P. Murmann, H. Troxler, I. Durussel, C.W. Heizmann, JA. Cox, J. Biol. Chem. 275 (2000) 30623-30630
- [33] J.M. Wilson, D. Wu, R. Motiu-DeGrood, D.J. Hupe, J. Am. Chem. Soc. 102 (1980) 359-363.
- [34] A.P. Yamniuk, L.T. Nguyen, T.T. Hoang, H.J. Vogel, Biochemistry 43 (2004) 2558-2568 [35] S. Brunet, T. Scheuer, R. Klevit, W.A. Catterall, L.Gen, Physiol, 126 (2005) 311-
- 323.
- JL. Gifford, M.P. Walsh, H.J. Vogel, Biochem. J. 405 (2007) 199-221. J. Tumbull, H. Lohi, J.A. Kearney, G.A. Rouleau, A.V. Delgado-Escueta, M.H.
- Meisler, P. Cossette, B.A. Minassian, Hum. Mol. Genet. 14 (2005) 2491-2500.

# 4.3.4 - Conclusão

Uma importante etapa no desenvolvimento de fármacos é a compreensão dos fenômenos biológicos nas escalas molecular e celular. Os resultados deste trabalho mostraram que moléculas da proteína EFHC1C ligam tanto íons Ca<sup>2+</sup> quanto Mg<sup>2+</sup> numa estequiometria de 1:1, contudo, com afinidades definidas por diferentes contribuições entálpica e entrópica. Também foi verificado que a EFHC1C perde sua capacidade de interação pelos íons cálcio e magnésio devido, provavelmente, a sua dimerização através da formação de uma ligação dissulfeto em processos oxidativos. Estes novos conhecimentos sobre a o comportamento da EFHC1C podem ser úteis na compreensão do mecanismo de ação da epilepsia mioclônica juvenil e no planejamento de novos fármacos e novas estratégias para o seu tratamento.



"Our moral responsibility is not to stop the future, but to shape it..."

## Alvin Toffler

A titulação calorimétrica isotérmica tem ganhado destaque continuamente nos laboratórios de pesquisa e na indústria. Neste aspecto, este trabalho permitiume o aprofundamento teórico e experimental desta técnica aplicada tanto em um sistema químico quanto em sistemas bioquímicos. O estágio realizado no laboratório do Prof. John Ladbury, a apresentação dos resultados deste trabalho em congressos e sua discussão com especialistas permitiram-me amadurecer nestes anos o conhecimento da titulação calorimétrica isotérmica. A correlação entre os dados termodinâmicos e estruturais dos sistemas estudados é uma exigência dos profissionais da calorimetria, principalmente, frente aos desafios do futuro próximo. Neste sentido, recomenda-se o aperfeiçoamento teórico e experimental de técnicas estruturais durante a formação dos profissionais em calorimetria.

Em particular, os resultados deste trabalho revelaram que a S-nitrosação é entalpicamente dirigida nas condições em que foi estudada e ocorre com características termodinâmicas semelhantes apesar das diferenças estruturais dos tióis estudados. Verificou-se que a proteína EFHC1C liga-se tanto a íons Ca<sup>2+</sup> quanto Mg<sup>2+</sup> numa estequiometria de 1:1 e com afinidades definidas por diferentes contribuições entálpica e entrópica. Este dado confirmou a existência de um domínio EF-hand previsto pela seqüência primária da EFHC1C. Por outro lado, a EFHC1C perde sua capacidade de interação com íons cálcio e magnésio em solução sem 1,4-ditiotreitol (DTT), provavelmente, devido à formação de dímeros. Os resultados de ITC demonstraram ausência de sinal térmico na mistura entre as proteínas Shc e as proteínas GST e CypA, indicando que muito provavelmente elas não interagem nas condições estudadas.



**1**. Jelesarov, I.; Bosshard, H. R.. Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition. *J. Mol. Recognit.* **1999**, 12, 3-18.

2. Wiseman, T.; Williston, S.; Brandts, J. F.; Lin, L. N.. Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. <u>Anal.</u> <u>Biochem.</u> 1989, 179, 131-137.

3. Salim, N. N.; Feig, A. L. Isothermal titration calorimetry of RNA. <u>Methods</u> 2009, 47, 198-205.

**4**. Buurma, N. J.; Haq, I.. Advances in the analysis of isothermal titration calorimetry data for ligand–DNA interactions. *Methods* **2007**, 42, 162-172.

**5**. Eisenstein, E.; Yu, H. D.; Schwarz, F. P.. Cooperative binding of the feedback modifiers isoleucine and value to biosynthetic threonne deaminase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 29423-29429.

**6**. Hyre, D. E.; Spicer, L. D.. Thermodynamic evaluation of binding interactions in the methionine repressor system of *Escherichia coli* using isothermal titration calorimetry. *Biochemistry* **1995**, 34, 3212-3221.

7. Gopal, B.; Swaminathan, C. P.; Bhattacharya, S.; Bhattacharya, A., Murthy, M. R.; Surolia, A.. Thermodynamics of metal ion binding and denaturation of a calcium binding protein from Entamoeba histolytica. *Biochemistry* **1997**, 36, 10910-10916.

**8**. Turnbull, W. B.; Daranas, A. H.. On the value of c: can low affinity systems be studied by isothermal titration calorimetry? *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 14859-14866.

**9**. Doyle, M. L., Louie, G., Dal Monte, P. R.; Sokoloski, T. D.. Tight binding affinities determined from thermodynamic linkage to protons by titration calorimetry. *Methods Enzymol.* **1995** 259, 183-194.

**10**. Kavanoor, M.; Eftink, M. R.. Characterization of the role of side-chain interactions in the binding of the ligands to apo trp repressor: pH dependence studies. *Biophys. Chem.* **1997**, 66, 43-55.

**11**. Khalifah, R. G.; Zhang, F.; Parr, J. S.; Rowe, E. S.. Thermodynamics of binding of the CO<sub>2</sub>-competitive inhibitor imidazole and related compounds to human carbonic anhydrase I: an isothermal titration calorimetry approach to studying weak binding by displacement with strong inhibitors. *Biochemistry* **1993**, 32, 3058-3066.

**12**. Velazquez-Campoy, A.; Freire, E.. Isothermal titration calorimetry to determine association constants for high-affinity ligands. *Nat. Protoc.* **2006**, 1, 186-191.

13. Velazquez-Campoy, A.; Freire, E.. ITC in the post-genomic era... ? Priceless. *Biophys. Chem.* 2005 115, 115-124.

**14**. Chervenak, M. C.; Toone, E. J.. A direct measure of the contribution of solvent reorganization to the enthalpy of ligand binding. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 10533-10539.

**15**. Connelly, P. R.; Thomson, J. A.; Fltzgibbon, M. J.; Bruzzese, F. J.. Probing hydration contributions to the thermodynamics of ligand binding by proteins. Enthalpy and heat capacity changes of tacrolimus and rapamycin binding to FK506 binding protein in D2O and H2O. *Biochemistry* **1993**, 32, 5583-5590.

**16**. Ladbury, J. E.. Just add water: the effect of water on the specificity of proteinligand binding sites and its potential application to drug design. *Chem. Biol.* **1996**, 3, 973-980.

**17**. Bhat, T. N.; Bentley, G. A.; Boulot, G.; Greene, M. I.; Tello, D.; Dall'Acqua, W.; Souchon, H.; Schwarz, F. P.; Mariuzza, R. A.; Poljak, R. J.. Bound water molecules and conformational stabilization help mediate an antigen-antibody association. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 1089-1093.

**18**. Holdgate, G. A.; Tunnicliffe, A.; Ward, W. H.; Weston, S. A.; Rosenbrock, G.; Barth, P. T.; Taylor, I. W.; Pauptit, R. A.; Timms, D.. The entropic penalty of ordered water accounts for weaker binding of the antibiotic novobiocin to a resistant mutant of DNA gyrase: a thermodynamic and crystallographic study. *Biochemistry* **1997**, 36, 9663-9673.

**19**. Kornblatt, J. A.; Kornblatt, M. J.; Hoa, G. H. B.; Mauk, A. G.. Responses of two protein-protein complexes to solvent stress: does water play a role at the interface. *Biophys. J.* **1993**, 65, 1059-1065.

**20**. Jelesarov, I.; Bosshard, H. R.. Thermodynamics of ferredoxin binding to ferredoxin:NADP<sup>+</sup> reductase and the role of water at the complex interface. <u>*Biochemistry*</u> **1994**, 33, 13321-13328.

**21**. Lundbäck, T; Hansson, H.; Knapp, S.; Ladenstein, R.; Hard, T.. Thermodynamic characterization of non-sequence-specific DNA-binding by the Sso7d protein from Sulfolobus solfactorius. *J. Mol Biol.* **1998**, 276, 775-786.

**22**. Jen-Jacobson, L.; Engler, L. E.; Jacobson, L. A.. Structural and thermodynamic strategies for site-specific DNA binding proteins. *Structure* **2000**, 8, 1015-1023.

**23**. Raman, C. S.; Allen, M. J.; Nall, B. T.. Enthalpy of antibody - cytochrome-c binding. *Biochemistry* **1995**, 34, 5831-5838.

24. Dunitz, J. D.. Win some, lose some. Enthalpy-entropy compensation in weak intermolecular interactions. *Chem. Biol.* 1995, 2, 709-712.

**25**. van Oss, C. J.; Kinetics and energetics of specific intermolecular interactions. <u>*J*</u> <u>*Mol. Recognit.*</u> **1997**, 10, 203-218.

**26**. Chaires, J. B.. Possible origin of differences between vant't Hoff and calorimetric enthalpy estimates. *Biophys. Chem.* **1997**, 64, 15-23.

**27**. Christensen, J. J.; Hansen, L. D.; Izatt, R M.. Handbook of Proton Ionization Heats and Related Thermodynamic Quantities, Wiley: New York, 1976.

**28**. Stutervant, J. M.. Heat capacity and entropy changes in process involving proteins. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, 74, 2236-2240.

**29**. Gomez, J.; Hilser, V. J.; Xie, D.; Freire, E.. The heat capacity of proteins. *Proteins*, **1995**, 22, 404-412.

**30**. Makhatadze, G. I.; Privalov, P. L.. Energetics of protein structure. <u>Adv. Protein</u> <u>Chem.</u> **1995**, 47, 307-425.

**31**. Murphy, K. P.; Freire, E.. Thermodynamics of structural stability and cooperative folding behavior in proteins. *Adv. Protein Chem.* **1992**, 43 313-361.

**32**. Spolar, R.; Livingstone, J.; Record, M. T.. Use of liquid hydrocarbon and amide transfer data to estimate contributions to protein folding. *Biochemistry* **1992**, 31, 3947-3955.

**33**. Privalov, P.; Makhatadze, G.. Contribution of hydration to protein folding thermodynamics - I: the enthalpy of hydration. *J. Mol. Biol.* **1993**, 232, 639-659.

**34**. Privalov, P.; Makhatadze, G.. Contribution of hydration to protein folding thermodynamics - II: the entropy and Gibbs free energy of hydration. *J. Mol. Biol.* **1993**, 232, 660-679.

**35**. Madan, B.; Sharp, K. A.. Heat capacity changes accompanying hydrophobic and ionic salvation: a Monte Carlo and random network model study. <u>J. Phys.</u> <u>Chem.</u> **1996**, 100, 7713-7721.

**36**. Madan, B.; Sharp, K. A.. Molecular origin of hydration heat capacity changes of hydrophobic solutes: perturbation of water structure around alkanes. *J. Phys. Chem. B* **1997**, 101, 11237-11242.

**37**. Sharp, K. A.; Madan, B.. The hydrophobic effect, water structure and heat capacity changes. *J. Phys. Chem.* **1997**, 101, 4343-4348.

**38**. Freire, E.; Forces and factors that contribute to the structural stability of membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, 1241, 295-322.

**39**. Makhatadze, G.; Privalov, P.. Partial molar heat capacity of individual amino acid residues in aqueous solution: hydration effect. *J. Mol. Biol.* 1990, 213, 375-384.

**40**. Privalov, P. L.; Potekhin, S. A.. Scanning microcalorimetry in studying temperature-induced changes in proteins. *Methods Enzymol.* **1986**, 131, 4-51.

**41**. Patikoglou, G., Burley, S. K.. Eukaryotic transcription factor-DNA complexes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1997**, 26, 289-325.

**42**. Ross, C. A.; Poirier, M. A.. Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **2004**, S10 - S17.

. Kardos, J.; Yamamoto, K.; Hasegawa, K.; Naiki, H.; Goto, Y.. Direct measurement of the thermodynamic parameters of amyloid formation by isothermal titration calorimetry. *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 55308-55314.

44.Aktas, M.; Auguste, D.; Lefebvre, H. P.; Toutain, P. L.; Braun, J. P.. Creatine kinase in the dog: A review. *Veter. Res. Comm.* 1993, 17, 353-369.

. Liang, Y.; Du, F.; Sanglier, S.; Zhou, B. R.; Xia, Y.; Van Dorsselaer, A.; Maechling, C.; Kilhoffer, M. C.; Haiech, J.. Unfolding of rabbit muscle creatine kinase induced by acid: a study using electrospray ionization mass spectrometry, isothermal titration calorimetry, and fluorescence spectroscopy. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 30098-30105.

. Liang, Y.. Applications of isothermal titration calorimetry in protein folding and molecular recognition. *J. Iran. Chem. Soc.* **2006**, 3, 209-219.

. Feig, A. L.. Applications of isothermal titration calorimetry in RNA biochemistry and biophysics. *Biopolymers* **2007**, 87, 293-301.

. Mikulecky, P. J.; Takach, J. C.; Feig, A L.. Entropy-driven folding of an RNA helical junction: an isothermal titration calorimetric analysis of the hammerhead ribozyme. *Biochemistry* **2004**, 43, 5870-5881.

**49**. Yang, F.; Zhou, B. R.; Zhang, P.; Zhao, Y. F.; Chen, J.; Liang, Y.. Binding of ferulic acid to cytochrome c enhances stability of the protein at physiological pH and inhibits cytochrome c-induced apoptosis. *Chem. Biol. Interact.* **2007**, 170, 231-243.

. Bianconi, M. L.; Calorimetric determination of thermodynamic parameters of reaction reveals different enthalpic compensations of the yeast hexokinase isozymes. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 18709-18713.

. Wilcox, D. E.. Isothermal titration calorimetry of metal ions binding to proteins: an overview of recent studies. *Inorg. Chim. Acta* **2008**, 361, 857-867.

. Beyersmann, D.; Haase, H.. Functions of zinc in signaling, proliferation and differentiation of mammalian cells. *BioMetals* **2001**, 14, 331-341.

. Chao, Y.; Fu, D.. Thermodynamic studies of the mechanism of metal binding to the Escherichia coli zinc transporter YiiP. *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 17173-17180.

**54**. DiTusa, C. A.; McCall, K. A.; Christensen, T.; Mahapatro, M.; Fierke, C. A.; Toone, E. J.. Thermodynamics of metal ion binding. 2. metal ion binding by carbonic anhydrase variants. *Biochemistry* **2001**, 40, 5345-5351.

**55**. Lachenmann, M. J., Ladbury, J. E.; Qian, X. Q.; Huang, K.; Singh, R.; Weiss, M. A.. Solvation and the hidden thermodynamics of a zinc finger probed by nonstandard repair of a protein crevice. *Protein Sci.* **2004**, 13, 3115-3126.

**56**. Lachenmann, M. J.; Ladbury, J. E.; Phillips, N. B.; Narayana, N.; Qian, X. Q.; Stern, A. S.; Weiss, M. A.. The hidden thermodynamics of a zinc finger. <u>J. Mol.</u> <u>Biol.</u> **2002**, 316, 969-989.

57. Chaires, J. B.. Calorimetry and thermodynamics in drug design. <u>Annu. Rev.</u> <u>Biophys.</u> 2008, 37, 135-151.

**58**. Ohtaka, H.; Muzammil, S.; Schön, A.; Velazquez-Campoy, A.; Vega, S.; Freire, E.. Thermodynamic rules for the design of high affinity HIV-1 protease inhibitors with adaptability to mutations and high selectivity towards unwanted targets. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2004**, 36, 1787-1799.

**59**. Arnaud, A.; Bouteiller, L.. Isothermal titration calorimetry of supramolecular polymers. *Langmuir* **2004**, 20, 6858-6863.

**60**. Davis, M. E.; Brewster, M. E.. Cyclodextrin-based pharmaceutics: past, present and future. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2004**, 3, 1023-1035.

**61**. Bouchemal, K.. New challenges for pharmaceutical formulations and drug delivery systems characterization using isothermal titration calorimetry. <u>*Drug Discovery Today*</u> **2008**, 13, 960-972.

**62**. Liu, Y.; Cao, R.; Chen, Y.; He, J. Y.. Effect of  $\beta$ -cyclodextrin charge type on the molecular recognition thermodynamics of reactions with (ferrocenylmethyl)dimethylaminium derivatives. *J. Phys Chem. B* **2008**, 112, 1445-1450.

**63**. Denadai, A. M. L.; Santoro, M. M.; da Silva, L. H.; Viana, A. T.; Santos, R. A. S.; Sinisterra, R. D.. Self-assembly characterization of the  $\beta$ -cyclodextrin and hydrochlorothiazide system: NMR, phase solubility, ITC and QELS. <u>J. Incl.</u> <u>Phenom. Macrocyclic. Chem.</u> **2006** 55, 41-49.

**64**. Teixeira, L. R.; Sinisterra, R. D.; Vieira, R. P.; Scarlatelli-Lima, A.; Moraes, M. F. D.; Doretto, M. C.; Denadai, A. M.; Beraldo, H.. An inclusion compound of the anticonvulsant sodium valproate into a  $\alpha$ -cyclodextrin: physico-chemical characterization. *J. Incl. Phenom. Macrocyclic. Chem.* **2006** 54, 133-138.

**65**. Sun, D. Z.; Li, L.; Qiu, X. M.; Liu, F.; Yin, B. L.. Isothermal titration calorimetry and H-1 NMR studies on host-guest interaction of paeonol and two of its isomers with beta-cyclodextrin. *Int. J. Pharm.* **2006**, 316, 7-13.

66. Rekharsky, M. V.; Inoue, Y.. Complexation thermodynamics of cyclodextrins. *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1875-1917.

**67**. Liu, Y.; Yang, Y.W.; Cao, R.; Song, S.H.; Zhang, H.Y.; Wang, L.H.. Thermodynamic origin of molecular selective binding of bile salts by aminated  $\beta$ -cyclodextrins. *J. Phys. Chem. B* **2003**, 107, 14130-14139.

**68**. Eising, R.; Morés, S.; Bellettini, I. C.; Felippe, A. C.; Dal-Bó, A. G.; Zanette, D.. Formação de micelas mistas entre o sal biliar colato de sódio e o surfactante aniônico dodecanoato de sódio. *Química Nova* **2008**, 31, 2065-2070.

**69**. Heerklotz, H.; Seelig, J.; Titration calorimetry of surfactant-membrane partitioning and membrane solubilisation. *Biochim. Biophys. Acta*, **2000**, 1508, 69-85.

**70**. Avital, S.; Brumfeld, V.; Malkin, S.. A micellar model system for the role of zeaxanthin in the non-photochemical quenching process of photosynthesis - chlorophyll fluorescence quenching by the xanthophylls. *Biochim. Biophys. Acta*, **2006**, 1757, 798-810.

**71**. Kumar, P. S.; Lakshminarayanan, V.. Electron-transfer studies in a lyotropic columnar hexagonal liquid crystalline medium. *Langmuir* **2007**, 23, 1548-1554.

**72**. le Maire, M.; Champeil, P.; Moller, J. V.. Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. *Biochim. Biophys. Acta*, **2000**, 1508, 86-111.

**73**. Patel, R.; Buckton, G.; Gaisford, S.. The use of isothermal titration calorimetry to assess the solubility enhancement of simvastatin by a range of surfactants. *Thermochim. Acta* **2007**, 456, 106-113.

74. Shuji Saito in *Nonionic Surfactants: Physical Chemistry* (M. J. Schick, ed.) Surfactant Science Series. No 23, Marcel Dekker: New York, 1987.

**75**. Olofsson, G.; Wang, G.. Interactions between surfactants and uncharged polymers in aqueous solution studied by microcalorimetry. *Pure Appl. Chem.* **1994**, 66, 527.

**76**. da Silva, R. C.. Aplicação de calorimetria ao estudo da interação entre polímeros não iônicos e surfatantes iônicos. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2002.

77. Diab, C.; Winnik, F. M.; Tribet, C.. Enthalpy of interaction and binding isotherms of non-ionic surfactants onto micellar amphiphilic polymers (amphipols.). *Langmuir* 2007, 23, 3025-3035.

**78**. Wang, C.; Tam, K. C.. New insights on the interaction mechanism within oppositely charged polymer/surfactant systems. *Langmuir* **2002**, 18, 6484-6490.

**79**. Onesippe, C.; Lagerge, S.. Study of the complex formation between sodium dodecyl sulfate and chitosan. *Colloid Surf. A* **2008**, 317, 100-108.

**80**. Bai, G; Gonçalves, C.; Gama, F. M.; Bastos, M.. Self-aggregation of hydrophobically modified dextrin and their interaction with surfactant. *Thermochim. Acta* **2008**, 467, 54-62

**81**. Moosavi-Mohahedi, A. A.; Golchin, A. R.; Nazari, K.; Chamani, J.; Saboury, A A.; Bathaie, S. Z.; Tangestani-Nejad, S.. Microcalorimetry, energetic and binding studies of DNA-dimethyltin dichloride complexes. *Thermochim. Acta* **2003**, 414, 233-241.

**82**. Xiang, J.; Fan, J. B.; Chen, N.; Chen, J.; Liang, Y.. Interaction of cellulase with sodium dodecyl sulfate at critical micelle concentration level. <u>*Colloid Surf. B*</u> **2006**, 49, 175-180.

**83**. Effect of Tween 20<sup>®</sup> and Tween 80<sup>®</sup> on the stability of albutropin during agitation . *J. Pharm. Sci.* **2005**, 94, 1368-1381.

**84**. Kelley, D.; McClements, D. J.. Interactions of bovine serum albumin with ionic surfactants in aqueous solutions. *Food Hydrocolloids* **2003**, 17, 73-85.

. Dai, W. G.; Dong, L. C.. Characterization of physiochemical and biological properties of an insulin/lauryl sulfate complex formed by hydrophobic ion pairing. *Int. J. Pharm.* **2007**, 336, 58-66.

. Nielsen, A. D. Arleth, L.; Westh, P.. Analysis of protein-surfactant interactions – a titration calorimetric and fluorescence spectroscopic investigation of interactions between Humicola insolens cutinase and an anionic surfactant. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, 1752, 124-132.

87. Liu, Y.; Guo, R.. Interaction between casein and the oppositely charged surfactant. *Biomacromolecules* 2007, 8, 2902-2908.

88. Liu, Y.; Guo, R.. Interaction between casein and sodium dodecyl sulfate. <u>J.</u> <u>Colloid Interf. Sci.</u> 2007, 315, 685-692.

. Kohane, D. S.. Microparticles and nanoparticles for drug delivery. *Biotechnol. Bioeng*. **2007**, 96, 203-209.

**90**. Dickinson, E.. Colloid science of mixed ingredients. *Soft Matter* **2006**, 2, 642-652.

. Haug, I. J.; Draget, K. I.; Smidsrod, A.. Physical behaviour of fish gelatinkappa-carrageenan mixtures. *Carbohydr. Polym.* **2004**, 56, 11-19.

. Wetting, S. D.; Wang, C.; Verall, R. E.; Foldvari, M.. Thermodynamic and aggregation properties of aza- and imino-substituted gemini surfactants designed for gene delivery. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, 9, 871-877.

. Mascotti, D. P.; Lohman, T. M.. Thermodynamic extent of counterion release upon binding oligolysines to single-stranded nucleic acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, 87, 3142-3146.

. de Vries, R.; Stuart, M. C.. Theory and simulations of macroion complexation. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2006**, 11, 295-301.

. Wang, R.; Schmiedel, H.; Paulke, B. R.. Isothermal titration calorimetric studies of surfactant interactions with negatively charged, 'hairy' latex nanoparticles. *Colloid Polym. Sci.* **2004**, 283, 91-97.

**96**. De, M.; You, C. C.; Srivastava, S.; Rotello, V. M.. Biomimetic interactions of proteins with functionalized nanoparticles: A thermodynamic study. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 10747-10753.

**97**. Sassonia, R. C.. Estudo da termodinâmica de partição de polímeros hidrossolúveis em sistemas líquidos bifásicos. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2004.

**98**. Verhaegen, K; Van Gerven P, Baert K, Hermans L, Mertens R, Luyten W... Design of a high-throughput microphysiometer. In *Biocalorimetry: Applications of Calorimetry in the Biological Sciences*, ed. J. E. Ladbury, B. Z. Chowdhry, 227-231. New York: Wiley, 1998.

**99**. Yung, A.; Turnbull, W. B.; Kalverda, A. P.; Thompson, G. S.; Homans, S. W.; Kitov, P.; Bundle, D. R.. Large-scale millisecond intersubunit dynamics in the B subunit homopentamer of the toxin derived from *Escherichia coli* O157. <u>J. Am.</u> <u>Chem. Soc.</u> **2003**, 125, 13058-13062.

**100**. Talhout, R.; Villa, A.; Mark, A. E.; Engberts, J. B. F. N.. Understanding binding affinity: a combined isothermal titration calorimetry / molecular dynamics study of the binding of a series of hydrophobically modified benzamidinium chloride inhibitors to trypisin. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 10570-10579.

**101**. Homepage do fabricante: MicroCal - GE Healthcare: http://www.microcal.com/products/itc/vp-itc.asp.

102. VP-ITC Calorímetro, MicroCal, Manual do Usuário, 2001.

**103**. Wiseman, T.; Williston, S.; Brandts, J. F.; Lin, L. N.. Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. <u>Anal.</u> <u>Biochem.</u> **1989**, 179, 131-137.

**104**. Briggnner, L. E.; Wadsö, I. Test and calibration processes for microcalorimeters, with special reference to heat-conduction instruments used with aqueous systems. *J. Biochem. Biophys. Methods* **1991**, 22, 101-118.

**105**. Olofsson, G.; Berling, D.; Markova, N.; Molund, M. The dissolution of propan-1-ol and dilution of 10 wt.% propan-1-ol solution in water as calibration and test reactions in solution calorimetry. *Thermochim. Acta* **2000**, 347, 31-36.

**106**. George, R.; Schuller, A. C.; Harris, R.; Ladbury, J. E.; A phosphorylation dependent gating mechanism controls the SH2 domain interactions of the Shc adaptor protein. *J. Mol. Biol.* **2008**, .377, 740-747.

**107**. Board, P. G.; Coggan, M.; Chelvanayagam, G.; Easteal, S.; Jermiin, L. S.; Schulte, G. K.; Danley, D. E.; Hoth, L. R.; Griffoor, M. C.; Kamath, A. V.; Rosner, M. H.; Chrunyk, B. A.; Perregaux, D. E.; Gabel, C. A.; Geoghegan, K. F.; Pandit, J.. Identification, characterization, and crystal structure of the omega class glutathione transferases. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 32, 24798-24806.

**108.** Yoo, S.; Myszka, D. G.; Yeh, Chin-yah; McMurray, M.; Hill, C. P.; Sundquist, W. I.. Molecular recognition in the HIV-1 capsid/cyclophilin A complex. *J. Mol. Biol.* **1997**, .269, 780-795.

109. Feldman, P. L.; Griffith, O. W.; Stuehr, D. J.. The surprising life of nitricoxide. <u>*Chem. Eng. News*</u> 1993, 71, 26-38.

110. Granik, V. G.; Ryabova, S. Y.; Grigoriev, N. B.. Exogenous nitric oxide donors and inhibitors of its formation (the chemical aspects). *Russ. Chem. Rev.* 1997, 66, 717-807.

**111**. Culotta, E.; Koshland Jr., D. E.. NO news is good-news. <u>Science</u> **1992**, 258, 1862-1865.

**112.** Goldstein, S.; Czapski, G.. Mechanism of the nitrosation of thiols and amines by oxygenated center dot NO solutions: the nature of the nitrosating intermediates. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 3419-3425.

**113**. Mannick, J. B.; Hausladen, A.; Liu, L.; Hess, D. T.; Zeng, M.; Miao, Q. X.; Kane, L. S.; Gow, A. J.; Stamler, S. J.. Fas-induced caspase denitrosylation. *Science* **1999**, 284, 651-654.

**114**. Stamler, J. S.; Jaraki, O.; Osborne, J.; Simon, D. I.; Keaney, J.; Vita, J.; Singel, D.; Valerie, C. R.; Loscalzo, J.. Nitric-oxide circulates in mammalian plasma primarily as an s-nitroso adduct of serum-albumin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1992**, 89, 7674-7677.

**115**. Kowaluk, E. A.; Fung, H. L.. Spontaneous liberation of nitric-oxide cannot account for in vitro vascular relaxation by s-nitrosothiols. *J. Pharmacol. Exp. Theor.* **1990**, 255, 1256-1264.

**116**. Mathews, W. R.; Kerr, S. W.. Biological-activity of S-nitrosothiols - the role of nitric-oxide. *J. Pharmacol. Exp. Theor.* **1993**, 267, 1529-1537.

**117**. Grossi, L.; Montevecchi, P. C.. S-nitrosocysteine and cystine from reaction of cysteine with nitrous acid. A kinetic investigation. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 8625-8630.

**118**. Pestovsky, O.; Bakac, A.. Nitrous acid as a source of NO and NO<sub>2</sub> in the reaction with a macrocyclic superoxorhodium(III) complex. *Inorg. Chem.* **2002**, 41, 901-905.

**119**. Dix, L. R.; Williams, D. L. H.; "Kinetics and mechanism of thionitrite formation - mercapto-carboxylic acids - a new range of efficient nitrous-acid scavengers" *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II* **1984**, 1, 109-112.

**120**. Morris, P. A.; Williams, D. L. H.. Kinetics and mechanism of S-nitrosation of some thiol-containing amino-acids and other thiols. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II* **1988**, 4, 513-516.

121. Beloso, P H.; Williams, D. L. H.. Reversibility of S-nitrosothiol formation. *Chem. Commun.* 1997, 89-90.

**122**. The NBS tables of chemical thermodynamic properties, 1982.

**123**. Markovits, G. Y.; Schwarts, S. E.; Newman, L.. Hydrolysis equilibrium of dinitrogen trioxide in dilute acid-solution. *Inorg. Chem.* **1981**, 20, 445.

**124**. Chipinda, I.; Simoyi, R. H.. Formation and stability of a nitric oxide donor: Snitroso-N-acetylpenicillamine. *J. Phys. Chem. B* **2006**, 110, 5052-5061.

**125**. Williams, D. L. H.; *Nitrosation reactions and the chemistry of nitric oxide*, Elsevier: Amsterdam, 2004.

**126**. Wiseman, T.; Williston, S.; Brandts, J. F.; Lin, L. N.. Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. <u>Anal.</u> <u>Biochem.</u> **1989**, 179, 131-137.

**127**. Swientoslawski, W.. Thermochemical analysis of organic compounds. Third announcement - Nitrogenous compounds. <u>*Z. Phys. Chem.*</u> **1910**, 72, 49-83.

**128**. Riordan, E.; Minogue, N.; Healy, D.; O'Driscol, P.; Sodeau, J. R.. Spectroscopic and optimization modeling study of nitrous acid in aqueous solution. *J. Phys. Chem. A* **2005**, 109, 779-786.

**129**. Gomes, M.; Borges, S.; Lopes, L.; Franco, D.. UV visible spectrum of nitrousacid in solution - pk(a) determination and analytical applications. *Anal. Chim. Acta* **1993**, 282, 81-85.

**130**. (a) Helmreich, E. J. M.: *The Biochemistry of Cell Signalling*. New York: Oxford, 2001.

(b) cap. 7. (c) cap. 1.

**131**. Rastogi, S. C.: *Cell And Molecular Biology* 2<sup>a</sup> ed., New Age International: Índia, 2003, cap. 25.

132. Lewin, B.; Genes V. Oxford University Press and Cell Press: Oxford, 1994.

**133**. de Aquino, L. C. L; "Purificação de pró-insulina humana recombinante com cauda de poli(histidina): cromatografia em membranas de afinidade com íons metálicos imobilizados", Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

134. Carvalheira, J. B. C.; Zecchin, H. G.; Saad, M. J. A.. Vias de sinalização da insulina. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* 2002, 46, 4, 419-425.

**135**. Paez-Espinosa, E. V.; Rocha, E. M.; Velloso, L. A.; Boschero, A. C.; Saad, M. J.. Insulin-induced tyrosine phosphorylation of Shc in liver, muscle and adipose tissue of insulin resistant rats. *Mol. Cell Endocrinol.* **1999**, 156, 121-129.

**136**. Hayes, J. D.; Flanagan, J. U.; Jowsey, I.. Glutathione transferases. <u>Annual</u> <u>Review of Pharmacology and Toxicology</u> **2005**, 45, 51-88.

**137**. Kunz, J.; Hall, M. N.. Cyclosporin A, FK506, and rapamycin: more than just immunosuppression. *Trends Biochem. Sci.* **1993**, 18, 334-338.

**138**. Schreiber, S. L. & Crabtree, G. R.. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol. Today* **1992**, 13, 136-142.

**139**. Fischer, G.; Bang, H.; Mech, C.. Detection of enzyme catalysis for cis-transisomerization of peptide-bonds using proline-containing peptides as substrates. *Biomed. Biochim. Acta* **1984**, 43, 1101-1111.

**140**. Fischer, G.; Wittmann-Liebold, B.; Lang, K.; Kiefhaber, T.; Schmid, F. X.. Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins. *Nature* **1989**, 337, 476-478.

**141**. Takahashi, N.; Hayano, T.; Suzuki, M.. Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase is the cyclosporin-a-binding protein cyclophilin. *Nature* **1989**, 337, 473-475.

**142**. Liu, J.; Farmer, J. D. Jr.; Lane, W. S.; Friedman, J.; Weissman, I.; Schreiber, S. L.. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporine-a and fkbp-fk506 complexes. *Cell* **1991**, 66, 807-815.

143. Ivery, M. T.G.. Immunophilins: switched on protein binding domains? <u>Med.</u> <u>Res. Rev.</u> 2000, 20, 452-484.

**144**. Duina, A. A.; Change, H.-C. J.; Marsh, J. A.; Lindquist, S.; Gaber, R. F.. A cyclophilin function in Hsp90-dependent signal transduction. <u>*Science*</u> **1996**, 274, 1713-1715.

**145**. Ratajczak, T.; Carrello, A.; Mark, P. J.; Warner, B. J.; Simpson, R. J.; Moritz, R. L.; House, A. K.. The cyclophilin component of the unactivated estrogen receptor contains a tetratricopeptide repeat domain and shares identity with p59 (FKBP59). *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 13187-13192.

**146**. Bram, R. J.; Crabtree, G. R.. Calcium signaling in T cells stimulated by a cyclophilin B-binding protein. *Nature* **1994**, 371, 355-358.

**147**. Kirberger, M.; Wang, X.; Deng, H.; Yang, W.; Chen, G.; Yang, J. J.. "Statistical analysis of structural characteristics of protein Ca<sup>2+</sup>-binding sites. <u>J.</u> <u>Biol. Inorg. Chem.</u> **2008**, 13, 1169-1181.

**148**. Martin, R. B.; Structural Chemistry of Calcium: Lanthanide Probes. In: Calcium in Biology, Spiro, T. G. ed., Wiley: New York, 1993.

**149**. Braunewell, K-H.; Gundelfinger, E. D.. Intracellular neuronal calcium sensor proteins: a family of EF-hand calcium-binding proteins in search of a function. <u>*Cell*</u> <u>*Tissues Res.*</u> **1999**, 295, 1-12.

. Babu, Y. S.; Bugg, C. E.; Cook, W. J.. Structure of calmodulin refined at 2.2 A resolution. *J. Mol. Biol.* **1988**, 204, 191-204.

. Satyshur, K. A.; Rao S. T.; Pyzalska, D.; Drendel, W.; Greaser, M.; Sundaralingam, M.. Refined structure of chicken skeletal muscle troponin C in the two-calcium state at 2A° resolution. *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 1628-1647.

**152**. Szbenyi, D. M. E. e Moffat, K.. The refined structure of vitamin-D-dependent calcium-binding protein from bovine intestine - molecular details, ion binding, and implications for the structure of other calcium-binding proteins. *J. Biol. Chem.* **1986**, 261 p. 8761-8777.

**153**. Suzuki, T.; Delgado-Escueta, A. V.; Aguan, K.; Alonso, M. E.; Shi, J.; Hara, Y.; Nishida, M.; Numata, T.; Medina, M. T.; Takeuchi, T.; Morita, R.; Bai, D.; Ganesh, S.; Sugimoto, Y.; Inazawa, J.; Bailey, J. N.; Ochoa, A.; Jara-Prado, A.; Rasmussen, A.; Ramos-Peek, J.; Cordova, S.; Rubio-Donnadieu, F.; Inoue, Y.; Osawa, M.; Kaneko, S.; Oguni, H.; Mori, Y.; Yamakawa, K.. Mutations in EFHC1 cause juvenile myoclonic epilepsy. *Nat. Genet.* **2004**, 36, 842-849.

. Gardiner, M.. Genetics of idiopathic generalized epilepsies. *Epilepsia* **2005**, 46(Suppl. 9), 15-20.