

MCN  
577.112.088  
B862c  
TES/MEM

ANA GRACI BRITO



**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DO EFEITO DE SOLVENTES  
DESNATURANTES SOBRE O ESPECTRO ULTRAVIOLETA E A  
MOBILIDADE ELETROFORÉTICA  
DE PROTEÍNAS OU CROMÓFOROS MODELOS DE PROTEÍNAS**

577.112.088 B862c TES/FU  
**DIRBI - UFU** UMU 01179/97  
  
1000167967

Universidade Federal de Uberlândia  
Pós graduação em Genética e Bioquímica

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DO EFEITO DE SOLVENTES  
DESNATURANTES SOBRE O ESPECTRO ULTRAVIOLETA E A  
MOBILIDADE ELETROFORÉTICA  
DE PROTEÍNAS OU CROMÓFOROS MODELOS DE PROTEÍNAS**

Ana Graci Brito

Dissertação apresentada a  
Universidade Federal de Uberlândia  
como parte das exigências do curso  
de pós graduação em Genética e  
Bioquímica, para obtenção do Título  
de Mestre em Genética e  
Bioquímica.

Uberlândia  
Minas Gerais - Brasil  
1997

MON  
577.112.088  
10862c  
TES/ME/M

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
PÓS GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DO EFEITO DE SOLVENTES  
DESNATURANTES SOBRE O ESPECTRO ULTRAVIOLETA E A  
MOBILIDADE ELETROFORÉTICA DE PROTEÍNAS OU CROMÓFOROS  
MODELOS DE PROTEÍNAS

Aluna: Ana Graci Brito

Orientador: Nilson Penha Silva

Dissertação apresentada a  
Universidade Federal de Uberlândia  
como parte das exigências do curso  
de pós graduação em Genética e  
Bioquímica, para obtenção do Título  
de Mestre em Genética e  
Bioquímica.

Uberlândia  
Minas Gerais - Brasil  
1997

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de Bioquímica do Departamento de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, com o apoio financeiro das seguintes instituições:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Ensino Superior (CAPES)
- Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da UFU (PROPP-UFU)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
Campus Umuarama Bloco 2E Sala 37  
38.400-902, UBERLÂNDIA - MG

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO  
PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE  
EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

1 - TÍTULO DA TESE: Contribuição ao Estudo do Efeito de Solventes Desnaturantes Sobre o Espectro Ultravioleta e a Mobilidade Eletroforética de Proteínas ou Cromóforos Modelos de Proteínas.

2 - ALUNO: Ana Graci Brito

3 - PROFESSOR ORIENTADOR: Nilson Penha Silva

4 - DATA: 06 03 97

5 - BANCA EXAMINADORA:

Titular Nilson Penha Silva

Titular Edyr Rogana

Titular Carlos Alberto de Oliveira

Suplente Antonio Eduardo da Hora Machado

Suplente Marcelo Santoro

6 - APRESENTAÇÃO: Início - 08:50 Término - 09:40

7 - TEMPO DE ARGUIÇÃO: Início - 09:40 Término - 11:00

8 - CONCEITO ATRIBUÍDO POR EXAMINADOR:

1º Membro da Banca A

2º Membro da Banca A

3º Membro da Banca A

Conceito Final: A

9 - OBSERVAÇÕES: \_\_\_\_\_

10 - ASSINATURA DOS MEMBROS DA BANCA:

Nilson Penha Silva  
Edyr Rogana  
Carlos Alberto de Oliveira

11 - RESERVADO AO COLEGIADO

Aos meus pais,  
pela confiança e dedicação.

## AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Nilson Penha Silva, pelo profissionalismo em sua dedicação e orientação, o que tornou viável a realização deste trabalho;
- À Profa. Dra. Amélia Hamaguchi e à Profa. Dra. Maria Inês Brandeburgo, pelas sugestões e boa vontade com que me atenderam sempre que foram solicitadas;
- Ao Prof. Dr. Luis Ricardo Goulart, pelo apoio prestado durante a execução do presente trabalho;
- Aos colegas de grupo, em especial à Alessandra Martineli Fonseca e Márcia Aguiar de Souza Penha, pelo apoio e colaboração;
- À Andreimar Martins Soares, da Universidade de São Paulo, pelas amostras de proteínas cedidas para a realização dos experimentos;
- Aos técnicos Cleuber Honorato Pereira e Sebastiana Abadia Inácio, pelo eficiente e pronto atendimento e pela permanente simpatia;

- Aos demais professores, colegas e funcionários do Departamento de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia que de alguma forma colaboraram para a execução deste trabalho;
- Como de praxe, isento todos de erros e omissões remanescentes.



## CONTEÚDO

	PÁG.
<b>ABREVIATURAS E SIGLAS</b>	<b>X</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>XII</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b>	<b>XV</b>
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>01</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>09</b>
Geral	<b>09</b>
Específicos	<b>09</b>
<b>JUSTIFICATIVAS</b>	<b>11</b>
<b>MATERIAL</b>	<b>12</b>
<b>MÉTODOS</b>	<b>14</b>
<b>Espectros de cromóforos e proteínas</b>	<b>16</b>
N-Ac-Trp-EE em 0M de GuHCl	<b>16</b>
N-Ac-Trp-EE em 2M, 4M e 8M de GuHCl	<b>16</b>
N-Ac-Tyr-EE em 0M de GuHCl	<b>16</b>
N-Ac-Tyr-EE em 0M, 2M, 4M e 8M de GuHCl	<b>17</b>
RNAse A bovina em 0M de GuHCl	<b>17</b>

RNAse A bovina em 8M de GuHCl	17
Tripsina bovina em 0M de GuHCl	17
Tripsina bovina em 2,2 e 3,9M de GuHCl	18
<b>Determinação dos valores de <math>\epsilon_{\text{máx}}</math> e <math>A_{\text{máx}}</math> de cromóforos em soluções com concentrações variadas de hidrocloreto de guanidina</b>	<b>18</b>
Efeito de concentrações crescentes de GuHCl sobre a absorvância de N-Ac-Tyr-EE e N-Ac-Trp-EE	18
Redução total das ligações dissulfeto e carboxiamidometilação dos grupos sulfidril de RNAse A Bovina	19
<b>Equilíbrio de desnaturação de proteínas induzido pelo hidrocloreto de guanidina</b>	<b>19</b>
Efeito de concentrações crescentes de GuHCl sobre a absorvância de RNAse A bovina, RCAM-RNAse, tripsina bovina, piratoxina I de <i>Bothrops pirajai</i> , miotoxinas I e II de <i>Bothrops moojeni</i> , bothropstoxina de <i>Bothrops jararacussu</i>	19
<b>Medida da estabilidade de RNAse A bovina</b>	<b>22</b>
Estabilidade de RNAse A bovina	22
<b>Determinação da cinética de hidrólise de citidina 2':3'-fosfato na ausência e presença de GuHCl</b>	<b>23</b>
Medida da atividade de RNAse A bovina	23

Medida da perda da atividade de RNase A bovina	23
<b>Estudo da cinética e recuperação da atividade de RNase A</b>	
<b>Bovina</b>	<b>24</b>
Cinética de reenovelamento de RNase A bovina	24
Medida da recuperação da atividade de RNase A bovina	24
<b>Dependência com o tempo dos parâmetros <math>A_{m\acute{a}x}</math> e <math>\epsilon_{m\acute{a}x}</math> de</b>	
<b>compostos modelos de proteínas</b>	<b>25</b>
Efeito do tempo sobre a $A_{m\acute{a}x}$ de N-Ac-Tyr-EE e N-Ac-Trp-EE	25
<b>Gel gradiente</b>	<b>25</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>35</b>
<b>DISCUSSÃO</b>	<b>63</b>
<b>CONCLUSÕES</b>	<b>72</b>
<b>SUMÁRIO</b>	<b>74</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>76</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>77</b>
<b>CURRICULUM VITAE</b>	<b>91</b>

## ABREVIATURAS E SIGLAS

$A_{\text{máx}}$	Absorvância máxima
$ABS_i$	Absorvância no comprimento de onda $i$
$c$	Concentração da amostra (mg/mL)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
$D_{1/2}$	Concentração do desnaturante capaz de converter 50% das moléculas de proteínas do estado N para o estado U e vice-versa.
$\epsilon_M$	Coefficiente de extinção molar ou absortividade molar ( $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )
$\epsilon_{1\%}$	Coefficiente de extinção percentual
$\epsilon_{\text{máx}}$	Coefficiente de extinção molar máximo
$\Delta\epsilon$	Extinção molar diferencial ( $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )
$\Delta G$	Varição da energia livre
$\Delta G_{N-U}$	Varição da energia livre para a transição do estado nativo (N) para o estado desenovelado (U)
$\Delta G_f$	Varição de energia livre de enovelamento ( <b>fold</b> ing) de uma proteína

$\Delta G_U$	Varição da energia livre de desenovelamento ( <b>unfolding</b> ) de uma proteína
$\Delta G_D^{H_2O}$	Varição da energia livre da proteína na ausência do desnaturante
$M_i$	Mobilidade da proteína no estado intermediário
$M_N$	Mobilidade da proteína no estado nativo
$M_U$	Mobilidade da proteína no estado desenovelado
Tris	Tris-hidroximetilaminometano
UV	Ultra-Violeta
GuHCl	Hidrocloreto de guanidina
IAA	Iodoacetamida
$l$	Caminho óptico através da amostra (cm)
$\lambda$	Comprimento de onda
N-Ac-Trp-EE	N-Acetil-Triptofanil-Etil-Éster
N-Ac-Tyr-EE	N-Acetil-Tirosinil-Etil-Éster
RNAse	Ribonuclease A
RCAM-RNAse	Ribonuclease A com as ligações sulfidrilas reduzidas e carboxiamidometiladas

## ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁG.
<b>Figura 1</b> Espectro de tripsina bovina em diferentes concentrações de GuHCl	35
<b>Figura 2</b> Efeito de concentrações crescentes de GuHCl sobre a absorvância de tripsina bovina	36
<b>Figura 3</b> Espectro de RNase A bovina em diferentes concentrações de GuHCl	37
<b>Figura 4</b> Efeito de concentrações crescentes de GuHCl sobre a absorvância de RNase A bovina	38
<b>Figura 5</b> Dependência com o tempo de RNase A bovina em KCl 0,1 M e GuHCl 8 M	39
<b>Figura 6</b> Efeito de concentrações crescentes de GuHCl sobre as absorvâncias de miotoxinas I e II de <i>Bothrops moojeni</i>	40
<b>Figura 7</b> Equilíbrio de desnaturação induzido pelo hidrocloreto de guanidina sobre a bothropstoxina I de <i>Bothrops jararacussu</i> e a piratoxina I de <i>Bothrops pirajai</i>	41
<b>Figura 8</b> Espectro de absorção no ultravioleta de N-Acetil-Tirosinil-Etil-Éster	44

<b>Figura 9</b>	Efeito de concentrações crescentes de GuHCl sobre a absorvância de N-Acetil-Tirosinil-Etil-Éster	<b>45</b>
<b>Figura 10</b>	Espectro de absorção no ultravioleta de N-Acetil-Triptofanil-Etil-Éster.	<b>46</b>
<b>Figura 11</b>	Efeito de concentrações crescentes de GuHCl sobre a absorvância de N-Acetil-Triptofanil-Etil-Éster	<b>47</b>
<b>Figura 12</b>	Dependência com o tempo de N-Ac-Trp-EE e N-Ac-Tyr-EE em GuHCl 8 M	<b>48</b>
<b>Figura 13</b>	Mudança fracional de RNase A bovina em diferentes valores de pHs	<b>50</b>
<b>Figura 14</b>	Renaturação de RNase A bovina pré incubada à temperatura ambiente por 1 hora em hidrocloreto de guanidina 8M	<b>51</b>
<b>Figura 15</b>	Cinética de reenovelamento de RNase A bovina, incubada 24 horas a 23 °C em GuHCl 8M, e diluída para concentrações finais de GuHCl de 6, 3, 2 e 1 M	<b>52</b>
<b>Figura 16</b>	Curvas de hidrólise de citidina 2':3'-fosfato pela RNase A bovina em tampão Tris-HCl pH 7,3 na ausência e presença de diferentes concentrações de GuHCl	<b>53</b>
<b>Figura 17</b>	Perda da atividade de RNase A Bovina	<b>54</b>

<b>Figura 18</b>	Recuperação da atividade de RNase A Bovina	<b>55</b>
<b>Figura 19</b>	Equilíbrio de desnaturação induzido pelo GuHCl para RCAM-RNase	<b>56</b>
<b>Figura 20</b>	Eletroforese em gradiente de uréia de RNase A bovina nativa	<b>58</b>
<b>Figura 21</b>	Eletroforese em gradiente de uréia de piratoxina I nativa de <i>Bothrops pirajai</i>	<b>59</b>
<b>Figura 22</b>	Eletroforese em gradiente de uréia de miotoxina I nativa de <i>Bothrops moojeni</i>	<b>60</b>
<b>Figura 23</b>	Eletroforese em gradiente de uréia de miotoxina II nativa de <i>Bothrops moojeni</i>	<b>61</b>



## INDICE DE TABELAS

	<b>PÁG.</b>
<b>Tabela I</b> Determinação dos coeficientes de extinção molar e percentual de proteínas	<b>42</b>
<b>Tabela II</b> Medida da transição de desnaturação ( $\Delta A$ ) de proteínas	<b>43</b>
<b>Tabela III</b> Cálculo do coeficiente de extinção molar ( $\epsilon_M$ ) de compostos modelos em hidrocloreto de guanidina a 6M	<b>49</b>
<b>Tabela IV</b> Determinação da energia livre para as curvas de transição de desenovelamento determinadas por espectrofotometria	<b>57</b>
<b>Tabela V</b> Determinação da variação de energia livre de desenovelamento de proteínas para os géis com gradiente de uréia	<b>62</b>

## INTRODUÇÃO

O cooperativismo em proteínas é um processo extremamente importante. Ele é a base dos mecanismos alostéricos de regulação da atividade protéica, mas ele também se manifesta em processos como o desenovelamento de estruturas tridimensionais de proteínas e pode ser expresso em níveis populacionais de estados intermediários parcialmente enovelados durante a transição do estado nativo para o estado desenovelado (Freire et al., 1992). A teoria, características e propriedades das transições cooperativas são desenvolvidas com referência às mudanças abruptas que ocorrem em soluções de proteínas (Lumry et al., 1966).

A atividade biológica das proteínas necessita de uma estrutura tridimensional altamente ordenada. Nas técnicas de enovelamento, a atividade representa um critério muito sensível devido a relação entre estrutura e função das proteínas (Jaenicke, 1989 apud Yoshida et al., 1993)

Visto que um grande número de conformações é possível para uma cadeia polipeptídica, a obtenção de uma estrutura nativa através de um mecanismo randômico não é um modelo satisfatório (Vanhove, 1995). O mecanismo através do qual a cadeia polipeptídica dirige o enovelamento para sua conformação nativa é um problema fundamental que permanece não resolvido e tem sido elucidado pela Bioquímica Física (Denton et al., 1994; Matthews et al., 1981). Oportunamente, a identificação de intermediários é amparada pela natureza altamente cooperativa do processo de enovelamento

(Kuwajima et al., 1989; Gorovits et al., 1995). Uma grande variedade de técnicas experimentais tem sido utilizadas para tentar vencer estas dificuldades e esclarecer o mecanismo de enovelamento das proteínas (Kim & Baldwin, 1990; Yoshida et al., 1993) incluindo estudos mutacionais (Jennings et al., 1991) estudos que mascaram a ligação-dissulfeto (Creighton, 1986; Weissmam & Kim, 1991) estudos de espécies enoveladas parcialmente e termodinamicamente estáveis (Kuwajima, 1989) e estudos de peptídios modelos (Oas & Kim, 1988; Montelione & Scheraga, 1989). A metodologia para se descobrir as etapas individuais do enovelamento compreendem a termodinâmica e as análises cinéticas dos processos de reenovelamento e desenovelamento.

Agentes caotrópicos tais como hidrocloreto de guanidina e uréia são os mais efetivos desnaturantes de proteínas capazes de romperem as interações não covalentes que definem a sua conformação nativa. Evidências para esta conclusão vêm de medidas de propriedades hidrodinâmicas de proteínas de baixo peso molecular tais como lisozima e RNase A, e de estudos de RMN protônica de proteínas dissolvidas em GuHCl. As mudanças na estrutura das proteínas globulares e a consequente perda de sua função não implicam que a proteína na presença do desnaturante esteja completamente desenovelada, pois ainda pode existir uma estrutura compacta contendo resíduos de estrutura secundária e uma forma com um largo raio de giração, que mais se aproxima de um **random coil** (Matthews, 1993; Fabian et al., 1995 ). O hidrocloreto de guanidina é um agente químico capaz de promover o desenovelamento de proteínas para gerar um estado considerado

randômico do ponto de vista estrutural. Este processo, além de cooperativo, é também reversível em muitos casos. O seu estudo pode fornecer contribuições significantes sobre as bases moleculares do cooperativismo, bem como sobre a própria formação das estruturas terciárias de proteínas.

O enovelamento e o desenovelamento de proteínas globulares pequenas pode ser aproximado para um equilíbrio em dois estados, nos quais somente a estrutura nativa e a cadeia polipeptídica totalmente desenovelada são estáveis. Entretanto estados de conformação intermediária termodinamicamente estáveis têm sido detectadas na via de enovelamento de algumas proteínas globulares. Em alguns casos, estes estados têm sido descrito como **molten globules**, moléculas compactas com um elevado conteúdo de estrutura secundária nativa e flutuações da estrutura terciária (Vanhove et al, 1995).

As arquiteturas de centenas de proteínas nativas têm sido determinadas por cristalografia de raios X e, mais recentemente, por ressonância magnética nuclear (RMN). Ambas as técnicas sofreram um grande avanço na última década. Dados de dicroísmo circular, RMN e fluorescência indicam claramente a presença de estruturas secundárias e terciárias, e estas apresentam maior estabilidade, quando comparadas à forma desenovelada (Pace, 1986).

Muitas informações avaliadas até agora vêm de estudos de proteínas globulares pequenas, solúveis em água, e contendo menos que 300 aminoácidos. As importâncias relativas das várias regras de enovelamento podem não ser as mesmas para as diferentes proteínas. Agentes externos,

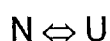
tais como prolil isomerases, dissulfeto isomerases ou chaperonas, podem aumentar a taxa de formação da estrutura nativa ou o seu rendimento, catalisando as reações, ou no caso das chaperoninas, ativando as reações de agregação (Mattews, 1993). As chaperonas catalisam a etapa final no processo de enovelamento (Brandem, 1991).

As unidades estabilizadas ou microdomínios comandam a molécula para uma grande organização estrutural com outros segmentos. Uma fração da energia para o processo de enovelamento é gasta para a formação dos elementos secundários e a outra fração para promover a associação destes elementos dentro da estrutura terciária. Interações que promovem o enovelamento de uma parte da estrutura tridimensional de uma proteína, também promovem o enovelamento de uma outra parte da molécula, visto que modelos intermediários não persistem por longo tempo. Entretanto, técnicas engenhosas têm capturado ou identificado algumas características de um grande número de intermediários. Atualmente existem evidências concretas de que certas proteínas formam intermediários que têm sua estrutura secundária intacta (Richards, 1991 apud Yoshida, 1979).

Em outros experimentos, Thomas E. Creighton e seus colegas do laboratório de Conselho e Pesquisa Médica em Biologia molecular na Inglaterra, têm estudado o enovelamento do inibidor pancreático de tripsina (PTI) que, semelhantemente a muitas proteínas, forma ligações dissulfeto internas. Creighton e seus colaboradores desenovelaram o produto nativo e, quando começaram a reação de enovelamento, interrompendo-a em diferentes intervalos, eles capturaram intermediários que puderam ser

identificados por uma ligação dissulfeto particular. As estruturas completas dos intermediários não são ainda conhecidas em detalhes, mas o trabalho tem revelado que o enovelamento não ocorre necessariamente ao longo de um único caminho.

O desenovelamento de proteínas por desnaturantes tem sido estudado experimentalmente pela medida de um ou mais parâmetros físicos da proteína em função da concentração de reagente (Herkovitz, 1967). As propriedades das proteínas pequenas usualmente mudam pouco em baixas concentrações dos reagentes, até uma faixa onde ocorre um desenovelamento abrupto da proteína. Dentro de condições apropriadas, o desenovelamento de proteínas de baixo peso molecular é usualmente reversível. Diluindo-se o desnaturante, a transição de reenovelamento ocorre na mesma faixa de concentração do desenovelamento. O equilíbrio de transição geralmente é mostrado por uma curva sigmoide com um simples ponto de inflexão. Estas observações são consistentes com uma transição em dois estados em que somente o estado totalmente enovelado (N) e o estado totalmente desenovelado (U) são populacionalmente significantes (Pace et al., 1974).



A ausência aparente de um estado parcialmente enovelado em tais transições tem sido melhor confirmado pela combinação entre a entalpia aparente da transição de desenovelamento medida calorimetricamente e a medida da dependência da temperatura da constante de equilíbrio aparente para a transição (Privalov & Khechinashvili, 1974; Pfeil & Privalov, 1976).

A curva de transição é muito útil para se medir a diferença na estabilidade conformacional entre proteínas que diferem em sua composição em aminoácidos ou alterações resultantes das modificações químicas, possibilitando o esclarecimento do enovelamento das proteínas. Inferências podem também ser tiradas sobre a estrutura da proteína, se o perfil de desnaturação apresenta mais de uma etapa, isto geralmente indica que a proteína apresenta mais de um domínio e assim pode-se estimar a estabilidade relativa dos domínios (Creighton, 1986). A diferença da estabilidade conformacional da proteína é medida a partir da região de pré-transição, que depende da proteína enovelada, da região de transição, que depende dos estados intermediários, e da região de pós transição, que depende da proteína desenovelada. Todas estas regiões são importantes para medir e analisar a curva de desenovelamento da proteína (Pace, 1974).

A cooperatividade do desenovelamento pode ser aplicada para domínios individuais. As transições de enovelamento da citocromo c (Myer, 1968, apud Timasheff, 1986), anidrase carbônica (Wong & Tanford, 1973 apud Creighton, 1979) e imunoglobulinas (Azuma et al., 1972 apud Creighton, 1979) não são sigmoidais, mas apresentam dois ou mais pontos de inflexão, o que sugere a presença de três ou mais diferentes estados da proteína. O estado populacional da proteína pode ser heterogêneo em sua estrutura covalente. Estados intermediários podem consistir de agregados da proteína desenovelada (London et al., apud Creighton, 1979).

A estabilidade do estado desenovelado pode ser dependente da ligação de moléculas pequenas, que podem estar presentes em concentrações insuficientes para o reenovelamento (Tanford, 1973).

Muitas incertezas sobre a transição de enovelamento de proteínas advêm primariamente de limitações técnicas no estudo da conformação de proteínas em soluções. Um engenhoso método para a determinação da curva de desnaturação utilizando-se um experimento simples é o gel com gradiente de uréia. O equipamento utilizado nesta técnica é relativamente simples e a metodologia utilizada requer pequenas quantidades de proteína, menos do que 1µg. Além disto, a amostra de proteína não necessita de um alto grau de pureza, pois a eletroforese pode muitas vezes ser usado para separar macromoléculas com diferentes conformações em uma amostra.

Uma das propriedades físicas nas quais as proteínas enoveladas e desenoveladas diferem marcadamente é o modelo e tamanho do volume molecular ocupado pelo polipeptídeo. O modelo de uma proteína afeta a taxa na qual ela migra quando submetida a um campo elétrico através do gel de poliacrilamida (Crambach & Rodbard, 1971). Proteínas enoveladas migram mais rapidamente através do gel do que as proteínas desenoveladas. Estes estudos podem confirmar a natureza da transição cooperativa em dois estados (Creighton, 1980). A taxa de migração eletroforética através dos géis é sensível para intermediários do desenovelamento da proteína (Creighton, 1979). A eletroforese pode ser conduzida na presença de desnaturantes não-iônicos, como a uréia. A transição de desenovelamento pode ser visualizada pela eletroforese em gel de poliacrilamida, com um gradiente de uréia



perpendicular à direção de migração da proteína. É possível obter informações qualitativas sobre a transição de desenovelamento induzida pela uréia para casos nos quais não é possível se obter informações com outras técnicas. O gel gradiente pode prever informações sobre ambos os estados termodinâmico e cinético da transição de desenovelamento.

A amostra de proteína quando aplicada ao topo do gel, mostra uma banda inicialmente homogênea e qualquer desenovelamento ou reenovelamento pode ocorrer durante a migração eletroforética (Creighton, 1980). O primeiro estudo cinético foi feito para a ribonuclease A bovina, tendo sido encontrado uma maior complexidade devido à presença de duas populações de moléculas desenoveladas, uma das quais reenovela mais rapidamente que o outro estado populacional (Garel & Baldwin, 1973; Garel & Baldwin, 1975; Garel et al., 1976).

O gel com gradiente de uréia pode fornecer consideráveis informações sobre as reações de **unfolding** ou **refolding** em uma determinada faixa de concentração de desnaturante, usando-se pequenas quantidades de proteína. A estimativa da velocidade não é tão precisa em relação aos métodos espectroscópicos, mas os métodos eletroforéticos complementam informações sobre o volume hidrodinâmico da amostra de proteína nativa, desenovelada e dos estados intermediários.

O gel gradiente também possibilita o cálculo da variação energia livre para transição de desenovelamento de proteínas globulares.  $\Delta G_{N-U}$  é uma medida quantitativa de fundamental interesse em quase todos os aspectos da dinâmica e função das proteínas (Bolen et al., 1988).

## OBJETIVOS

### Geral

1 - Estudar a dependência do espectro ultravioleta de proteínas e de cromóforos modelos de proteínas com a concentração de um agente desnaturante clássico, o hidrocloreto de guanidina.

2 - Estudar a dependência da mobilidade eletroforética de proteínas com concentrações crescentes de uréia.

### Específicos

1 - Determinar o efeito de concentrações crescentes entre 0 e 6M de GuHCl sobre os parâmetros  $A_{máx}$  e  $\epsilon_{máx}$  de RNase A e tripsina bovinas; miotoxinas I e II de *Bothrops moojeni*, da piratoxina I de *Bothrops pirajai* e da bothropstoxina I de *Bothrops jararacussu*;

2 - Determinar o efeito do tempo sobre  $A_{máx}$  e  $\epsilon_{máx}$  de tripsina e RNase A bovinas sob concentrações fixas de GuHCl;

3 - Determinar o efeito de concentrações entre 0 e 6M de GuHCl sobre os parâmetros  $A_{máx}$  e  $\epsilon_{máx}$  de N-Ac-Tyr-EE e N-Ac-Trp-EE na faixa ultravioleta do espectro;

4 - Determinar o efeito do tempo sobre  $A_{máx}$  e  $\epsilon_{máx}$  de N-Ac-Tyr-EE e N-Ac-Trp-EE sob concentrações fixas de GuHCl;

5 - Determinar experimentalmente valores de  $\epsilon_{\text{máx}}$  de algumas proteínas em 6M de GuHCl cujos coeficientes de extinção na ausência daquele desnaturante sejam bem definidos na literatura;

6 - Medir a variação da energia livre para o desenovelamento de RNase A e tripsina bovinas, miotoxinas I e II de *Bothrops moojeni*, piratoxina I de *Bothrops pirajai* e bothropstoxina I de *Bothrops jararacussu*;

7 - Medir a transição de desnaturação ( $\Delta A$ ) para a RNase A e tripsina bovinas, miotoxinas I e II de *Bothrops moojeni*, piratoxina I de *Bothrops pirajai* e bothropstoxina I de *Bothrops jararacussu*;

8 - Determinar as curvas de transição de desenovelamento de ribonuclease A bovina, piratoxina I de *Bothrops pirajai*, miotoxinas I e II de *Bothrops moojeni*, por meio de eletroforese em gel gradiente de poliacrilamida com um gradiente transversal de 0 a 6 M de uréia.

## JUSTIFICATIVAS

O estado desenovelado das proteínas apresenta conformações consideradas randômicas por vários autores na literatura (Pace et al, 1986; Herkovitz, 1967). Entretanto, a ausência de estrutura neste estado tem sido questionada em recentes trabalhos. A utilização de cromóforos de natureza hidrofóbica como compostos modelos é uma maneira conveniente de se pesquisar a transição entre os estados nativo e desenovelado das proteínas. Como estas transições são em muitos casos, processos reversíveis, o seu estudo pode permitir a obtenção de importantes informações sobre o processo de formação da estrutura tridimensional a partir da estrutura primária de uma proteína. Isto é bastante significativo, uma vez que a estrutura de uma proteína determina sua função, e função significa vida para o complexo universo biológico da matéria.

Além disso a compreensão das bases moleculares do cooperativismo e da formação das estruturas terciárias apresenta um amplo leque de aplicações, que vão desde a engenharia genética à terapêutica.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
LABORATÓRIO DE QUÍMICA FÍSICA

## MATERIAL

As proteínas bovinas ribonuclease A, tripsina e albumina sérica, foram obtidas comercialmente da Sigma Chemical Company. A piratoxina I de *Bothrops pirajai* e as miotoxinas I e II de *Bothrops moojeni* foram gentilmente doadas pelo Prof. Dr. José Roberto Giglio e pelo biólogo Andreimar Martins Soares, do laboratório de Bioquímica da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto. A bothropstoxina de *Bothrops jararacussu* foi obtida do laboratório de Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, por doação da Prof. Dra. Maria Inês Homs-Brandeburgo e da bióloga Márcia Helena Borges. Todas as amostras de miotoxinas foram cromatograficamente purificadas, liofilizadas, e mostraram um alto grau de pureza por eletroforese em gel de poliacrilamida.

Os reagentes utilizados foram de grau analítico e obtidos da Sigma, Reagen, Inlab, Quimis e Merck.

O hidrocloreto de guanidina foi obtido da Sigma e suas concentrações foram determinadas pelo peso do soluto e volume da solução e checadas pela medida do seu índice de refração, segundo descrições de Pace (1986) utilizando-se um refratômetro universal (Schmidt & Haensch).

As soluções estoque dos compostos modelos, N-Ac-Tyr-EE e N-Ac-Trp-EE, eram semanalmente preparadas em DMSO e armazenadas em frasco de cor âmbar.

Os estudos de espectrofotometria no ultravioleta utilizaram os espectrofotômetros Philco Hitachi modelo U-2000 e Zeiss modelo Spekol, com cuvetas de quartzo de 1cm de caminho óptico.

Para os experimentos de mudança fracional de RNase A bovina, foi utilizado um banho termostático MA 184 da MARCONI.

Para o preparo dos géis com gradiente, foram utilizados reagentes de alto grau de pureza e uma bomba peristáltica da Pharmacia.

## MÉTODOS

### Determinação de coeficientes de extinção molar de proteínas segundo o método de VON HIPPEL, GILL e PETER (1989)

O comprimento de onda utilizado em cada ensaio foi investigado através de resultados espectrais onde havia uma maior variação da absorvância da proteína na presença e na ausência do desenovelante.

O coeficiente de extinção molar de uma proteína desnaturada em 6M depende do número de resíduos de triptofano, tirosina e cisteína, e pode ser determinado usando-se os coeficientes de extinção molar de seus cromóforos naquele solvente. Os coeficientes de extinção molar de compostos modelos foram determinados por Edelhoch. Ele mostrou que destes resíduos somente dois contribuem significativamente para a medida da densidade óptica da proteína desnaturada na faixa de 276 a 282 nm. Usando-se estes dados, o coeficiente de extinção da proteína desnaturada em 6 M de GuHCl pode ser calculado, por meio da equação:

$$\epsilon_{M,GuHCl} = a \epsilon_{M,tyr} + b \cdot \epsilon_{M,trp} + c \cdot \epsilon_{M,cys}$$

onde  $\epsilon_{tyr}$ ,  $\epsilon_{trp}$  e  $\epsilon_{cys}$  são os coeficientes de extinção molar da tirosina, triptofano e cisteína, respectivamente, no comprimento de onda considerado, e **a**, **b**, **c** são o número de cada tipo de resíduo por molécula de proteína.

Para determinar o coeficiente de extinção molar da proteína nativa deve-se medir as absorvâncias de soluções com concentrações idênticas da proteína no estado nativo e no estado desnaturado. A partir da lei de Lambert-Beer pode-se inferir que:

$$ABS_{GuHCl} / \epsilon_{M, GuHCl} = C_{den}$$

onde  $ABS_{GuHCl}$  é a medida da densidade óptica da amostra de proteína desnaturada em 6M de GuHCl,  $\epsilon_{M,GuHCl}$  é o coeficiente de extinção molar da proteína desnaturada naquele solvente e  $C_{DEN}$  é a concentração da proteína desnaturada na solução (em mol/litro).

A equação equivalente da amostra da proteína nativa é dada por:

$$ABS_{NAT} / \epsilon_{M, NAT} = C_{NAT}$$

onde  $ABS_{NAT}$  é a medida da densidade óptica da amostra de proteína e  $\epsilon_{M, NAT}$  é o coeficiente de extinção molar da proteína (em  $M^{-1}.cm^{-1}$ ) no estado nativo. A partir das duas expressões anteriores pode-se derivar facilmente uma expressão para o cálculo do valor de  $\epsilon$  da proteína nativa,

$$\epsilon_{NATIVA} = \epsilon_{GuHCl} \cdot A_{NATIVA} / A_{GuHCl}$$

utilizando-se as absorvâncias das proteínas nos estados nativos e desnaturado e o coeficiente de extinção molar da proteína no estado desnaturado.



## **Espectros de absorção no ultravioleta de proteínas e cromóforos modelos de proteínas**

**N-Ac-Trp-EE em 0M de GuHCl** - 1mL de água e 20  $\mu$ L de DMSO foram adicionados às cuvetas referência e amostra para a obtenção da linha de base. E para o espectro da amostra, foi adicionado 1 mL de água e 20  $\mu$ L de N-Acetil-Triptofanil-Etil-Éster 0,01 M em DMSO (Brandt et al., 1973)

**N-Ac-Trp-EE em 2M, 4M e 8M de GuHCl** - 1mL de GuHCl nas concentrações 2M, 4M ou 8M e 20  $\mu$ L de DMSO foram adicionados, e traçou-se a linha de base. Para a obtenção do espectro, adicionou-se 1mL de GuHCl nas respectivas concentrações e 20  $\mu$ L de N-Acetil-Triptofanil-Etil-Éster 0,01 M em DMSO.

**N-Ac-Tyr-EE em 0M de GuHCl** - 1m L de água e 20  $\mu$ l de DMSO foram adicionados às cuvetas referência e amostra para o branco. E para o espectro, foi adicionado 1 mL de água e 20  $\mu$ L de N-Acetil-Tirosinil-Etil-Éster 0,01 M em DMSO (Brandt et al 1973).

**N-Ac-Tyr-EE em 2M, 4M e 8M de GuHCl** - O branco foi obtido adicionando-se 1mL de GuHCl nas concentrações 2, 4 ou 8 M e 20  $\mu$ L de DMSO foram adicionados, e traçou-se a linha de base. Para a obtenção do

espectro, foi adicionado 1mL de GuHCl nas respectivas concentrações e 20  $\mu$ L de N-Acetil-Tirosinil-Etil-Éster 0,01M em DMSO.

**Ribonuclease A bovina em 0M de GuHCl** - 1mL de água e 20  $\mu$ L de cloreto de potássio foram adicionados às cuvetas referência e amostra, para a linha de base. A solução da cuveta amostra foi descartada e 1mL de água e 20  $\mu$ L de RNase A Bovina (a 20 mg/mL em KCl 0,1 M) foram adicionados para a obtenção do espectro.

**Ribonuclease A bovina em 8M de GuHCl** - 1mL de GuHCl 8M e 20  $\mu$ L de cloreto de potássio foram adicionados às cuvetas referência e amostra, para a linha de base. A solução da cuveta amostra foi descartada e adicionou-se 1mL de GuHCl 8M e 20  $\mu$ L de ribonuclease A bovina (20 mg/mL em KCl 0,1M) para a obtenção do espectro.

**Tripsina bovina em 0M de GuHCl** - 1mL de água e 20  $\mu$ L de cloreto de potássio foram adicionados às cuvetas referência e amostra, para a linha de base. A solução da cuveta amostra foi descartada e 1mL de água e 20  $\mu$ L de tripsina bovina (a 10 mg/mL em KCl 0,1M) foram adicionados para a obtenção do espectro.

**Tripsina bovina em 2,2 e 3,9 M de GuHCl** - 1 mL de GuHCl 2,2 ou 3,9 M e 20  $\mu$ L de cloreto de potássio 0,1 M foram adicionados às cuvetas referência e amostra, respectivamente, para traçar a linha de base. A solução

da cuveta amostra foi descartada e 1mL de GuHCl nas concentrações anteriores e 20  $\mu$ L de tripsina bovina (a 10 mg/mL em KCl 0,1 M) foram adicionados para a obtenção do espectro.

### **Titulação espectrofotométrica de N-acetil-triptofanil-etil-éster e N-acetil-tirosinil-etil-éster**

**Efeito de concentrações crescentes de GuHCl sobre a absorvância de N-Ac-Tyr-EE e N-Ac-Trp-EE** - Os reagentes utilizados foram (A) água desionizada, (B) solução de GuHCl a 8M em água desionizada, e (C) solução a 0,01M de N-Ac-Tyr-EE em DMSO (conservada no freezer em frasco âmbar). Procedimento: 1mL de A foi adicionado nas cuvetas referência (R) e amostra (S). As cuvetas R e S foram utilizadas como branco. 20  $\mu$ L de C foi adicionado na cuveta S e 20  $\mu$ L de A foi adicionado na cuveta R. Fez-se 20 adições sucessivas de 100  $\mu$ L da solução B na cuveta S, misturou-se bem e a absorvância foi lida em 274 nm para N-Ac-Tyr-EE e em 281,5 para N-Ac-Trp-EE nm na cuveta após cada adição.

## **Redução total das ligações dissulfeto e carboxiamidometilação dos grupos sulfidril de ribonuclease A bovina**

0,1 g de ribonuclease A bovina foi adicionada em 20 mL de uma solução contendo hidrocloreto de guanidina 6M em Tris-HCl pH:8,0 ( $[E]_{Final}$ : 0,000364963 M); 0,0309 g de ditioneitol foi adicionado e incubou-se a solução à 37 graus Celsius durante 2 horas ( $[DTT]$ : 0,01M); 0,07 g de iodoacetamida foi adicionado e incubou-se a solução no escuro (o recipiente contendo a amostra foi coberto com papel alumínio) em temperatura ambiente por aproximadamente 1 hora ( $[IAA]_{Final}$ : 0,02 M). A solução foi submetida a diálise no escuro contra hidrocloreto de guanidina 2 M em Tris-HCl pH 8,5 durante 3 horas e duas vezes contra cloreto de sódio 0,2 M (Walker, 1984).

## **Equilíbrio de desnaturação de proteínas induzido pelo hidrocloreto de guanidina**

Efeito de concentrações crescentes de GuHCl sobre a absorvância em 285 nm de ribonuclease A bovina (a 0,8 mg/mL), ribonuclease A reduzida e carboxiamidometilada (a 0,9 mg/mL), em 273 nm para a tripsina (0,6 mg/mL), 278 nm para piratoxina I de *Bothrops pirajai* (1,9 mg/mL), em 280 nm para as miotoxina I (0,53 mg/mL) e miotoxina II (0,2 mg/mL) de *Bothrops moojeni* e 278 nm para *Bothropstoxina* (1mg/mL) de *Bothrops jararacussu* (Breems et al., 1990) - As soluções estoque de proteínas foram preparadas em KCl 0,1 M e GuHCl a

8 M em KCl 0,1 M. Soluções: (A) KCl 0,1M, (B) solução de GuHCl a 8M em KCl 0,1M e (C) soluções de ribonuclease A bovina, ribonuclease A reduzida e carboxiamidometilada, tripsina A bovina, piratoxina I de *Bothrops pirajai*, miotoxinas I e II de *Bothrops moojeni*, e bothropstoxina de *Bothrops Jararacussu*. Procedimento: 1mL de A foi adicionado nas cuvetas referência (R) e amostra (S). As cuvetas R e S foram zeradas. 20  $\mu$ L de C foi adicionado na cuveta S e 20  $\mu$ L de A na cuveta R. 20 Foram feitas 20 adições sucessivas de 100  $\mu$ L da solução B na cuveta S, As amostras foram bem misturadas e a absorvância foi lida após cada adição. As amostras foram filtradas para remover partículas individuais.

A análise das curvas de desenovelamento foi feita assumindo um mecanismo de dois estados. Para um mecanismo de dois estados (Pace, 1974), assume-se que

$$f_f + f_u = 1 \quad [1],$$

onde  $f_f$  e  $f_u$ , representam a fração da proteína presente nas conformações enoveladas e desenoveladas, respectivamente.

y em qualquer ponto da região de transição pode ser dado por

$$y = y_F f_F + y_U f_U \quad [2],$$

onde  $y_F$  e  $y_U$  representam os valores de y característicos dos estados enovelado e desenovelado, respectivamente.

Combinando-se as equações anteriores, obtemos

$$f_u = (y_F - y)/(y_F - y_U) \quad [3],$$

A mudança da energia livre,  $\Delta G$ , pode ser calculada, usando-se

$$\Delta G = - RT \ln K = - RT \ln [(y_F - y)/(y - y_U)] \quad [4],$$

onde R é a constante dos gases (1,987 cal/mol. K) e T é a temperatura absoluta em graus Kelvin. Os valores de  $y_F$  e  $y_U$  foram obtidos por extrapolação das regiões de pré- e pós-transição da curva de desenovelamento da proteína.

A constante de equilíbrio pode ser calculado, usando-se

$$K_D = e^{-\Delta G/RT} = f_U/f_N \quad [5].$$

O método de extrapolação linear foi usado para determinar a variação da energia livre. A metodologia foi originalmente utilizado com base na observação da dependência linear da variação da energia livre observada durante o desenovelamento como uma função do desnaturante (Bolen et al., 1988; Santoro et al., 1992; Bolen et al., 1995).

A variação da energia livre da solução de proteína em KCl 0,1 M foi determinada pela extrapolação do  $\Delta G$  em função da concentração do desnaturante.

A medida da diferença na absorvância,  $\Delta A$ , foi convertido em mudança molar,  $\Delta \epsilon$ , conhecendo-se a concentração de proteína e o caminho óptico da célula, de acordo com a Lei de Lambert - Beer,

$$\Delta \epsilon = \Delta A / c \times l \quad [6].$$

01179/97

## Medida da estabilidade de RNase A Bovina

**Estabilidade de Ribonuclease A Bovina** - A estabilidade de ribonuclease A bovina (a 40 mg/mL) foi estimada pela incubação durante 24 horas em concentrações de 0 a 6 M de hidrocloreto de guanidina (Ort et al., 1995), tamponado com tris-sulfato 0,1M pH 7,5 ou tris-acetato pH 4,5. As amostras foram termostatizadas à 23 °C. A transição de desnaturação foi medida espectrofotometricamente usando-se cuvetas de quartzo de 1cm de caminho óptico. As células referência e a amostra continham a mesma concentração do desnaturante e do tampão. As soluções foram filtradas antes da medida de absorvância. Entretanto o grau de precipitação da amostra de proteína variou com a concentração do agente desnaturante. Para compensar esta variação durante as medidas espectrofotométricas, a taxa de  $A_{285nm}/A_{260nm}$  foi determinada para cada amostra, uma vez que  $A_{260nm}$  não é afetada pela desnaturação completa e serviu como um padrão interno. As leituras foram feitas no espectrofotômetro Hitachi modelo U-2000. Como o hidrocloreto de guanidina é altamente higroscópico, as molaridades de todas as soluções utilizadas neste experimento foram determinadas por refratometria (Pace, 1986; Martensson et al., 1992).

## **Determinação da cinética de hidrólise de citidina 2':3'-fosfato na ausência e presença de GuHCl**

**Atividade de Ribonuclease A Bovina** - A atividade de ribonuclease A bovina foi monitorada espectrofotometricamente (Hitachi U-2000) a 284 nm utilizando-se Citidina 2':3'- Fosfato (0,3 mg dissolvidos em 3.0 mL de tampão tris-HCl pH 7,0) como substrato, e a enzima (0,5 mg em 3mL de tampão Tris-HCl pH 7,0). É importante que o pH do tampão seja aproximadamente 7 para minimizar os efeitos de mudanças no substrato durante a reação (Aronsson et al., 1995; Crook, 1959).

**Medida da perda de atividade de RNase A Bovina** - A perda da atividade de RNase A bovina foi medida espectrofotometricamente com amostras contendo a enzima e o substrato em diferentes concentrações de hidrocloreto de guanidina (0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,2; 1,4; 1,6; 2,0; 2,2; 2,4; 2,6; 3,0; 3,2; 3,4; 3,6; 3,8 e 4,0 M). A cuveta de referência continha a mesma concentração do desnaturante e do substrato (Xiao et al., 1996).



## **Estudo da cinética e recuperação da atividade de reenovelamento de RNase A Bovina**

**Cinética de reenovelamento de RNase A bovina** - Para estudar a cinética de reenovelamento, a RNase A bovina (a 2,5 mg/mL) foi desnaturada pela incubação em 8 M de GuHCl e 0,1 M de tampão tris-sulfato pH 7,5 à 23 °C, durante 24 horas. A renaturação foi conseguida diluindo-se a enzima desnaturada com o tampão para concentrações finais em hidrocloreto de guanidina de 6, 3, 2 e 1M. A reação de renaturação foi monitorada pela mudança nas propriedades de absorção no ultravioleta durante 2000 segundos (Subramaniam et al., 1995; Vanhove, 1995; Barry et al., 1988).

**Medida da recuperação da atividade de RNase A bovina** - A amostra de RNase A bovina foi incubada durante 3 horas em GuHCl 8 M. Após este período de incubação a amostra foi submetida a diálise no escuro contra hidrocloreto de guanidina 2 M em tris-HCl pH 8,5, durante 3 horas, e duas vezes contra cloreto de sódio 0,2 M (Walker, 1984). Alíquotas foram retiradas e a atividade foi medida após 0, 2, 4, 8, 10, 12 e 24 horas, utilizando-se citidina 2':3'-fosfato como substrato (Crook, 1959).

## **Dependência com o tempo dos parâmetros $A_{MÁX}$ e $\epsilon_{MÁX}$ de compostos modelos de proteínas**

### **N-Acetil-L-Tirosinil-Etil-Éster e N-Acetil-Triptofanil-Etil-Éster -**

1mL de H<sub>2</sub>O e 20  $\mu$ L de DMSO foram adicionados à cuveta referência e utilizados como branco. 20 $\mu$ L de N-Acetil-Tirosinil-Etil-Éster 0,01 M ou N-Acetil-Triptofanil-Etil-Éster 0,01M em DMSO foram adicionados à cuveta amostra. As medidas foram efetuadas em comprimentos de onda de 273 e 281,5 nm respectivamente, durante 2000 segundos.

### **Gel com gradiente de uréia**

O gel de acrilamida foi conduzido em uma placa quadrada de 82 x 82 mm, que pode ser rodado de 90 °. O gel foi imerso completamente no tampão e a temperatura da eletroforese foi controlada. O gel gradiente de uréia foi formado por fotopolimerização das soluções de acrilamida dentro das placas, onde o gel gradiente de uréia foi obtido, misturando-se duas soluções de acrilamida com duas soluções de uréia (a 0 e 8 M, respectivamente). A solução de acrilamida com alta concentração de uréia foi colocada primeiro com a ajuda de um capilar formando um gradiente contínuo de uréia. Uma bomba peristáltica foi utilizada para controlar o fluxo de 1mL/min. Foi adicionado sorbitol para estabilizar o gradiente. As duas soluções foram idênticas em todos os aspectos, mas um gradiente de acrilamida de 15% a 11% w/v foi usado para contrabalançar os efeitos da uréia nas propriedades

eletroforéticas. A formação do gradiente de uréia no gel foi verificada por refratometria.

Após fotopolimerização o gel gradiente de uréia foi inserido dentro de um aparelho para eletroforese de tal modo que o gradiente de uréia ficasse perpendicular à direção de migração da eletroforese.

O tampão utilizado na eletroforese foi tris-acetato 0,05 M pH 4,0.

Aproximadamente 100 µg de proteína em 50 µL de tampão e 10% de glicerol foi adicionado ao topo do gel para aumentar a densidade. O marcador utilizado para algumas amostras foi o azul de bromofenol.

A eletroforese foi iniciada aplicando-se cerca de 10 mA/gel. Após o marcador ter adentrado alguns milímetros no gel, a corrente foi aumentada e mantida constante em aproximadamente 20 mA/gel. Durante o curso da eletroforese a temperatura foi mantida praticamente constante entre 27 e 30°C. Após o término da corrida eletroforética, que durou aproximadamente 2 horas, o gel foi mantido durante cerca de 10 minutos em solução corante contendo Coomassie Brilliant Blue G e durante a noite em solução fixadora (Creighton, 1979).

O gel com gradiente de uréia foi usado para estimar a variação da energia livre da transição do estado nativo para o estado desenovelado da proteína, segundo as descrições de Creighton (1990).

A mudança na mobilidade (M) da proteína é descrita pela fração da proteína desenovelada. Informações sobre o estado termodinâmico de proteínas pode ser dado pelas equações abaixo

$$F_U = [U]/([U]+[N]) \quad [7],$$

onde [U] é a concentração da proteína desenovelada, [N] é a concentração da proteína nativa e  $F_U$  é a fração da proteína desenovelada.

$$F_U = (M_i - M_N)/(M_U - M_N) \quad [8],$$

onde  $M_i$  é a mobilidade no estado intermediário,  $M_N$  é a mobilidade no estado nativo e  $M_U$  é a mobilidade no estado desenovelado.

A constante de equilíbrio  $K_U$  é dada por:

$$K_U = [U]/[N] = (M_i - M_N)/(M_U - M_N) \quad [9].$$

Schellman (1978) descreveu a energia livre do enovelamento por:

$$\Delta G_f = - RT \ln [(N)/(U)] \quad [10],$$

ou

$$\Delta G = - 2,303 RT \log K_e \quad [11],$$

onde  $\Delta G$  é a variação de energia livre, R é a constante universal dos gases (1,987 cal/mol.K) e T é a temperatura absoluta em graus Kelvin.

No ponto médio da transição, a fração desenovelada é aproximadamente uma função linear da concentração do desnaturante, e uma linha tangencial ao ponto médio pode ser usada para obtenção da energia livre de enovelamento.

A mobilidade das formas nativa e desenovelada define a escala de valores para a energia livre de - 2 RT e + 2 RT.

## RESULTADOS

A **figura 1** apresenta os espectros de absorção no ultravioleta de tripsina bovina em 0, 2 e 4 M de hidrocloreto de guanidina, na presença de KCl 0,1 M. Como pode-se ver, o espectro da tripsina nativa (0,1 M KCl) exibe um ponto de absorvância máxima em torno de 279,5 nm, o que está em concordância com dados registrados na literatura (Villanueva e Herskovitz, 1971). Contudo é em torno de 273 nm que a presença do hidrocloreto de guanidina na solução causa maiores perturbações no espectro da tripsina. Este comprimento de onda foi usado em experimentos de titulação espectrofotométrica contínua de tripsina bovina por GuHCl dentro dos limites de 0 e 5 M do desenovelante (**figura 2**). A transição sigmoideal de desenovelamento da tripsina foi usada para determinação da variação da energia livre de desenovelamento daquela enzima.

A **figura 3** apresenta os espectros de absorção no ultravioleta de RNase A bovina em 0 e 8 M de GuHCl, na presença de KCl 0,1 M. Os resultados são apresentados sem nenhum artifício de derivação para redução no nível de ruído determinado pelos baixos valores de absorvância do experimento. O máximo de absorvância foi observado por volta de 274 nm, mas o ponto de maior perturbação espectral pelo hidrocloreto de guanidina está em torno de 285 nm. Este comprimento de onda foi então utilizado na titulação contínua de ribonuclease A bovina por hidrocloreto de guanidina, dentre os

limites de 0 e 5 M do desnaturante. A **figura 4** apresenta os resultados obtidos. Esta curva de transição de desnaturação foi utilizada para o cálculo da constante de equilíbrio e da variação da energia livre da transição de desenovelamento da ribonuclease A. As pequenas inclinações dos segmentos de pré-transição e pós-transição, respectivamente, da curva de desenovelamento da ribonuclease A (**figura 4**), não são artefatos devidos a instabilidade de leitura do espectrofotômetro, mas sim características reais da transição. Não há perturbações significativas quando as absorvâncias em 285 nm de RNase A a 2,5 M em KCl 0,1 M e em 8 M de GuHCl (pré-incubada a 23 °C durante 24 horas) são monitoradas durante cerca de 30 minutos (**figura 5**), tempo suficiente para executar a transição de desenovelamento da enzima (**figura 4**).

As técnicas de titulação espectrofotométrica de proteínas por hidrocloreto de guanidina, aprendidas com o uso de tripsina e ribonuclease A bovinas (**figuras 1, 2, 3 e 4**) foram empregadas na titulação de proteínas para as quais as transições de desenovelamento ainda não haviam sido estudadas. As **figuras 6 e 7** mostram a transição de desnaturação das miotoxinas I e II de *Bothrops moojeni*, da bothropstoxina I de *Bothrops jararacussu*, e da piratoxina I de *Bothrops pirajai*. Os comprimentos de onda utilizados em cada ensaio foram obtidos por meio de dados espectrais para as proteínas.

Além da titulação espectrofotométrica por hidrocloreto de guanidina, as medidas espectrofotométricas de proteínas também foram utilizadas para

determinação de seus coeficientes de extinção. Estes dados estão mostrados na **tabela I**, para RNase A íntegra e RNase A com grupamentos sulfidrilas reduzidos e carboxiamidometilados (RCAM-RNase A), tripsina bovina, miotoxinas I e II de *Bothrops moojeni*, bothropstoxina I de *Bothrops jararacussu* e piratoxina I de *Bothrops pirajai*.

A **tabela II** mostra, para as proteínas estudadas, as medidas da transição de desnaturação, que são estimativas reais da mudança da absorvância que ocorre no curso do desenovelamento, a partir das medidas da absorvância molar da proteína no estado nativo e no estado desenovelado.

A **figura 8** apresenta os espectros de absorção no ultravioleta de N-Ac-Tyr-EE em 0, 2, 4 e 8 M de GuHCl, em soluções contendo 0,1 M de KCl. A maior perturbação espectral determinada pelo solvente ocorreu em torno de 274 nm. Este comprimento de onda foi utilizado em experimentos de titulação espectrofotométrica contínua do cromóforo por GuHCl dentre os limites de 0 e 6 M. Os resultados desta titulação estão mostrados na **figura 9**.

Os espectros de absorção no ultravioleta de N-Ac-Trp-EE em 0, 2 e 4 M de GuHCl, todos em soluções contendo 0,1 M de KCl, estão mostrados na **figura 10**. A maior perturbação espectral determinada pelo solvente ocorreu em torno de 281,5 nm. Este comprimento de onda foi utilizado em experimentos de titulação espectrofotométrica contínua do cromóforo por GuHCl dentre os limites de 0 e 6 M. Os resultados da titulação estão mostrados na **figura 11**.

As pequenas inclinações apresentadas pelas dependências das absorvâncias em 274 nm de N-Ac-Tyr-EE (**figura 9**) e em 281,5 nm de N-Ac-Trp-EE (**figura 11**), respectivamente, com a concentração de hidrocloreto de guanidina, não são artefatos experimentais, mas sim características reais dos experimentos. Os valores de  $A_{274\text{ nm}}$  do N-Ac-Tyr-EE e  $A_{281,5\text{ nm}}$  do N-Ac-Trp-EE, com ambos os cromóforos em 8 M de GuHCl, não são significativamente perturbados com o tempo (**figura 12**) durante os cerca de 30 minutos necessários para efetuar a titulação espectrofotométrica dos cromóforos.

As medidas espectrais de N-Ac-Tyr-EE e N-Ac-Trp-EE foram utilizadas na determinação de seus coeficientes de extinção molar. A **tabela III** apresenta os valores calculados. Estes valores são concordantes para cromóforos de Tyr e Trp com valores reportados na literatura (Edelhoch, 1967).

Quando se observa atentamente uma titulação espectrofotométrica de uma proteína por solventes como o hidrocloreto de guanidina, o decaimento spectral observado (**figuras 2, 4, 6 e 7**) pode sugerir uma precipitação da proteína, o que de fato ocorre com proteínas como a anidrase carbônica (Mårtensson et al., 1992). Segundo aqueles autores, um modo simples e eficiente de descartar as possíveis contribuições devidas a precipitações da proteína durante a titulação espectrofotométrica, constitui na medida da razão de  $A_{\text{máx.}}/A_{260\text{ nm}}$ , uma vez que  $A_{260}$  não é significativamente afetado pela desnaturação completa da proteína (Edsall et al., 1966). Esta relação é referida na literatura e neste trabalho como razão ou mudança fracional da absorvância



da proteína. O efeito do pH sobre a transição de desenovelamento da ribonuclease A foi convenientemente estudado por medidas da razão fracional da proteína. A **figura 13** mostra a titulação espectrofotométrica fracional da ribonuclease A em pH 4,5 e pH 7,5.

A reversibilidade do desenovelamento de RNase A por hidrocloreto de guanidina foi estudada num experimento em que a proteína pré-incubada com 8 M do desenovelante foi diluída com KCl 0,1 M até 2 M de GuHCl. A **figura 14** apresenta a curva de renaturação da RNase A, juntamente com sua curva de desenovelamento.

A **figura 15** mostra a cinética de reenovelamento da RNase A pré-incubada por 24 horas, a 23 °C, em 8 M de GuHCl, e então diluída com KCl 0,1 M para concentrações finais de 6, 3, 2 e 1 M de GuHCl. Os pontos experimentais foram fitados a polinomiais do terceiro grau para obtenção dos valores de  $t_{1/2}$ , que representam o intervalo de tempo necessário para o reenovelamento de 50 % das moléculas de proteína.

O efeito de concentrações entre 0 e 4 M de GuHCl sobre a cinética de hidrólise de citidina 2':3'-fosfato pela RNase A está mostrado na **figura 16**. As velocidades iniciais destas curvas foram utilizadas para obtenção das atividades da RNase A em diferentes concentrações do desenovelante. A **figura 17** mostra a dependência da atividade da enzima com a concentração de GuHCl dentro dos limites de 0 e 4 M.

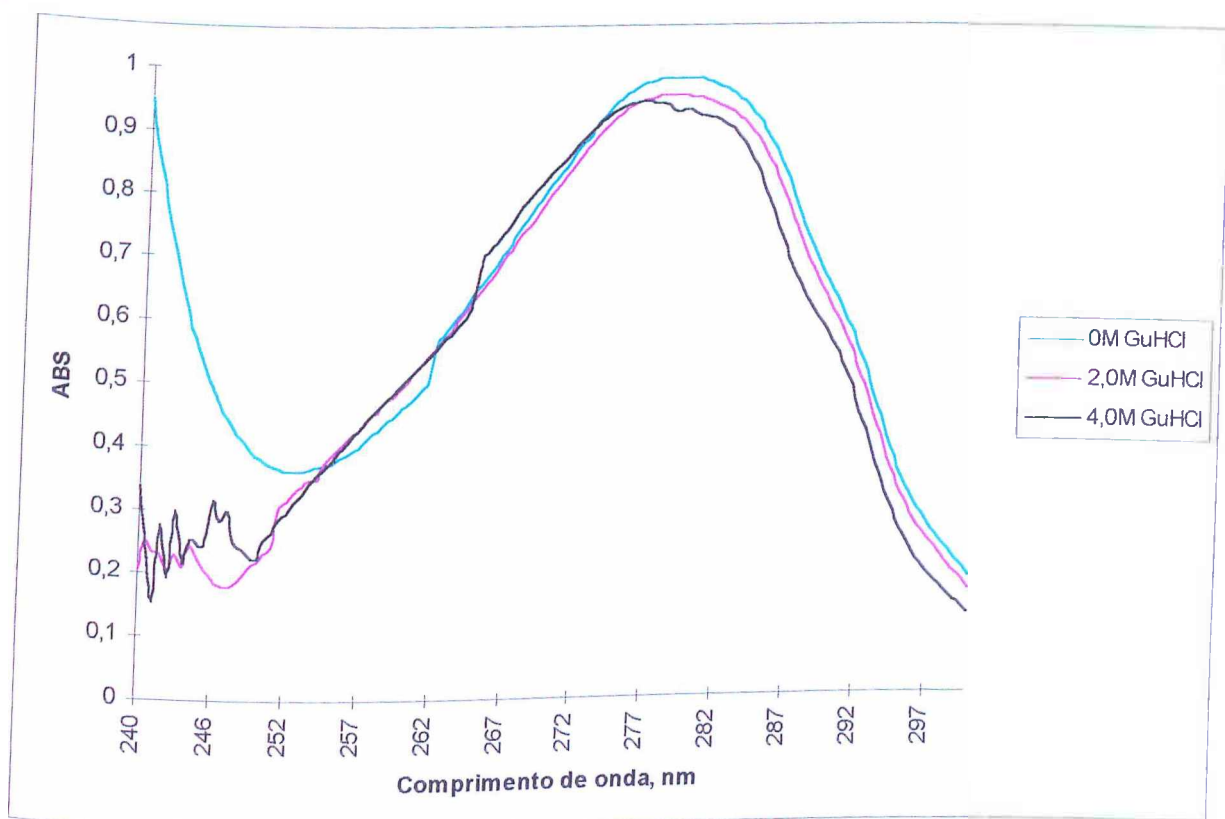
Nos experimentos de reenovelamento por diluição de soluções da proteína em concentrações a 8 M para concentrações mais baixas de GuHCl, o equilíbrio da extinção da proteína é atingido bem rapidamente (**figura 15**). Porém, quando a diminuição da concentração do desenovelante ocorre por diálise, a recuperação da atividade da RNase A ocorre bem lentamente, como pode ser visto na **figura 18**.

A **figura 19** mostra a titulação espectrofotométrica de RCAM-RNase A com GuHCl entre os limites de 0 e 6 M. Pode-se ver que o padrão de dependência da absorvância com a concentração do desenovelante é análogo ao padrão dos cromóforos, ou seja, a dependência é também linear. Isto indica que a ribonuclease A com suas sulfidrilas quimicamente bloqueadas não apresenta estrutura que pudesse ser espectrofotometricamente detectada.

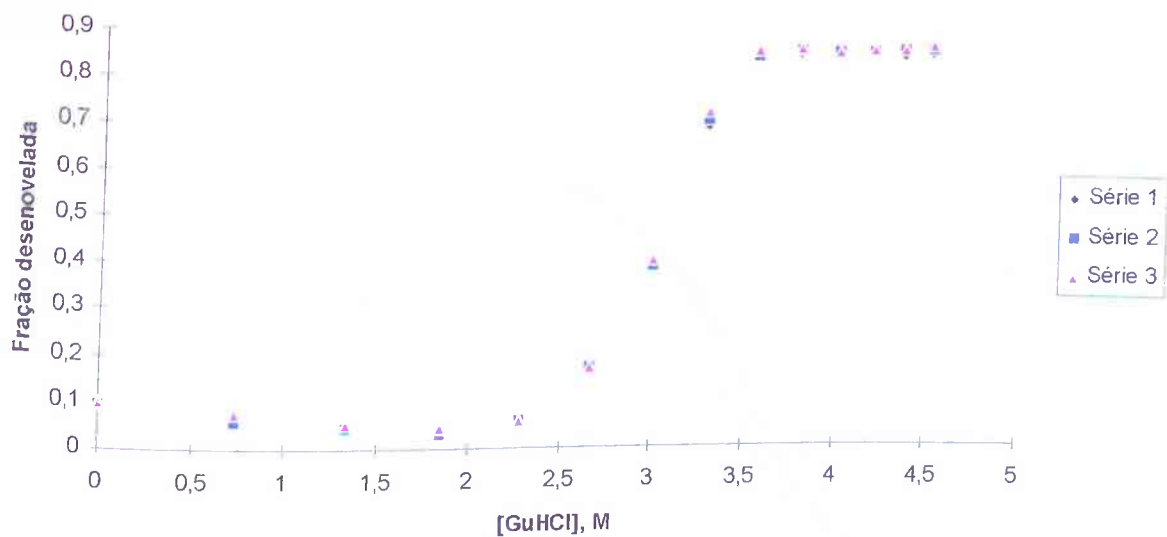
A partir das transições de desenovelamento de tripsina bovina (**figura 2**), ribonuclease A (**figura 4**), miotoxinas I e II de *Bothrops moojeni* (**figura 6**), bothropstoxina I de *Bothrops jararacussu* e piratoxina I de *Bothrops pirajai* (**figura 7**), foram determinadas as constantes de equilíbrio e as variações de energia livre em pontos intermediários da transição entre os estados N e U de cada proteína. Estes valores de variação da energia livre do desenovelamento foram plotadas contra a concentração de hidrocloreto de guanidina. A reta de regressão daqueles pontos foi usada para determinação de  $\Delta G_D^{H_2O}$ , a variação de energia livre do desenovelamento na ausência do desnaturante, segundo o método da extrapolação linear (Pace, Shirley &

Thomson, 1990). Estes resultados são apresentados na **tabela IV**, juntamente com a inclinação (**m**) de cada reta de regressão e a **D<sub>1/2</sub>**, que é a concentração do desnaturante no ponto médio da transição.

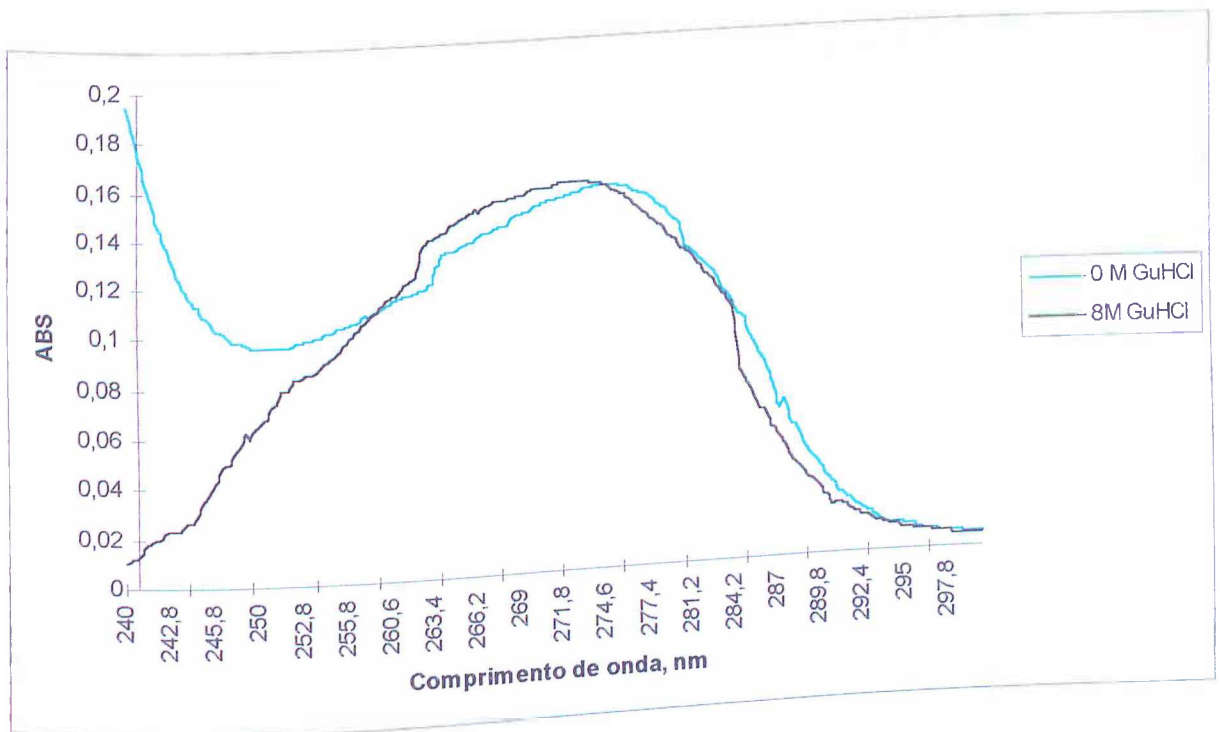
O desenovelamento de ribonuclease A, miotoxinas I e II de *Bothrops moojeni*, e piratoxina I de *Bothrops pirajai*, foi também estudado por eleforese em gel de poliacrilamida com gradiente de uréia, segundo as descrições de Creighton (1990). Os resultados estão mostrados nas **figuras 20, 21, 22 e 23**. A partir dos géis com gradiente de uréia foram determinadas as variações da energia livre para cada uma das transições de desenovelamento daquelas proteínas. Os valores estão na **tabela V**.



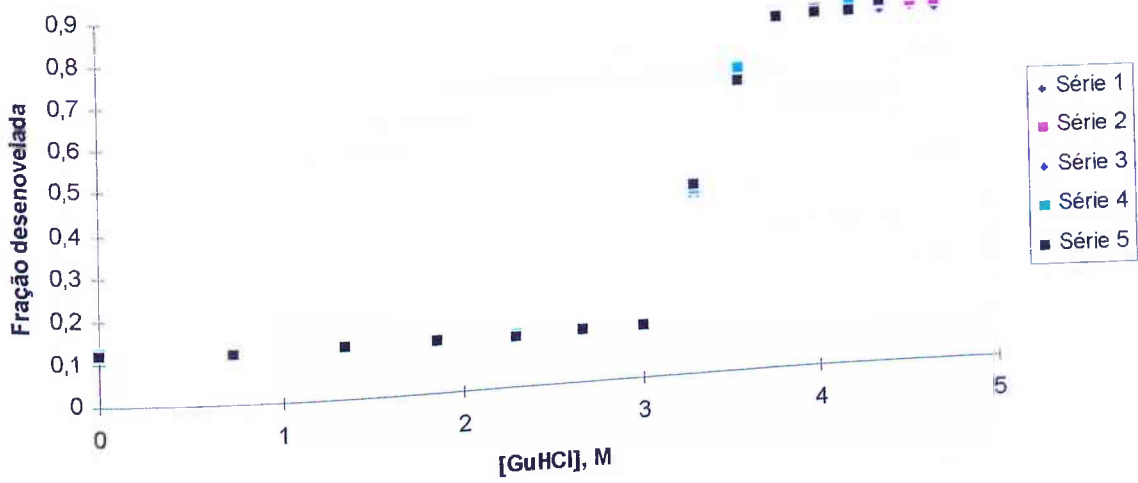
**Figura 1** - Espectro de absorção no ultravioleta de tripsina bovina em 0, 2 e 4 M de hidrocloreto de guanidina. A amostra de tripsina bovina (10 mg/mL) foi dissolvida em KCl 0,1 M (—), hidrocloreto de guanidina 2 M (—), e hidrocloreto de guanidina 4 M (—). O espectro foi obtido a temperatura ambiente, com uma cuveta de 1 cm de caminho óptico, em um espectrofotômetro Zeiss Spekol.



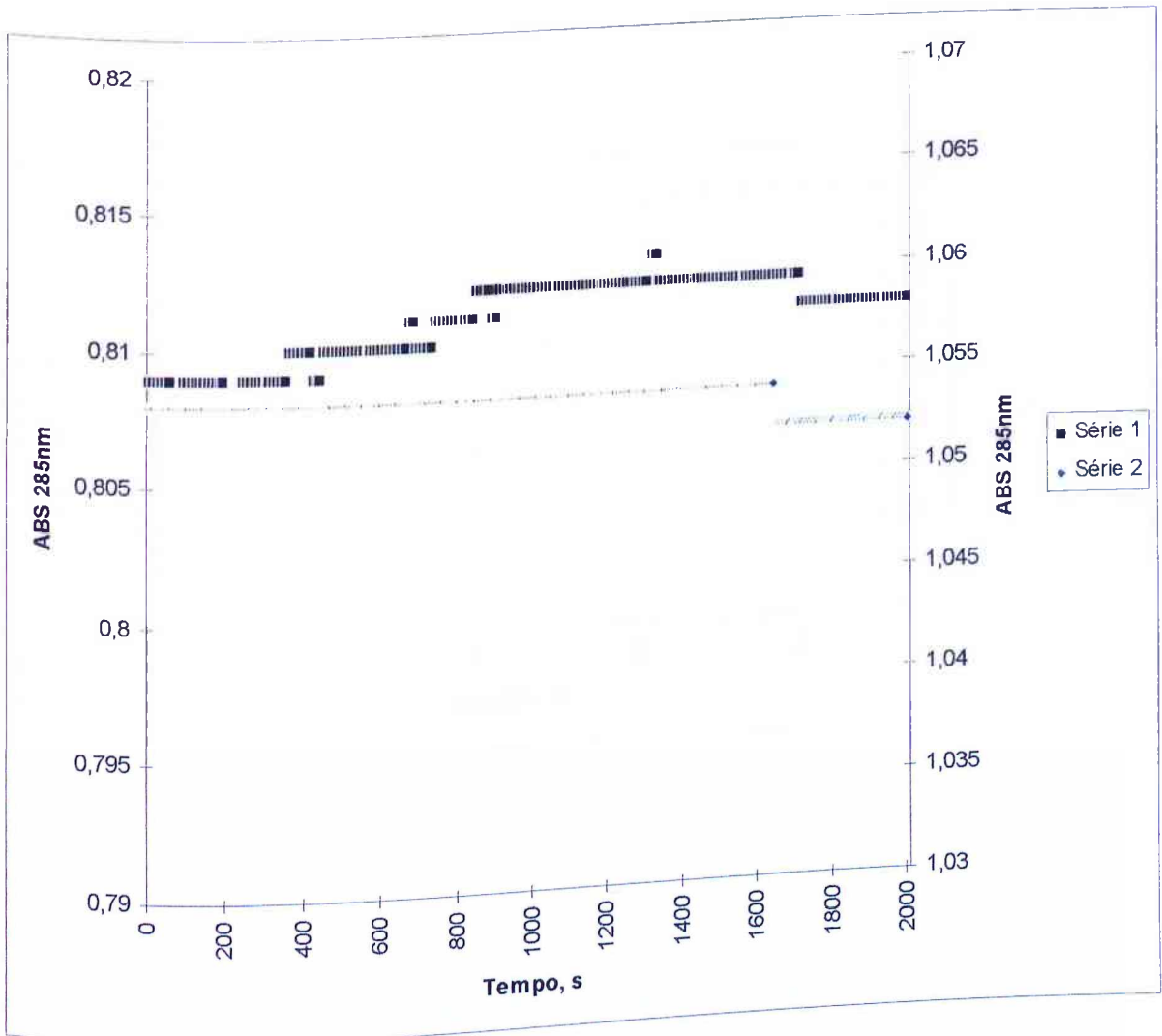
**Figura 2 - Transição de desnaturação induzida por concentrações crescentes de hidrocloreto de guanidina sobre tripsina bovina. Os dados de 3 séries de experimentos iguais produziram uma curva sigmoideal.**



**Figura 3** - Espectro de absorção no ultravioleta de ribonuclease A bovina no estado nativo (0 M GuHCl em KCl 0,1M) e estado desenovelado (8 M GuHCl) pH 5,0. O espectro foi obtido a temperatura ambiente, com uma cuveta de 1 cm de caminho óptico, em um espectrofotômetro Zeiss Spekol.

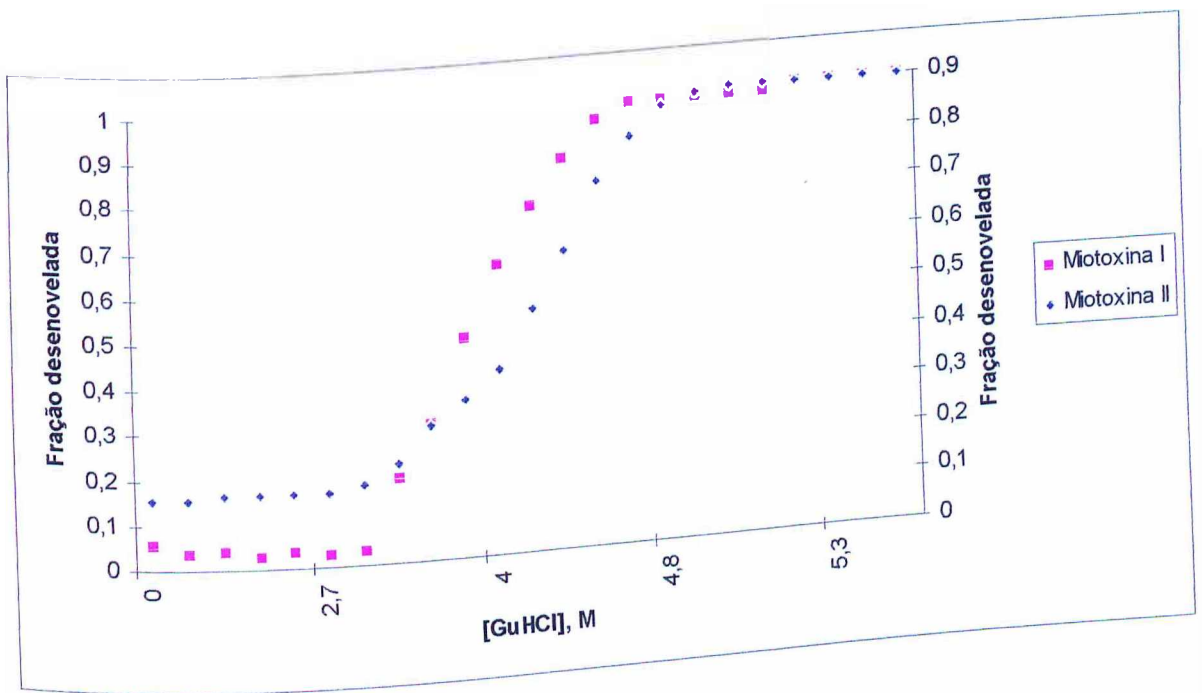


**Figura 4** - Transição de desnaturação induzida por concentrações crescentes de hidrocloreto de guanidina sobre ribonuclease A bovina. Os dados de 5 séries de experimentos iguais produziram uma curva sigmoideal.



**Figura 5** - Dependência com o tempo de  $A_{285nm}$  da ribonuclease A bovina a 2,5 mg/mL. A amostra de proteína foi pré-incubada em KCl 0,1 M (■) e em GuHCl 8 M a 23 °C durante 24 horas (◆).





**Figura 6** - Equilíbrio de desnaturação induzido pelo hidrocloreto de guanidina sobre as miotoxinas I e II de Bothrops moojeni. As ordenadas a esquerda e a direita correspondem as curvas para a miotoxina I e II respectivamente.

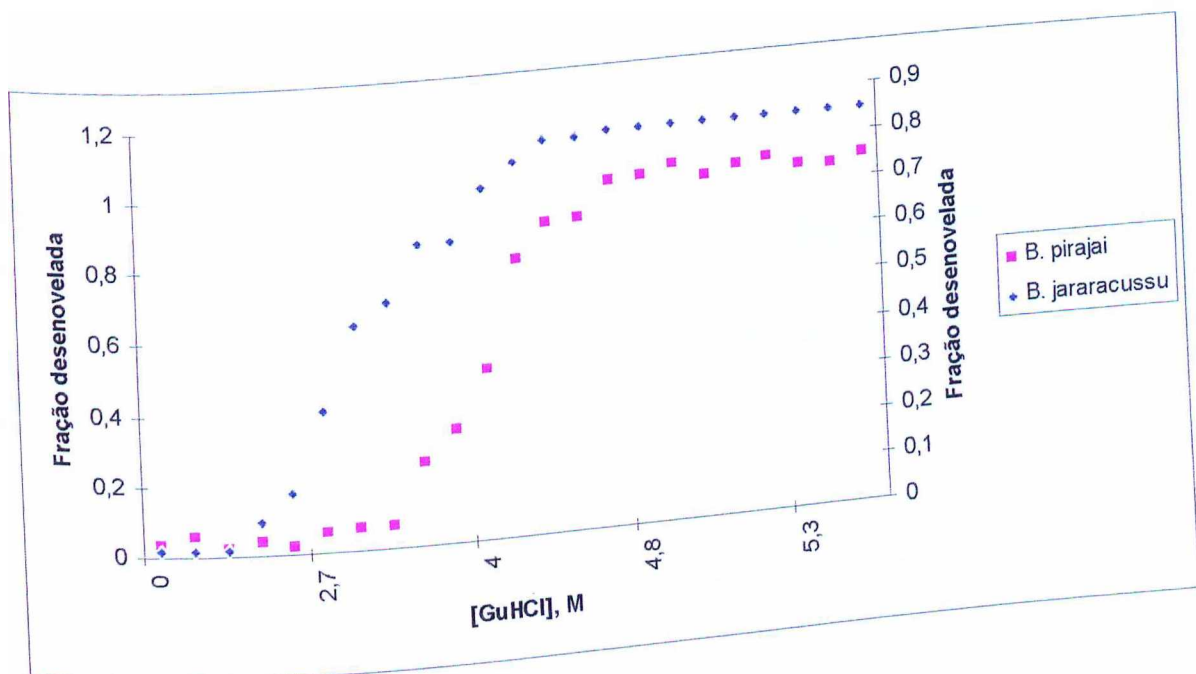


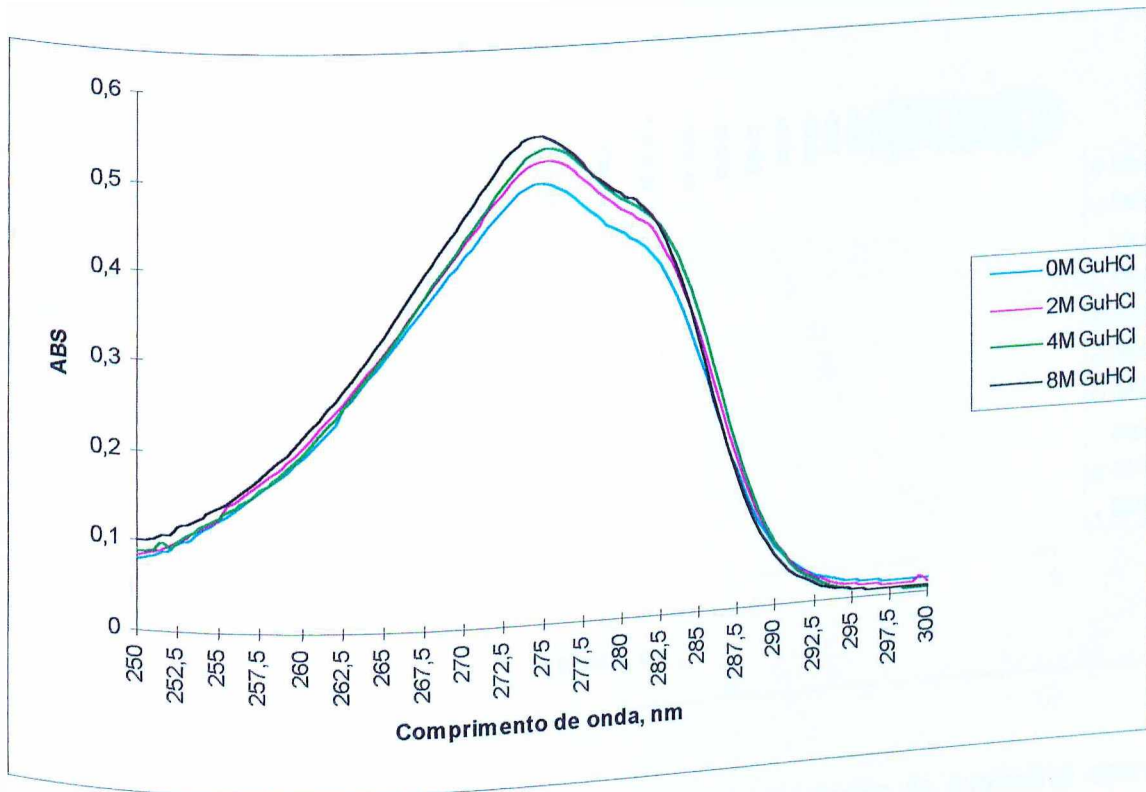
Figura 7 - Equilíbrio de desnaturação induzido pelo hidrocloreto de guanidina sobre as absorvâncias máximas de bothropstoxina I de Bothrops jararacussu e piratoxina I de Bothrops pirajai. As ordenadas a esquerda e a direita correspondem as curvas para as piratoxina I e bothropstoxina I, respectivamente.

**Tabela I** - Cálculo dos coeficientes de extinção molar ( $\epsilon_M$ ) e percentual ( $\epsilon_{1\%}$ ) a partir de medidas espectrofotométricas de proteínas em KCl 0,1 M

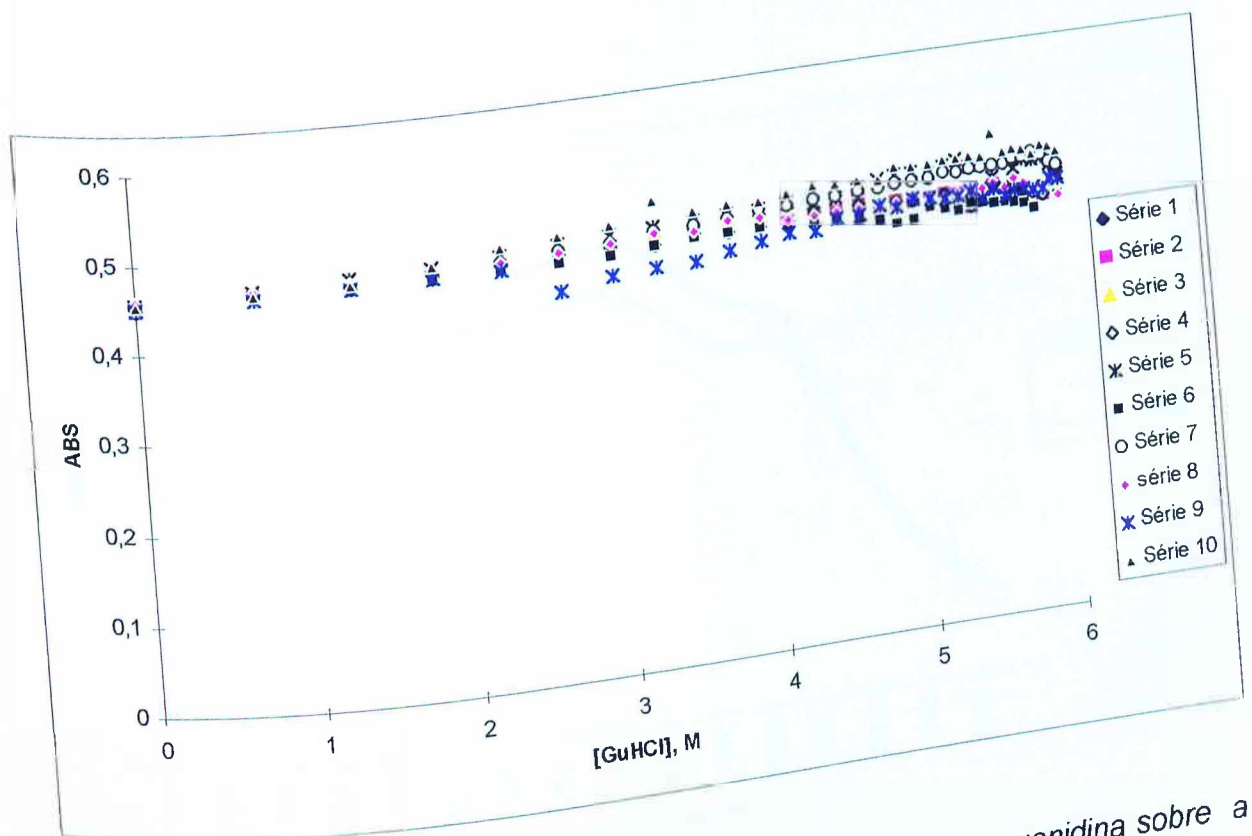
Proteína	Massa Molar	$\lambda$ (nm)	$\epsilon_{1\%}$	$\epsilon_M$
Ribonuclease A bovina	13.693	278,0	7,1	9708,0
		280,0	6,7	9178,4
				31151,4
Tripsina bovina	23.998	278,0	12,9	15389,0
Miotoxina I de <i>Bothrops moojeni</i>	13.766	277,0	11,0	15419,0
		278,0	11,2	15123,3
		280,0	10,9	16292,2
Miotoxina II de <i>Bothrops moojeni</i>	13.887	277,0	11,7	16328,3
		278,0	11,8	16161,9
		280,0	11,6	13534,4
Bothropstoxina I de <i>Bothrops jararacussu</i>	14.200	280,0	9,5	12382,0
Piratoxina I de <i>Bothrops pirajai</i>	13652	278,0	9,1	11903,0
		280,0	8,7	

**Tabela II-** Medida da transição de desnaturação ( $\Delta A$ ) de proteínas.  $A_N$  e  $A_U$  são as absorvâncias molares das formas nativa e desnaturada respectivamente.  $\Delta A$  é a mudança molar na absorvância no ponto médio da transição, dada por  $A_{0M\text{ GuHCl}} - A_{6M\text{ GuHCl}}$ .

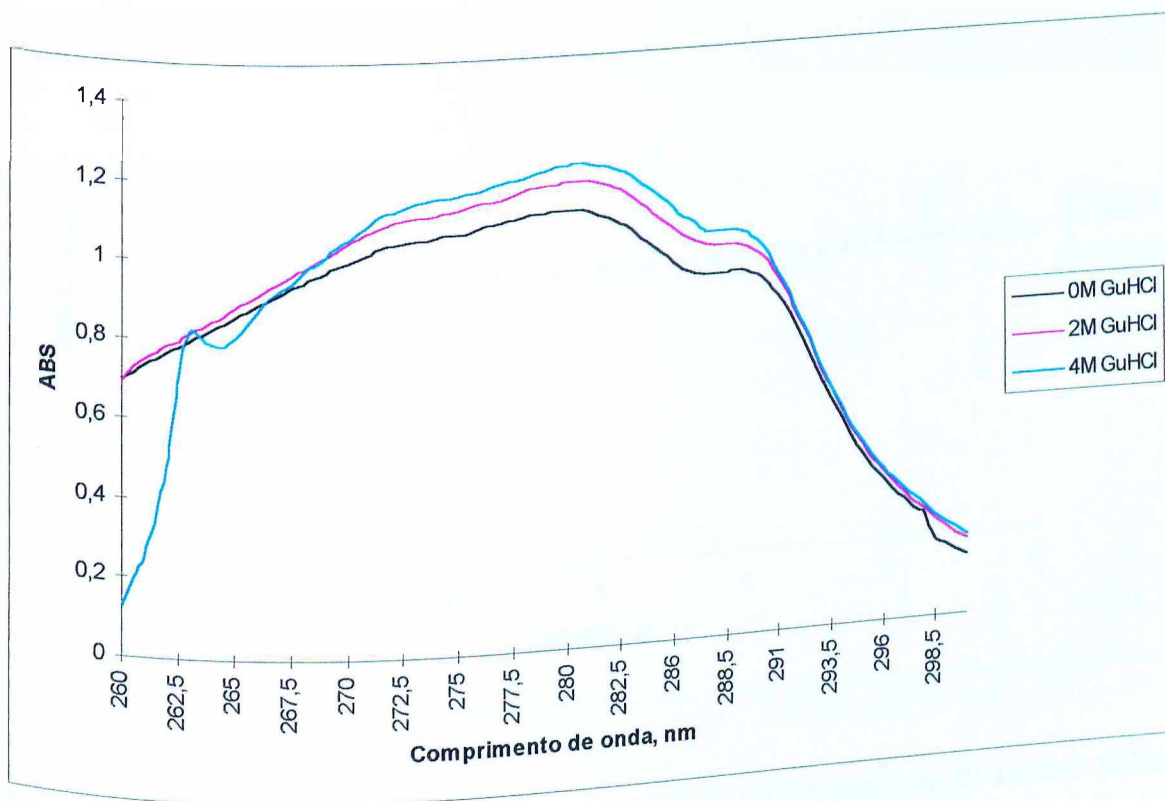
Proteína	$A_N$	$A_U$	$\Delta A$
Ribonuclease A bovina	0,36	0,24	0,12
Tripsina bovina	0,77	0,69	0,08
Miotoxina I de <i>Bothrops moojeni</i>	0,65	0,48	0,17
Miotoxina II de <i>Bothrops moojeni</i>	0,25	0,17	0,08
Bothropstoxina I de <i>Bothrops jararacussu</i>	1,02	0,99	0,03
Piratoxina I de <i>Bothrops pirajai</i>	1,77	1,50	0,27



**Figura 8** - Espectro de absorção no ultravioleta de N-Acetil-Tirosinil-Etil-Éster em 0 (—), 2 (—), 4 (—) e 8 M (—) de hidrocloreto de guanidina.

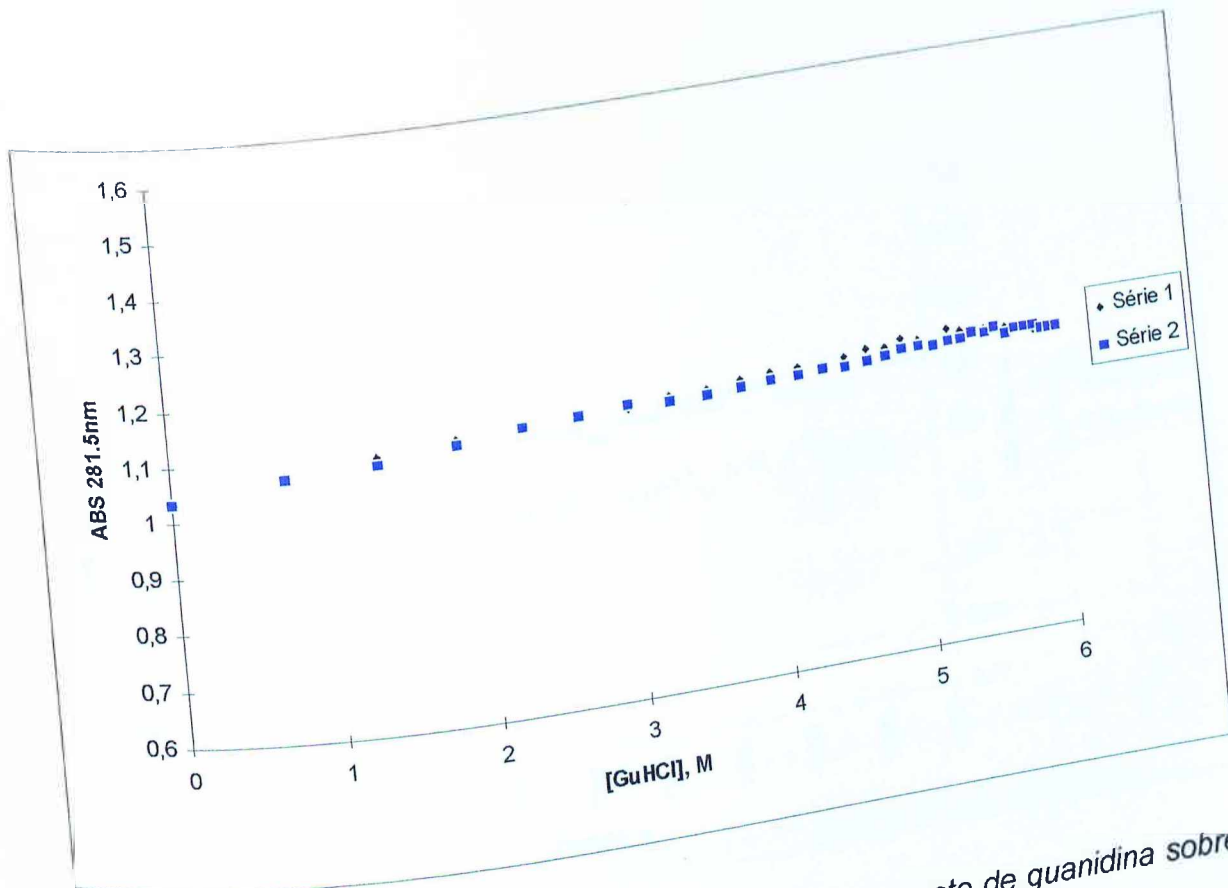


**Figura 9** - Efeito de concentrações crescentes de hidrocloreto de guanidina sobre a absorvância máxima do *N*-Acetil-Tirosinil-Etil-Éster a 0,01 M em DMSO. Os dados de dez séries de experimentos iguais produziram uma reta de regressão dada pela equação  $\epsilon_{274} = 1355 + 24,3 [\text{GuHCl}]$ , onde  $\epsilon_{274}$  é o coeficiente de extinção molar do cromóforo em 274 nm e  $[\text{GuHCl}]$  é a concentração molar de hidrocloreto de guanidina.



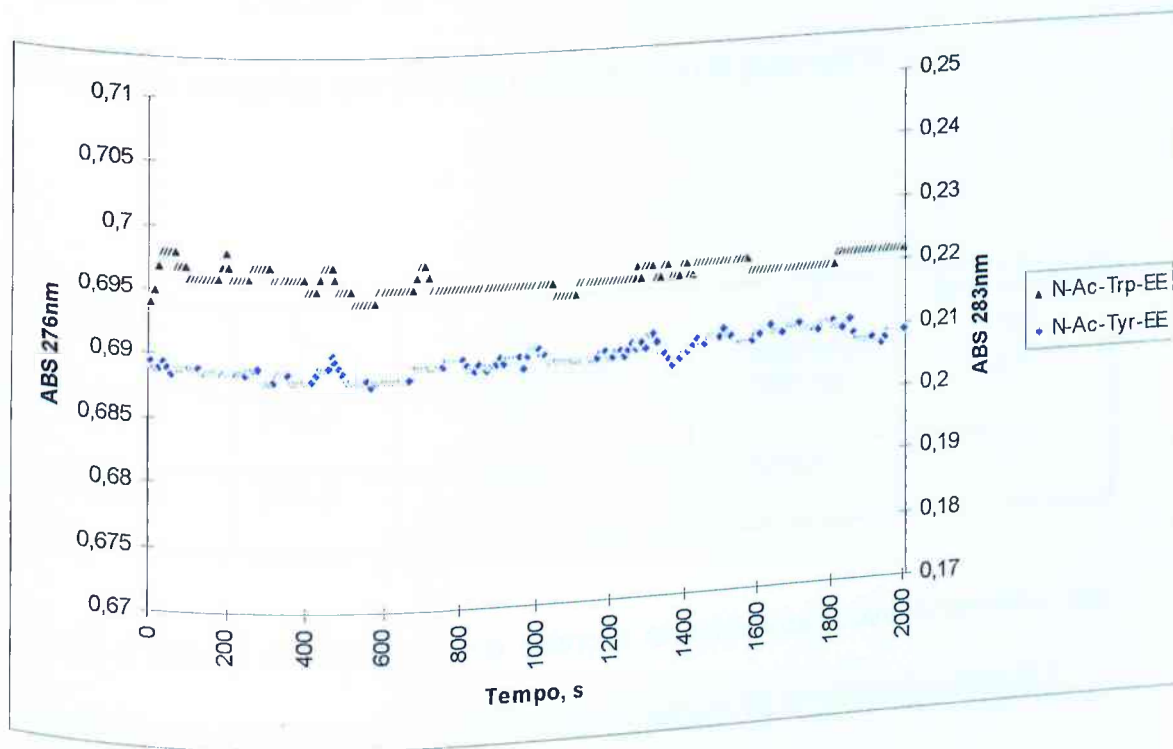
**Figura 10** - Espectro de absorção no ultravioleta de *N*-Acetil-Triptofanil-Etil-Éster em 0 (—), 2 (—) e 4 M (—) de hidrocloreto de guanidina.





**Figura 11** - Efeito de concentrações crescentes de hidrocloreto de guanidina sobre a absorvância máxima de *N*-Acetil-Triptofanil-Etil-Éster a 0,01 M. Os dados de duas séries de experimentos iguais produziram uma reta de regressão dada pela equação  $\epsilon_{281,5} = 5361,8 + 68,2 [\text{GuHCl}]$ , onde  $\epsilon_{281,5}$  é o coeficiente de extinção molar do cromóforo em 281,5 nm e  $[\text{GuHCl}]$  é a concentração molar do desnaturante.





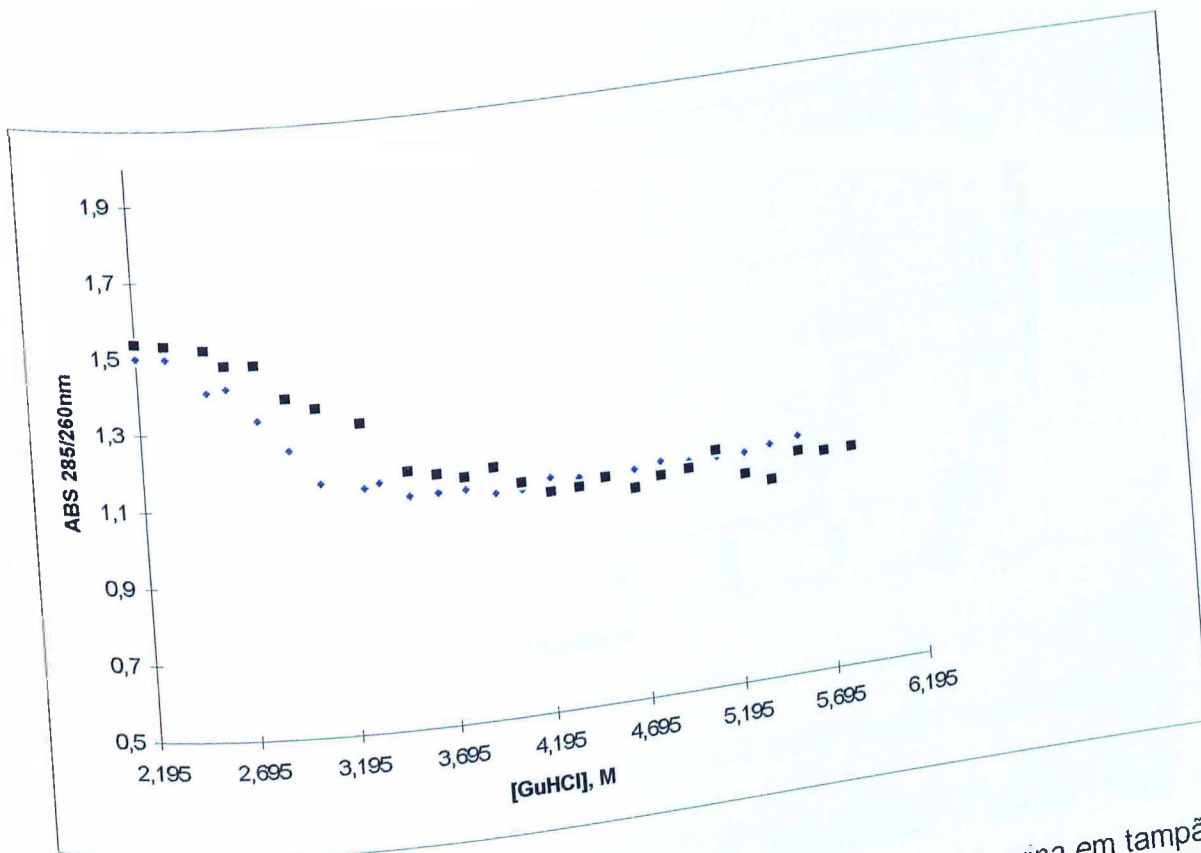
**Figura 12** - Dependência com o tempo da absorvância em 274 nm de N-Acetil-Triptofanil-Etil-Éster ( $\blacktriangle$ ) e N-Acetil-Tirosinil-Etil-Éster ( $\blacklozenge$ ), ambos em GuHCl 8 M. A ordenada a esquerda corresponde a dependência do N-Ac-Trp-EE e a ordenada a direita a dependência do N-Ac-Tyr-EE.

**Tabela III** - Cálculo do coeficiente de extinção molar ( $\epsilon_M$ ) de compostos modelos em 6 M de hidrocloreto de guanidina.

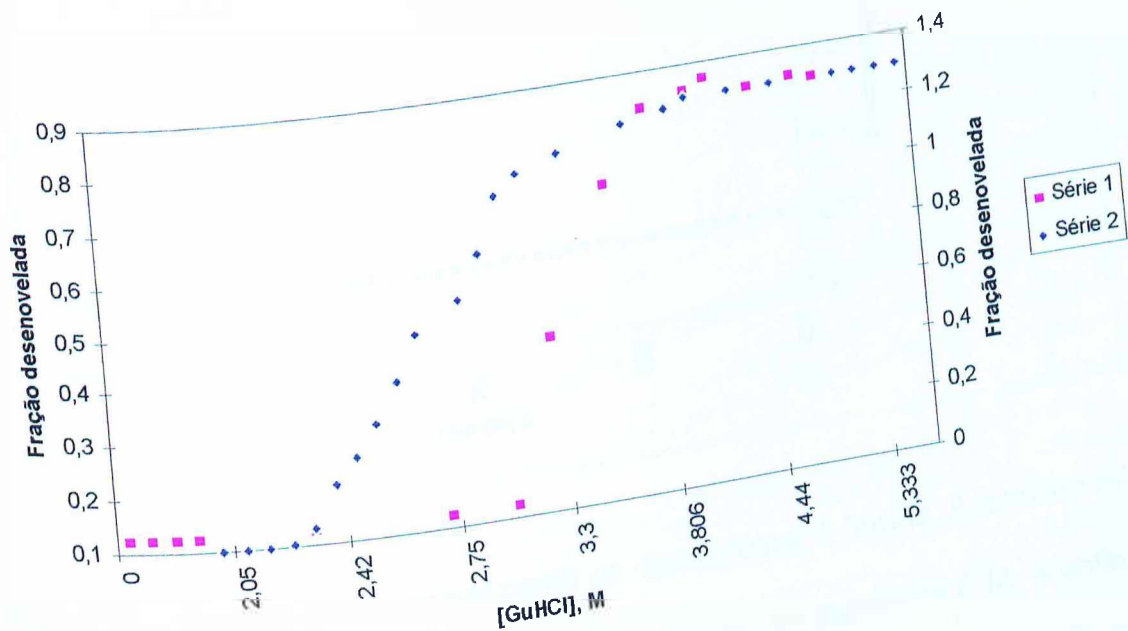
Cromóforos	$\lambda$ (nm)	$\epsilon_M^1$ (Experimental)	$\epsilon_M^2$ (Literatura)	Erro relativo (%)
N-Ac-Tyr-EE	273,0	1355,0	1500,0	9,7
N-Ac-Trp-EE	281,5	5361,8	5690,0	5,7

<sup>1</sup> Para o cálculo do coeficiente de extinção as amostras foram dissolvidas em hidrocloreto de guanidina 6 M, tendo-se obtido um pH de aproximadamente 6,5.

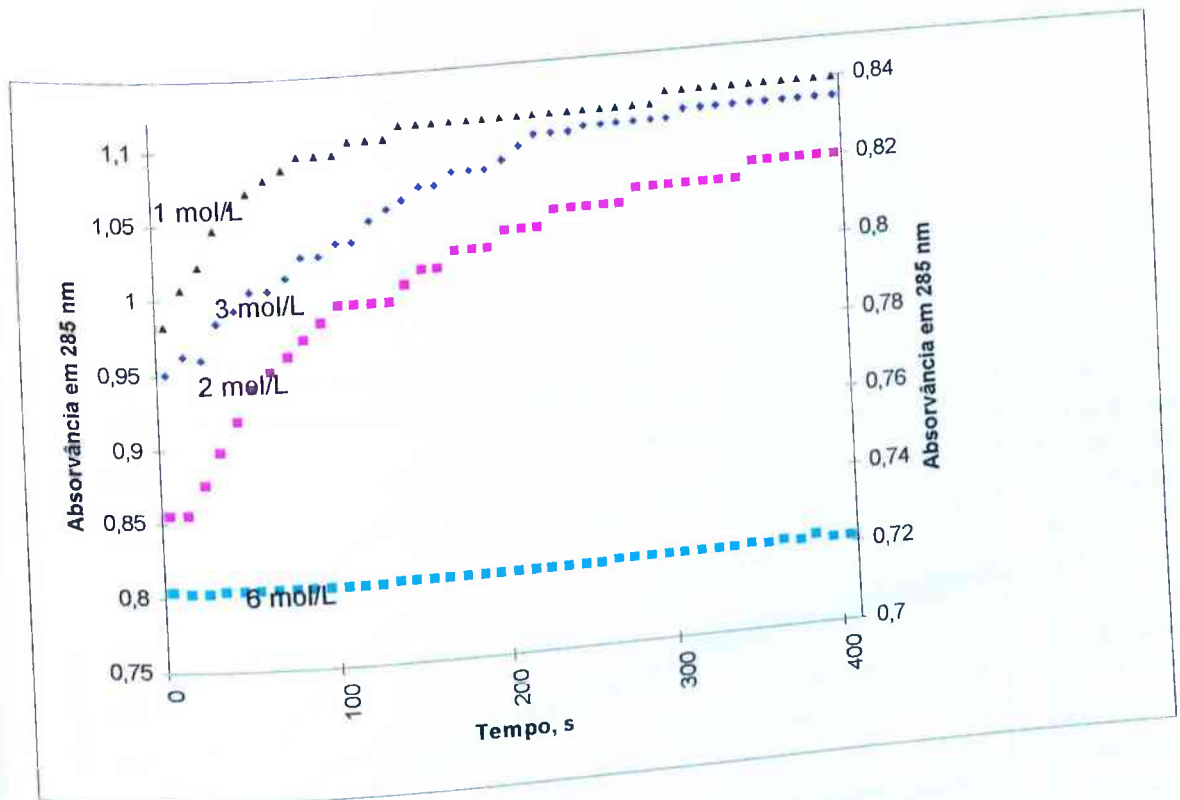
<sup>2</sup> Edelhoch, 1967



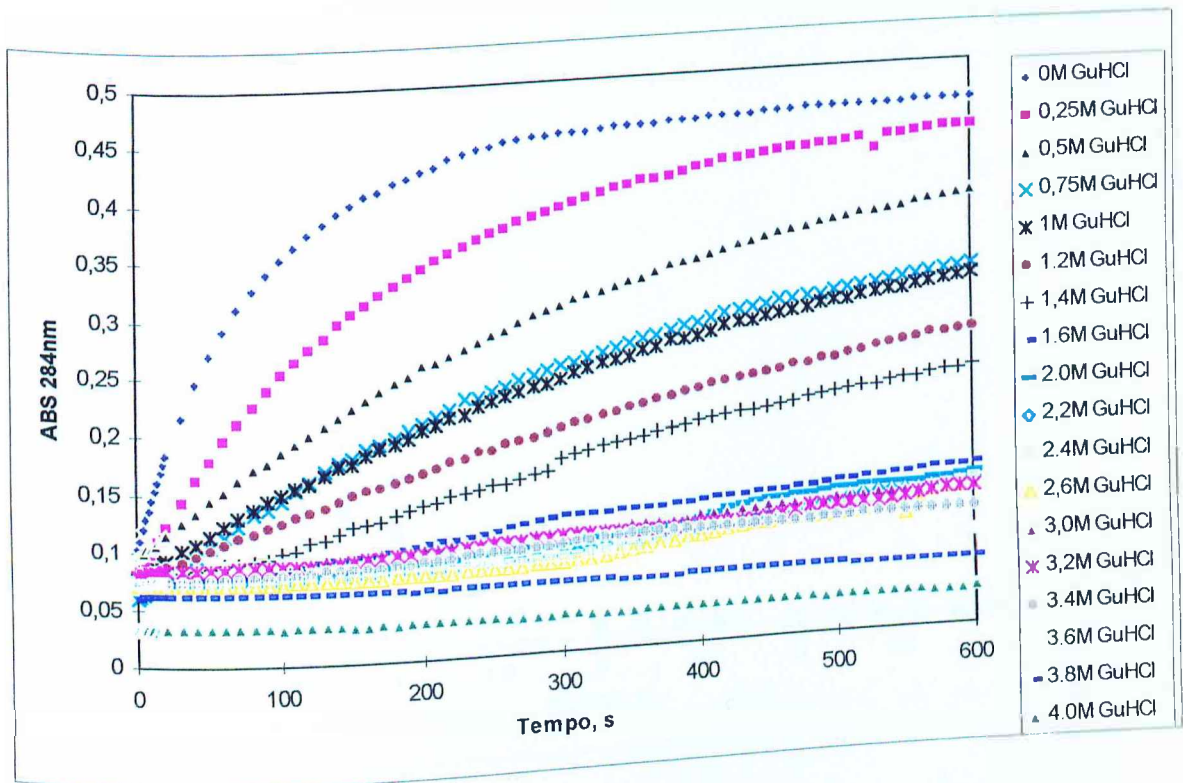
**Figura 13** - Mudança fracional da estabilidade de ribonuclease A bovina em tampão acetato de sódio pH 4,5 (♦) e tampão tris-HCl pH 7,5 (■), incubada a 23 °C, durante 24 horas, em diferentes concentrações de hidrócloro de guanidina.



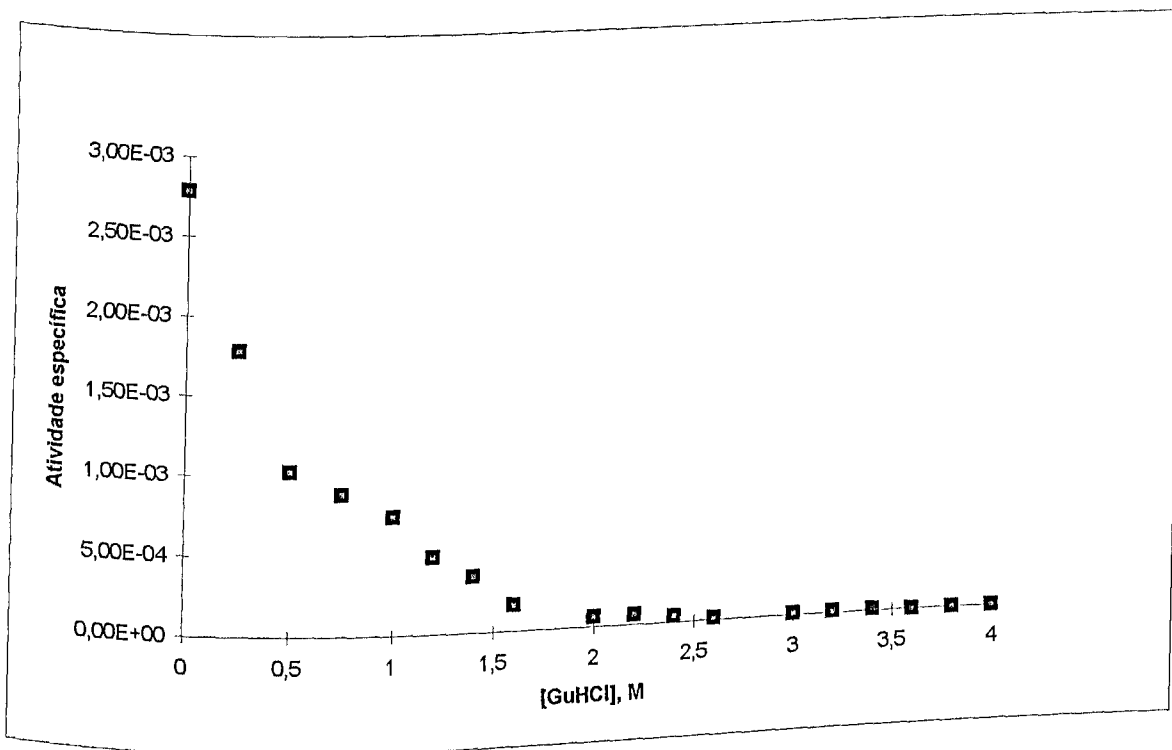
**Figura 14** - Desnaturação e renaturação de ribonuclease A bovina. Para os experimentos de renaturação, a amostra foi incubada à temperatura ambiente durante 24 horas em hidrocloreto de guanidina 8 M. Após a incubação, a amostra foi submetida a diluições e a leitura de absorvância foi efetuada, corrigindo-se o volume da amostra para o volume inicial da solução (♦). A desnaturação foi realizada pela titulação contínua com GuHCl (■).



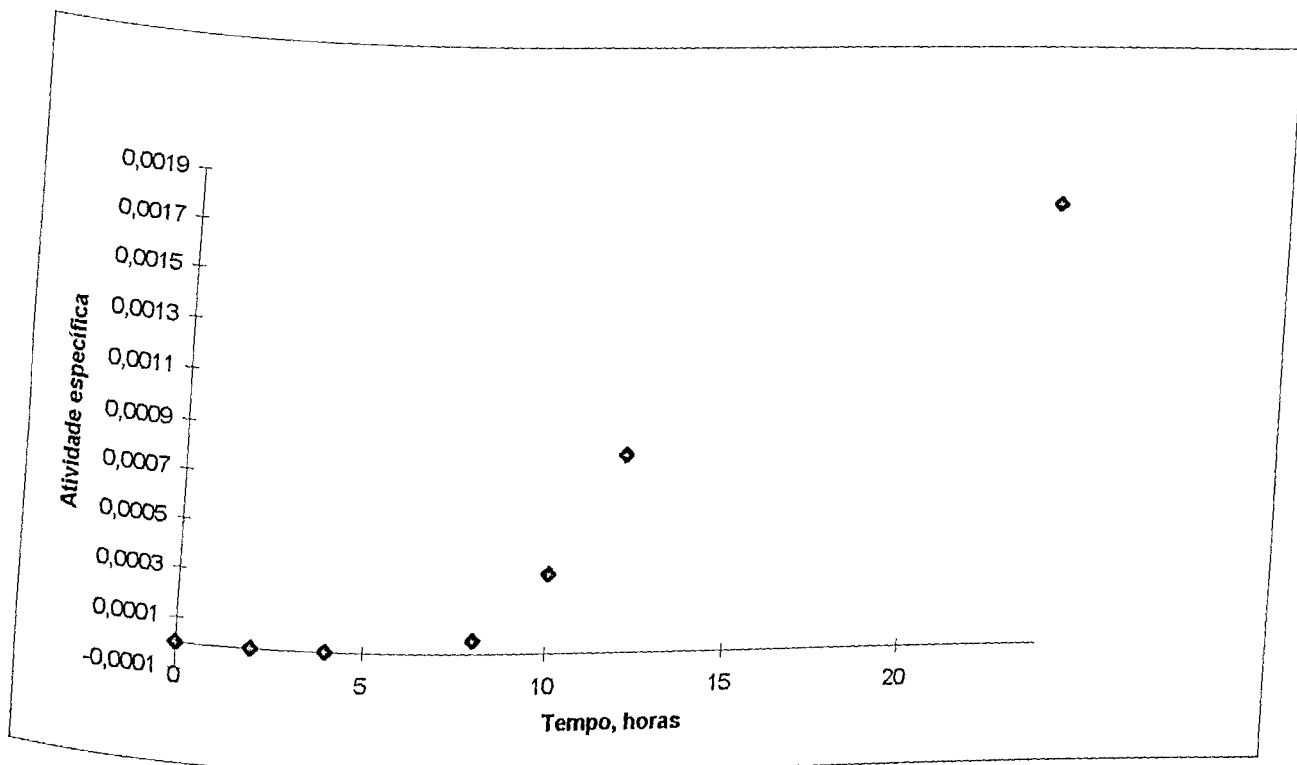
**Figura 15** - Cinética de reenovelamento de ribonuclease A bovina. A amostra foi incubada durante 24 horas a 23 °C em hidrocloreto de guanidina 8 M, e então diluída para concentrações finais de 6, 3, 2 e 1 M de GuHCl. A ordenada da esquerda refere-se às curvas a 6 e 1 M de GuHCl, enquanto a ordenada da direita refere-se às curvas a 3 e 2 M. Os pontos experimentais foram ajustados a polinomiais do terceiro grau para obtenção dos valores de  $t_{1/2}$ , que representam o intervalo de tempo necessário para o reenovelamento de 50% das moléculas de proteína. Os valores obtidos foram de 40, 70 e 85 segundos para as curvas a 1, 2 e 3 M, respectivamente. A ordenada a esquerda corresponde as curvas a 6 e 3 M em GuHCl e a ordenada a direita corresponde as curvas a 2 e 1 M em GuHCl.



**Figura 16** - Curvas de hidrólise de citidina 2':3'-fosfato pela ribonuclease A bovina em tampão tris-HCl pH 7,3 na ausência e presença de diferentes concentrações de hidrocloreto de guanidina. Em todas as séries a concentração de substrato foi 0,1M e a concentração de enzima foi 0,16 M.

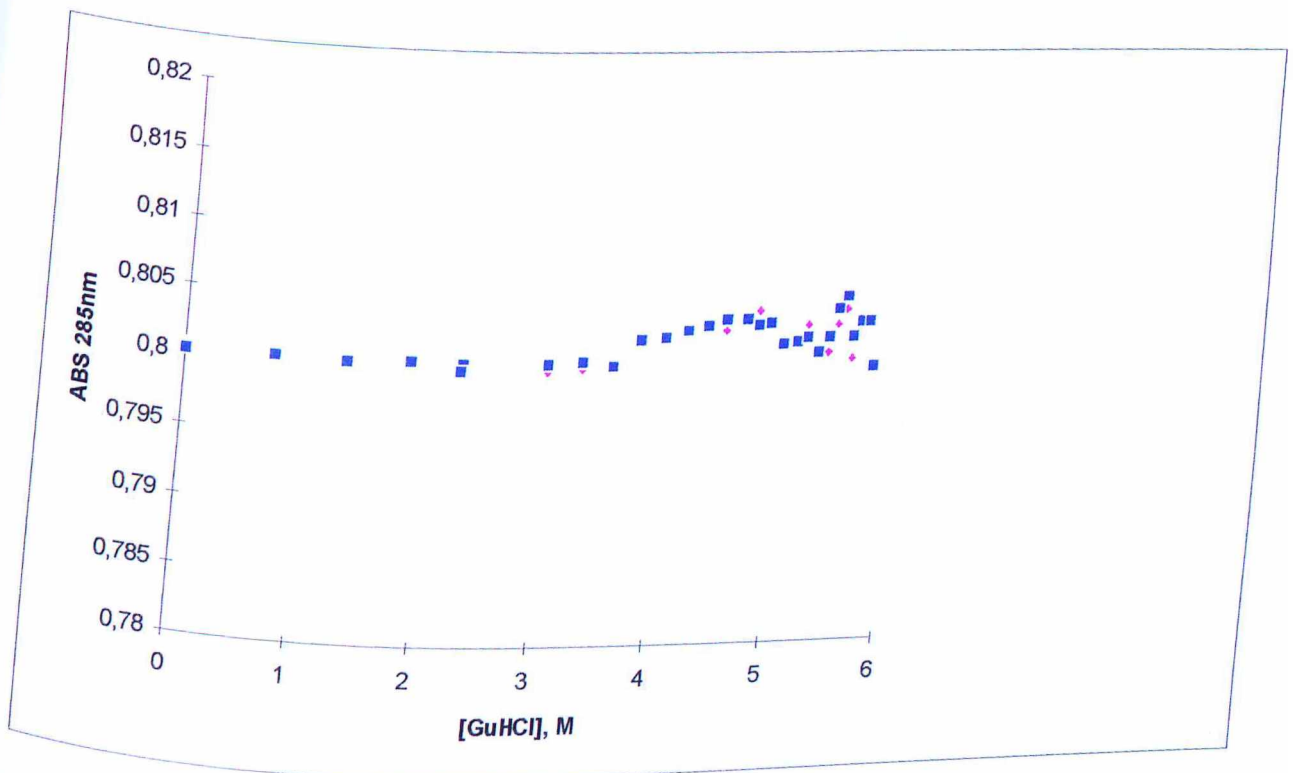


**Figura 17** - Perda da atividade de ribonuclease A em concentrações crescentes de hidrocloreto de guanidina. A atividade é dada em moles de substrato convertido em produto por segundo por mol de enzima.



**Figura 18** - Recuperação da atividade de RNAse A bovina após diálise contra NaCl 0,1 M. Alíquotas foram removidas e ensaiadas para a medida da atividade após 0, 2, 4, 8, 10, 12 e 24 horas. A atividade é dada em moles de substrato convertido em produto por segundo por mol de enzima.

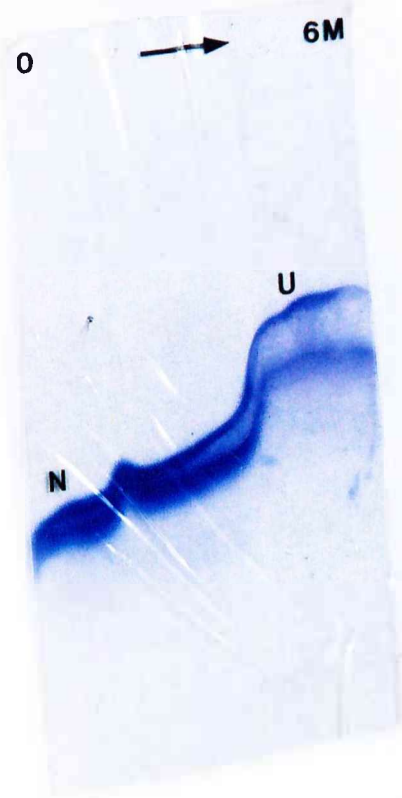




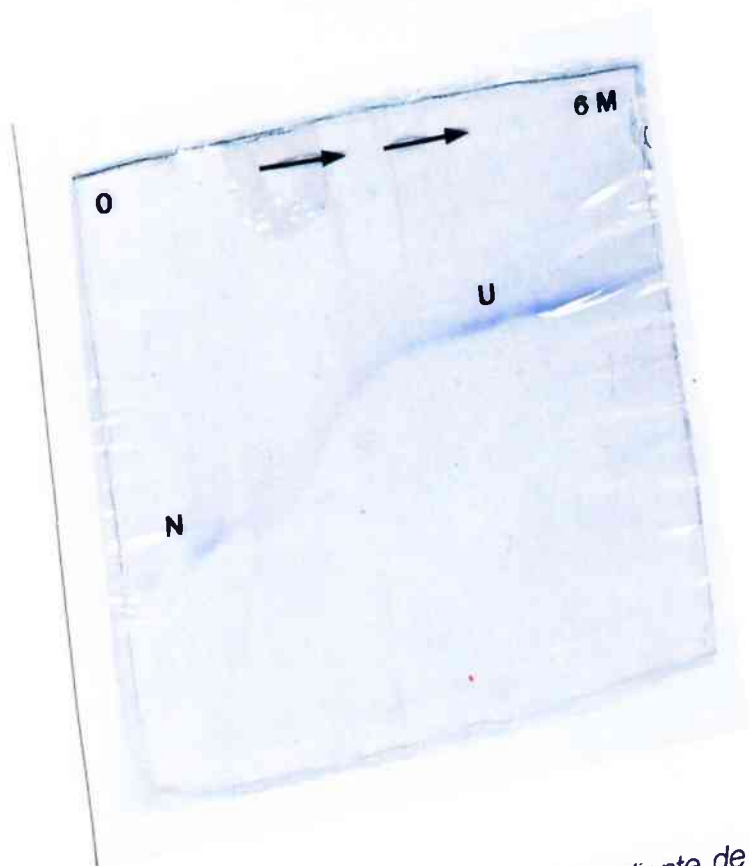
**Figura 19-** Efeito de concentrações crescentes de hidrocloreto de guanidina sobre a absorvância em 280 nm de ribonuclease reduzida e carboxiamidometilada. Dados de duas séries de experimentos (■ e ◆).

**Tabela IV** - Determinação de  $\Delta G_D^{H_2O}$ ,  $m$  e  $D_{1/2}$  a partir da análise das curvas de desnaturação.

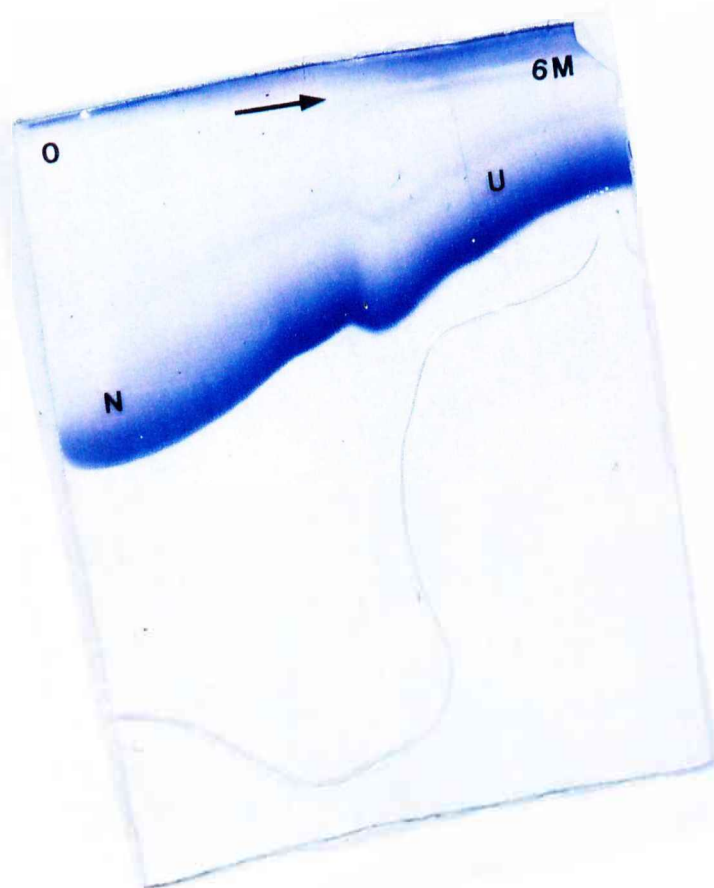
Proteína	$\Delta G_D^{(H_2O)}$ (kcal/mol)	$-m$ (kcal/mol/M)	$D_{1/2}$ (M)
Ribonuclease A Bovina	6,47	2104,6	3,1
Tripsina Bovina	6,88	2285,6	3,01
Miotoxina I <i>Bothrops moojeni</i>	7,50	1873,6	4,00
Miotoxina II <i>Bothrops moojeni</i>	8,016	1930,0	4,15
Piratoxina I de <i>Bothrops pirajai</i>	4,42	1056,46	4,18
Bothropstoxina I de <i>Bothrops jaracussu</i>	6,15	1464,37	4,19



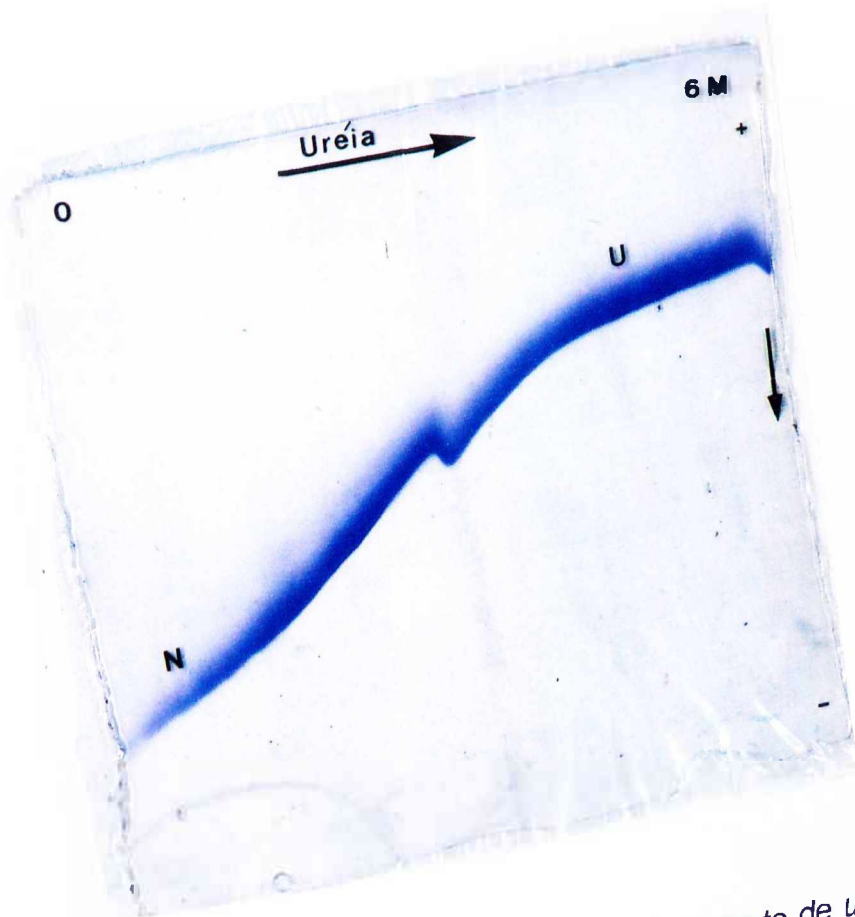
**Figura 20** - Eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente de uréia para RNase A bovina nativa. O tampão utilizado foi Tris-Acetato pH 4,0. Um gradiente linear de 0 a 6 M de uréia foi imposto contra um gradiente linear inverso de 15 a 10% de acrilamida. A eletroforese foi conduzida em direção ao cátodo entre 27 e 30 °C.



**Figura 21** - Eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente de uréia para piratoxina I nativa de Bothrops pirajai. O tampão utilizado foi Tris-Acetato pH 4,0. Um gradiente linear de 0 a 6 M de uréia foi imposto contra um gradiente linear inverso de 15 a 10% de acrilamida. A eletroforese foi conduzida em direção ao cátodo entre 27 e 30 °C.



**Figura 22** - Eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente de uréia para miotoxina I nativa de Bothrops moojeni. O tampão utilizado foi Tris-Acetato pH 4,0. Um gradiente linear de 0 a 6 M de uréia foi imposto contra um gradiente linear inverso de 15 a 10% de acrilamida. A eletroforese foi conduzida em direção ao cátodo entre 27 e 30 °C.



**Figura 23** - Eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente de uréia para miotoxina II nativa de Bothrops moojeni. O tampão utilizado foi Tris-Acetato pH 4,0. Um gradiente linear de 0 a 6 M de uréia foi imposto contra um gradiente linear inverso de 15 a 10% de acrilamida. A eletroforese foi conduzida em direção ao cátodo entre 27 e 30 °C.

**Tabela V** - Determinação da variação da energia livre de desenvolvimento de proteínas em géis com gradiente de uréia.

Proteína	$M_N$ (cm)	$M_U$ (cm)	$M_i$ (cm)	$\Delta G_r$ (cal/mol)	$\Delta G_u$ (cal/mol)
Ribonuclease A Bovina	5,85	4,25	4,75	- 222,50	+ 222,50
Miotoxina I de <i>Bothrops moojeni</i>	4,20	2,20	3,20	- 411,00	+ 411,00
Miotoxina II de <i>Bothrops moojeni</i>	6,50	2,00	4,80	- 296,30	+ 296,30
Piratoxina I de <i>Bothrops pirajai</i>	5,00	3,00	4,00	- 411,00	+ 411,00

## DISCUSSÃO

Segundo senso comum da literatura, uma proteína em 6 M de GuHCl é considerada existir num estado denominado **random coil** (Tanford, 1968). Entretanto esta idéia têm sido alvo de muitos questionamentos nos últimos anos, com evidências para a existência de estruturas residuais de proteínas em 6 M de GuHCl ou de uréia (Shortle & Meeker, 1989; Pace, Laurents & Thomson, 1990; Dill & Shortle, 1991; Mårtensson et al., 1992; Aronsson et al., 1995; Gorovits, Seale & Horowitz, 1995). A idéia inicial deste trabalho foi rever o tema do desenovelamento de proteínas, estudando o efeito de solventes desnaturantes sobre RNase A bovina, a proteína que permitiu a Anfinsen & colaboradores a colher as primeiras informações sobre o enovelamento proteico (Sela, White Jr & Anfisen, 1958). A tripsina bovina foi escolhida como um segundo referencial útil, para tirar proveito de alguma experiência com aquela enzima (Rogana, Penha-Silva & Mares-Guia, 1989). Os compostos N-Ac-Tyr-EE e N-Ac-Trp-EE são substratos para a atividade esterásica de quimotripsina, que apresentam os aminoácidos cromofóricos Tyr e Trp envolvidos por ligações químicas bastante parecidas com as ligações das estruturas proteicas. Os seus motivos estruturais simples não lhes permite, entretanto, assumir as complexas conformações das proteínas. Por estas razões eles foram aqui utilizados como referências válidas para o que seria esperado ser o comportamento espectral de um **random coil** frente aos solventes desenovelantes.



No intuito de selecionar comprimentos de onda onde o solvente fosse mais expressivo, foram feitos vários espectros de RNase A e tripsina bovinas na presença e ausência de várias concentrações de GuHCl (**figuras 1 e 3**). Em ambos os casos nota-se um efeito hipocrômico do desnaturante sobre  $\epsilon_{\text{máx}}$  das proteínas, devido a um deslocamento batocrômico que é atribuído a mudanças do ambiente dos cromóforos proteícos do interior para o exterior da molécula, em contato com o hidrocloreto de guanidina (**Herskovits, 1967**). De fato, as cadeias laterais fenólica e indólica da tirosina e triptofano, respectivamente, são bem solúveis em GuHCl (**Tanford, 1972**). A partir dos espectros (**figuras 1 e 3**), foram selecionados os comprimentos de onda de 273 e 285 nm para RNase A e tripsina bovinas, respectivamente, por caracterizarem as regiões espectrais mais sensíveis a perturbações pelo solvente. A maioria dos trabalhos da literatura sobre o assunto, usam estes comprimentos de onda para obter a diferença da absorvância da proteína na ausência e presença do desenovelante (**Santoro e Bolen, 1988**). Diferentemente, neste trabalho, nós preferimos estudar o efeito de concentrações crescentes de GuHCl sobre a absorvância da proteína, em experimentos que são aqui referidos como titulação da proteína pelo solvente. As **figuras 2 e 4** mostram o perfil da titulação de RNase A e tripsina bovinas, respectivamente. As características sigmoidais de ambas as curvas refletem a natureza cooperativa do desenovelamento daquelas proteínas pelo solvente. Várias séries experimentais coincidentes são encontradas naquelas figuras, atestando a reprodutibilidade dos resultados. Tal padrão de decaimento sigmoidal da absorvância é de fato um efeito do GuHCl e não um artefato de

instabilidade de leitura do espectrofotômetro utilizado. Cada uma daquelas titulações demanda um tempo de cerca de 30 minutos. A **figura 5** mostra que durante aqueles 30 minutos necessários para a titulação, o aparelho mantém um padrão de estabilidade adequado para a execução dos experimentos. Em concentrações menores que 3 M de GuHCl, ocorre a transição do estado nativo para o estado totalmente desenovelado, com um ponto médio em 2,5 M de GuHCl. Devido a existência de domínios na tripsina bovina, pontos de inflexão poderiam ser observados no perfil da curva de transição utilizando RMN (Creighton, 1979). Como a transição de desnaturação não foi uma transição brusca, isto deve indicar a existência de domínios ou outros estados intermediários. A não existência de pontos intermediários de inflexão na curva de transição poderia ser justificada simplesmente pelo desenovelamento simultâneo dos domínios da proteína (Matthews, 1993).

O laboratório de Bioquímica da UFU vem trabalhando, em cooperação com a USP de Ribeirão Preto, na purificação e caracterização de proteínas de veneno de serpentes, como aquelas estudadas neste trabalho. As miotoxinas I e II de *Bothrops moojeni*, a bothropstoxina de *Bothrops jararacussu* e a piratoxina de *Bothrops pirajai* foram também submetidas a titulações espectrofotométricas com GuHCl (**figuras 6 e 7**). O mesmo padrão de decaimento sigmoidal da absorvância observado nas **figuras 2 e 4** foi aqui também verificado. Os coeficientes de extinção molar calculados para aquelas proteínas estão mostrados na **tabela I**. O nível de concordância dos valores de  $\epsilon_{1\%}$  e  $\epsilon_M$  das proteínas controles com valores reportados na literatura

atesta a credibilidade dos parâmetros aqui determinados para as proteínas do veneno de serpentes.

De fato, o efeito hipocrômico do GuHCl sobre uma proteína diz respeito a uma mudança conformacional e não a um mero comportamento espectral dos seus cromóforos, pois os cromóforos isolados têm um efeito hiperacrômico com o aumento da concentração do desenovelante (**figuras 8 e 10**), enquanto as proteínas têm um efeito hipocrômico (**figuras 2, 4, 6 e 7**). Tal efeito hiperacrômico dos cromóforos pode ser atestado também nas suas titulações espectrofotométricas (**figuras 9 e 11**). A inclinação positiva das retas daquelas figuras é de fato real e não artefato de instabilidade do espectrofotômetro, pois durante os cerca de 30 minutos necessários para conduzir as titulações espectrofotométricas as absorvâncias de ambos os cromóforos modelos permaneceram bastante estáveis (**figura 12**). Inclinações positivas também aparecem nas regiões de pré e pós-transição das curvas de desenovelamento das proteínas aqui estudadas (**figuras 2, 4, 6 e 7**). Sem dúvida, tal inclinação é uma característica espectral dos cromóforos em soluções com concentrações crescentes de GuHCl.

As dependências das absorvâncias de N-Ac-Tyr-EE e N-Ac-Trp-EE com a concentração do GuHCl é bastante importante, pois permite o cálculo do  $\epsilon_M$  dos cromóforos em GuHCl sob qualquer concentração do desenovelante. Isto permite a estimativa de  $\epsilon_{M\lambda}$  de proteínas de composição conhecida, segundo descrições de **Gill e Von Hippel (1989)**, sob uma ampla faixa de concentração de GuHCl. Em 6 M de GuHCl os valores aqui determinados de  $\epsilon_{M\lambda}$  são bem

concordantes com os valores de **Edelhoch (1967)** para cromóforos de tirosina e triptofano.

As curvas mostradas nas **figuras 2, 4, 6 e 7**, de fato podem ser consideradas curvas de equilíbrio de desenovelamento, uma vez que a pré-incubação por 24 horas de RNase A bovina produziu um padrão de mudança fracional de desnaturação bem próximo da curva de desnaturação (**figura 13**). Uma curva de equilíbrio de desnaturação é bastante importante por fornecer informações sobre cooperatividade, estabilidade e natureza das forças necessárias para manter a estrutura terciária da proteína (**Rowe et al., 1973**).

A reversibilidade da transição de desenovelamento de RNase A foi verificada por diluição de uma solução protéica a 8 M de GuHCl até cerca de 2 M do desenovelante (**figura 14**). O  $D_{1/2}$ , concentração do desenovelante necessária para promover a conversão de 50% das moléculas do estado nativo para o estado desenovelado, está em torno de 3,0 M de GuHCl tanto nos experimentos de desenovelamento (**figura 4**) quanto no reenovelamento de RNase A (**figura 14**).

A reversibilidade do desenovelamento da RNase A também foi acompanhada cineticamente (**figura 15**). Como seria de se esperar, a transferência súbita, por diluição, da enzima de um meio a 8 M de GuHCl para outro a 6 M não perturba significativamente os valores de  $\epsilon_{\text{máx}}$  da proteína (**figura 15**). Mas quando a transferência se dá para meios a 3, 2 e 1 M do desnaturante, ocorrem os acréscimos de  $\epsilon_{\text{máx}}$  previsíveis pela análise da curva de desnaturação (**figura 4**). Os valores de  $t_{1/2}$  inferidos a partir da **figura 15** são de 40, 70 e 85 segundos para as diluições da proteína de 8 para 1, 2 e 3

M de GuHCl, respectivamente. Isto indica que a concentração de GuHCl também interfere na cinética de reenovelamento. Sem dúvida, tal interferência deve-se manifestar também na ação catalítica da enzima. De fato, os dados da **figura 16** mostram como um aumento da concentração de GuHCl afetam a cinética de hidrólise de citidina-2':3'-fosfato por RNase A. Entretanto, a perda de atividade da enzima (**figura 17**) não é completamente recuperada pela transferência da enzima para ambientes com baixas concentrações do desenovelante quando a enzima a 8 M de GuHCl é dialisada contra KCl 0,1 M durante 24 horas (**figura 18**). Há uma perda de cerca de 40% em sua atividade específica, o que poderia ser explicado de duas formas. Haveria agregação da proteína devido à ausência de chaperoninas para controlar as condições do reenovelamento (**Mizobata, 1992; Mizobata, 1995**). Entretanto, como tal perda de atividade não é associada a uma igual redução do reenovelamento (**figura 14**), ela deve exigir outra explicação. A atividade da RNase A é muito influenciada por baixas concentrações de GuHCl (**figura 17**), com um valor de  $D_{1/2}$  em torno de 0,5 M do desenovelante. A conformação do centro ativo, mantida por forças relativamente fracas, seria mais perturbada que a proteína como um todo. Por outro lado, a ligação de uma molécula de GuHCl no centro ativo poderia prevenir a ligação do substrato natural da enzima.

A redução das ligações dissulfeto e o bloqueio das sulfidrilas por carboxiamidometilação produz uma RNase A (RCAM-RNase A) que não sofre transição de desnaturação com o aumento da concentração de GuHCl (**figura 19**). O padrão de dependência da absorvância com a concentração do

desnaturante é dado por uma linha de inclinação ligeiramente positiva, assim como para os cromóforos N-Ac-Tyr-EE e N-Ac-Trp-EE. Isto indica que a RCAM-RNase A não apresenta algum tipo de organização estrutural que possa ser detectado pelo método.

As **figuras 2, 4, 6 e 7** mostram transições de desenovelamento bem definidas para as proteínas estudadas. Os segmentos lineares das regiões de pré- e pós-transição foram projetados na ordenada e divididos pela concentração molar de cada proteína para obtenção das absorvâncias molares dos estados nativo ( $A_N$ ) e desenovelado ( $A_U$ ). Os resultados aparecem na **tabela II** junto com a mudança molar na absorvância no ponto médio da transição ( $\Delta A$ ), dada pela diferença entre  $A_N$  e  $A_U$ . A piratoxina I de *Bothrops pirajai* e miotoxina I de *Bothrops moojeni* sofreram uma transição de desnaturação em uma faixa de concentração mais baixa em relação a bothropstoxina I de *Bothrops jararacussu* e miotoxina II de *Bothrops moojeni*, pode-se sugerir que a bothropstoxina I de *Bothrops jararacussu* e miotoxina II de *Bothrops moojeni* apresentam uma estrutura conformacional mais estável talvez devido a existência de uma maior quantidade de forças responsáveis pela estabilização da estrutura terciária das proteínas.

O método de extrapolação linear é significativo para avaliar a estabilidade dos estados enovelado e desenovelado das proteínas no limite de 0 M de GuHCl pela determinação de  $\Delta G_D^{H_2O}$  (**tabela IV**). A reversibilidade da transição **unfolding-refolding** e a ocorrência de uma transição em dois estados são condições essenciais para a aplicação do método de extrapolação linear (**Santoro & Bolen, 1988**). A existência de uma transição em dois estados

simplifica a análise termodinâmica das proteínas. A validade para a existência de uma transição em dois estados é confirmada pelo gel com gradiente com uréia (Creighton, 1990), resultados apresentados na **tabela V**. Os géis-gradientes para RNase A e piratoxina I de *Bothrops pirajai* indicam a existência de estados nativo e desenovelado, e ausência de estados intermediários. As bandas das proteínas foram contínuas e mostrou um declive brusco na região de transição, indicando um equilíbrio rápido entre os estados nativo e desenovelado.

O gel com gradiente de uréia foi utilizado como uma técnica complementar para estudo das transições de desenovelamento das proteínas consideradas, de acordo com as descrições de Creighton (1979). As alterações de mobilidade que acompanham o desenovelamento podem ser primariamente devidas a mudanças na forma e volume molecular da cadeia polipeptídica, mas também a alterações na carga líquida da proteína, devidas por exemplo a exposição de grupos iônicos ao solvente. A alteração da viscosidade da proteína quando da transição do estado nativo para o estado desenovelado também afeta sua mobilidade no gel de poliacrilamida.

A sensibilidade da técnica para a análise das curvas de transição por espectrofotometria no ultravioleta é baixa, pois é necessário uma grande quantidade de proteína para a realização do experimento. Entretanto, uma curva de desnaturação similar pode ser obtida em um experimento muito mais sensível utilizando técnicas eletroforéticas. Ambas as bandas para as formas nativa e desenovelada no gel com gradiente do desenovelante são praticamente horizontais.

A vantagem da eletroforese em gel de poliacrilamida é a sua alta resolução e compatibilidade com as contínuas variações nas concentrações do desnaturante, além de ser necessário uma pequena quantidade da proteína para acompanhar a transição de desenovelamento. A validade do método é aparente devido à consistência dos resultados obtidos com RNase A, miotoxinas I e II de *Bothrops moojeni*, e piratoxina I de *Bothrops pirajai*, com aqueles obtidos utilizando-se técnicas espectrofotométricas. Uma desvantagem aparente do método é que nenhuma informação é dada quanto ao tipo de conformação que pode estar presente, isto é, os dados obtidos não são de natureza quantitativa e a técnica só permite o uso de desnaturantes não polarizados ou sem carga.

A transição em dois estados mostrada pelos géis nos fornecem pouco a respeito das vias pelas quais as proteínas enovelam e desenovelam, mas possibilita a determinação quantitativa da variação da energia livre para os estados nativo e desenovelado das proteínas.



## CONCLUSÕES

- 1 - Os espectros dos cromóforos foram perturbados pelo aumento da concentração de hidrocloreto de guanidina no solvente.
- 2 - A extinção do N-Ac-Tyr-EE em 274 nm descreveu uma dependência linear com a concentração de hidrocloreto de guanidina, dada pela equação  $\epsilon_{274 \text{ nm}} = 1355 + 24,3 [\text{GuHCl}]$ .
- 3 - A extinção do N-Ac-Trp-EE em 281,5 nm descreveu uma dependência linear com a concentração de hidrocloreto de guanidina, dada pela equação  $\epsilon_{281,5 \text{ nm}} = 5362 + 68,2 [\text{GuHCl}]$ .
- 4 - A extinção de RCAM-RNAse em 285 nm também exibiu uma dependência linear com o aumento da concentração de hidrocloreto de guanidina, indicando a inexistência de organização estrutural mesmo sob baixas concentrações do desenovelante.
- 5 - Não há evidências espectrofotométricas de transições conformacionais de RNAse A bem como de outras proteínas estudadas além de 6 M de GuHCl.
- 6 - A inclinação positiva das regiões de pré e pós-transição nas curvas de desenovelamento da RNAse A e de outras proteínas estudadas por aumento da concentração de GuHCl é meramente devida a um comportamento espectral de seus cromóforos.
- 7 - Todas as proteínas estudadas exibiram curvas cooperativas de desenovelamento tanto por espectrofotometria quanto por eletroforese.

8 - O desenovelamento de RNase A bovina por hidrocloreto de guanidina exibiu um mecanismo de transição reversível de dois estados e foi termodinamicamente caracterizado por um valor de  $\Delta G_D^{H_2O}$  de 6,47 kcal/mol e um  $D_{1/2}$  de 3,1 M de GuHCl.

9 - O desenovelamento de tripsina bovina por hidrocloreto de guanidina exibiu um mecanismo de transição de dois estados, embora a proteína tenha dois domínios, e foi termodinamicamente caracterizado por um valor de  $\Delta G_D^{H_2O}$  de 6,88 kcal/mol e um  $D_{1/2}$  de 3,01 M de GuHCl.

10 - Os desenovelamentos das miotoxinas I e II de *Bothrops moojeni*, da piratoxina I de *Bothrops pirajai*, e da bothropstoxina I de *Bothrops jararacussu*, por hidrocloreto de guanidina, exibiram mecanismos de transição de dois estados, e foram termodinamicamente caracterizados por valores de  $\Delta G_D^{H_2O}$  de 7,50; 8,02; 4,42 e 6,15 kcal/mol e valores de  $D_{1/2}$  de 4,00; 4,15; 4,18 e 4,19 M de GuHCl.

11 - A monitoração do desenovelamento de RNase A bovina por hidrocloreto de guanidina pela atividade específica da enzima exibiu um  $D_{1/2}$  de cerca de 0,5 M de GuHCl.

12 - O reenovelamento de RNase A bovina por diálise da solução inicial a 6 M de GuHCl contra NaCl 0,1 M, durante 24 horas, levou a cerca de 40% de perda na atividade específica da enzima.

13 - A monitoração dos desenovelamentos de RNase A bovina e piratoxina I de *Bothrops pirajai* por eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente de 0 a 6 M de uréia revelou transições de dois estados, com valores de  $\Delta G_{NU}$  de 0,22 e 0,41 kcal/mol, respectivamente.

## SUMÁRIO

Este trabalho estuda o efeito de solventes desenovelantes sobre o espectro ultravioleta e a mobilidade eletroforética de proteínas ou modelos cromóforos de proteínas. Curvas espectrofotométricas de desenovelamento por 0 a 6 M de hidrocloreto de guanidina foram obtidas para ribonuclease A e tripsina bovinas, miotoxinas I e II de *Bothrops moojeni*, bothropstoxina I de *Bothrops jararacussu* e piratoxina I de *Bothrops pirajai*. As transições de desenovelamento mostraram ser cooperativas e seguiram um mecanismo de dois estados. O método da extrapolação linear foi aplicado para determinação de  $\Delta G_D^{H_2O}$ , a variação de energia livre a 0 M de hidrocloreto de guanidina, e de  $D_{1/2}$ , a concentração do desnaturante capaz de converter 50% das proteínas do estado nativo para o estado desenovelado. Os valores de  $\Delta G_D^{H_2O}$  foram de 6,47; 6,88; 7,50; 8,02; 4,42 e 6,15 kcal/mol para a RNase A e tripsina bovinas, miotoxinas I e II de *Bothrops moojeni*, piratoxina I de *Bothrops pirajai* e bothropstoxina I de *Bothrops jararacussu*, respectivamente. Os valores de  $D_{1/2}$  foram de 3,1; 3,01; 4,00; 4,15; 4,18 e 4,19 M de hidrocloreto de guanidina para a RNase A e tripsina bovinas, miotoxinas I e II de *Bothrops moojeni*, piratoxina I de *Bothrops pirajai* e bothropstoxina I de *Bothrops jararacussu*, respectivamente. A transição de desenovelamento da RNase A satisfaz bem o quesito da reversibilidade quando seguida espectrofotometricamente por medidas da extinção na região de seus cromóforos. Porém, o reenovelamento da proteína apresenta um  $D_{1/2}$  de cerca de apenas 0,5 M de GuHCl e uma perda de cerca de 40% de sua atividade específica quando acompanhado por

medidas de atividade enzimática. Isto deve indicar que a conformação do centro ativo é muito mais sensível à ação do GuHCl do que o restante da proteína. As extinções molares de N-Ac-Tyr-EE e N-Ac-Trp-EE descreveram dependências lineares com a concentração de hidrocloreto de guanidina, dada pelas equações  $\epsilon_{274 \text{ nm}} = 1355 + 24,3 [\text{GuHCl}]$  e  $\epsilon_{281,5 \text{ nm}} = 5362 + 68,2 [\text{GuHCl}]$ , respectivamente. As inclinações positivas desta retas constituem a razão pelas quais as curvas de desenovelamento das proteínas estudadas apresentaram um caráter ascendente nas regiões de pré e pós-transição. Além de 6 M, nenhuma das proteínas exibiu comportamentos espectrais compatíveis com transconformações de suas estruturas, indicando a inexistência de estruturas residuais em 6 M de GuHCl. A extinção de RCAM-RNAse em 285 nm também exibiu uma dependência linear com o aumento da concentração de hidrocloreto de guanidina, indicando a inexistência de organização estrutural mesmo sob baixas concentrações do desenovelante na proteína destituída de suas ligações dissulfeto. A monitoração dos desenovelamentos de RNAse A bovina e piratoxina I de *Bothrops pirajai* por eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente de 0 a 6 M de uréia revelou transições de dois estados, com valores de  $\Delta G_{\text{NU}}$  de 0,22 e 0,41 kcal/mol, respectivamente.

## Effect of denaturant solvents on the ultraviolet spectra and electrophoretic mobility of snake venom proteins and model chromophores

Ana Graci Brito & Nilson Penha-Silva (advisor)

Departamento de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG 38400-902, Brazil

Spectrophotometric titration curves with 0 to 6 M guanidine hydrochloride (GuHCl) were obtained for ribonuclease A, bovine trypsin, miotoxins I and II from *Bothrops moojeeni*, bothropstoxin I from *Bothrops jararacussu* and piratoxin I from *Bothrops pirajai*. All unfolding transitions showed cooperativity and reversibility, and followed two-state mechanisms. Linear extrapolation method was applied to data for determination of the free energy change at 0 M of denaturant ( $\Delta G_{D}^{H_2O}$ ) and the denaturant concentration able to convert 50% of protein from native to unfolded state ( $D_{1/2}$ ). Values of  $\Delta G_{D}^{H_2O}$  were respectively of 6.47; 6.88; 7.50; 8.02; 4.42; and 6.15 kcal/mol for RNase A, bovine trypsin, miotoxins I, miotoxin II, bothropstoxin I, and piratoxin I.  $D_{1/2}$  values were 3.10; 3.01; 4.00; 4.15; 4.18; and 4.19 M of GuHCl for RNase A, bovine trypsin, miotoxin I, miotoxin II, bothropstoxin I, and piratoxin I. Titration of the RNase A activity with 0 to 6 M of GuHCl showed a  $D_{1/2}$  value of just 0,5 M of GuHCl, indicating that the active center is much more sensitive to GuHCl than the rest of the protein. Dialysis of the 6 M GuHCl unfolded RNase A against 0.1 M NaCl by 24 hours permitted just about of 60% of recuperation in the specific activity. Molar absorptivity of N-Ac-Tyr-EE and N-Ac-Tyr-EE exhibited the linear dependencies with GuHCl given respectively by the equations  $A_{247nm} = 1355 + 24.3 [GuHCl]$  and  $A_{281.5nm} = 5362 + 68.2 [GuHCl]$ . The positive slopes in those lines explain why all the protein unfolding curves here studied showed an ascendant character in their pre and post-transitional regions. Dilution of 0 M RCAM-RNase A with 8 M GuHCl gave a linear dependence for the molar extinction at 285 nm with guanidine hydrochloride, indicating the absence of structural organization under even low concentrations of denaturant when the protein lacks their disulfide bonds. 0 to 6 M urea transverse gel electrophoresis with bovine RNase A and piratoxin I from *Bothrops pirajai* showed reversible two-state transitions with  $\Delta G_{NU}$  values of 0.22 and 0.41 kcal/mol, respectively.

(Financial support by CAPES and PROPP-UFU)

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANFINSEN, C. B. (1973) Principles That Govern the Folding of Polypeptide Chains.  
**Science** **181**: 223-230.

ARONSSON, G; MARTENSSON, G.L; CARLSSON, U & JONSSON, B. H. (1995)  
Folding and Stability of the N-Terminus of Human Carbonic Anhydrase II.  
**Biochemistry** **34**: 2153 - 2162.

AZUMA, T; HAMAGUCHI, K; MIGITA, S.(1972) Denaturation of Bence Jones  
Proteins by Guanidine Hydrochloride. **J. Biochem.** **72**:1455-1467.

BARRY. T. N; OSTHERHOUT. J. J; RAMDAS. L. (1988) pH Dependence of  
Folding of Iso -2-cytochrome c. **Biochemistry** **27** 7310-7314.

BOLEN. D. W & SANTORO. M. M. (1988) Unfolding Free Energy Changes  
Determined by the Linear Extrapolation Method: Incorporation de  $\Delta G^{\circ}_{N-U}$   
Values in a Thermodynamic in a Thermodynamic Cycle . **J. Amer. Chem. Soc.**  
**27**: 8069-8074.

BOLEN, D. W & SANTORO, M. M. (1992) A test of the linear extrapolation of unfolding free energy changes over an extended denaturant concentration range. **J. Amer. Chem. Soc.** **31**: 4901-4907

BRANDEN, C & TOOZE, L. (1991) The molten globular intermediate form in the folding pathway of human carbonic anhydrase. **Intr. to Prot. Struc.** **188**: 326-330

BRANDTS, F. J & KAPLAN, J. L. (1973) Derivative spectroscopy applied to tyrosyl chromophores. Studies on ribonuclease, lima bean inhibitors, insulin, and pancreatic trypsin inhibitor. **Biochemistry** **12**: 2011-2023.

BREMS, N. D; BROWN, L. P; HECKENLAIBLE & FRANK, H.F. (1990) Equilibrium Denaturation of Insulin and Proinsulin. **Biochemistry** **29**: 9289-9293.

CHEM, B. L & SCELLMEN, J. A. (1989) Low-Temperature Unfolding of A Mutant of Phage T4 Lysozyme, 1. Equilibrium Studies. **Amer. Chem. Soc.** **28**: 685-691

CHRAMBACH, A & RODBARD, D. (1971) Polyacrylamide gel electrophoresis. **Science** **172**: 440-451.

CREIGHTON, E. T. (1979) Eletrophoretic Analysis of the Unfolding of Proteins by Urea. **J. Mol. Biol.** **129**: 235-264.

CREIGHTON, T. E. (1980) Kinetic Study of Protein Unfolding and Refolding Using Urea Gradient Electrophoresis. **J. Mol. Biol.** **137**: 61-80.

CREIGHTON, T. E. (1990) **Protein Structure: A Pratical Approach**. Primeira edição. Oxford. pp. 68

CROOK, M. E; MATHIAS, A. P; RABIN, R. B. (1960) Spectrophotometric Assay of Bovine Pancreatic Ribonuclease by the Use of Citidine 2':3'- Phosphate. **J. Biochem.** **14**: 234-238.

DENTON. E, M; ROTHWARF. M, D & SHERAGA, H. (1994) Kinectics of Folding of Guanidine-Denatured Hen Egg White Lysozyme and Carboxymethyl (Cys<sup>6</sup>, Cys<sup>127</sup>)-Lysozyme: A Stopped-Flow Absorbance and Fluorescence Study. **Biochemistry** **33**: 11225-11236.

DILL. A & SHORTLE, D. (1991) Denatured States of Proteins. **Annu. Rev. Biochem.** **60**: 795-825

EDELHOCH, H. (1967) Spectroscopic Determination of Tryptophan and Tyrosine in Proteins. **Biochemistry** **6**: 1948-1954.



- FABIAN, H & MANTSCH, H. H. (1995) Ribonuclease A Revisited: Infrared Spectroscopic Evidence For Lack Of Native-Like Secondary Structures In The Thermally Denatured State. **J. Amer. Chem. Soc.** **34**: 13651-13655.
- FREIRE, E & MURPHY, P. K. (1992) Molecular Basis of Co-operativity in Protein Folding. **J. Mol. Biol.** **222**: 687-698.
- FREIRE, E & RUIZ-SANCHEZ, J. M. (1991). Calorimetrically Determined Dynamics Of Complex Unfolding Transitions In proteins. **Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.** **19**: 159-188
- GARELL, J. R. & BALDWIN, R. L. (1973) Both The Fast And Slow Refolding Reactions Of Ribonuclease A Yield Native Enzyme. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.** **70**: 3347-3351.
- GARELL, J. R. & BALDWIN, R. L. (1975) The Heat-Unfolded State Of Ribonuclease A Is Na Equilibrium Mixture Of Fast And Slow Refolding Species. **J. Mol. Biol.** **94**: 611-620.
- GARELL, J. R.; NALL, B.T. & BALDWIN, R. L. (1976) Guanidine-Unfolded State Of Ribonuclease A Contains Both Fast And Slow-Refolding Species. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.** **73**: 1853-1857.

- GORDON, J. A. (1972) Denaturation of Globular Proteins. Interaction of Guanidinium Salts with Three Proteins. **Biochemistry** **11**: 1862-1870
- GOROVITS, M. B; JEFFREY, W. S & HOROWITZ, M. P. (1995) Residual Structure In Urea-Denatured Chaperonin Groel. **J. Amer. Chem. Soc.** **34**: 13928-13933.
- HERKOVITZ, T. T. (1967) Diference Spectroscopy. **Methods Enzymol.** **XI**: 749-770.
- IRIE, M. (1969) Studies on the State of Tryptophan Residue in Ribonuclease T1 and Carboxymetyl Ribonuclease T1. **J. Biochem.** **68**: 31-37
- JENNINGS, P; SAALAU-BETHELL, S. M; FINN, B; CHEN, X & MATTHEWS, R. (1991) Mutational Analysis Of Protein Mechanisms. In: **Methods Enzimol.** **202**: 113-126 (Langone, J.J. ed) Academic Press.
- KAUZMANN, W. (1959) Some Factors In The Interpretation Of Protein Denaturation. **Adv. In Protein. Chem.** **14**: 1-57
- KUWAJIMA, K; MITANI, M & SUGAI, S. (1989). Characterization of the Critical State in Protein Folding: Effects of Guanidine Hydrochloride and Specific  $Ca^{+2}$  Binding on the Folding Kinectis of  $\alpha$ -Lactoalbumin. **J. Mol. Biol.** **206**: 547-561.

LUMRY, R & BILTONEM, R. (1966) Validity of the "Two-State" Hypothesis for Conformational Transitions os Proteins. **Biopolymers** 4:917-944.

MÅRTENSSON, G. L; JONSSON, H. B; ANDERSSON, M; KIHGREN, A; BERGENHEM, N & CARLSSON, U. (1991) Role of an evolutionary invariant serine for the stability of human carbonic anhydrase II. **Biochim. Biophys. Acta.** 1118: 179-186.

MATTHEWS, R. C & CRISANTI, M. M. (1981) Urea- Induced Unfolding of the  $\alpha$  Subunit of Thryptophan Synthase: Evidence for a Multistate Process. **Biochemistry** 20: 784-792.

MATTHEWS, R. C. (1993) -Patways of Protein Folding. **Annu. Revist. Biochem.** 62: 653-683.

McPHIE, P. (1972) pH Dependence of the Thermal Unfolding of Ribonuclease A **Biochemistry** 11: 879-883

MIHALYI, E. (1968) Physicochemical Studies of Bovine Fibrinogen. IV. Ultraviolet Absorption and Its Relation to the Structure of the Molecule. **Biochemistry** 1:208-220

- MIZOBATA, T; AKIYMA, Y; ITO, K; YUMOTO, N; KAWATA, Y. (1992) - Effects of the chaperonin GroE on the refolding of Tryptophanase of *Escherichia coli*: Refolding is enhanced in the presence of ADP. **Jou. Biol. Chem.** **267**: 1773-17779.
- MIZOBATA, T & KAWATA, Y. (1995) The folding characteristics of Tryptophanase from *Escherichia coli*. **Jou. Biochem.** **117**: 384-391.
- MONTELIONE, G.T & SCHERAGA, H. A. (1989) Formation of local structures in protein folding. **Acc. Chem. Res.** **22**: 70-76.
- NALL, B. T & BALDWIN, R. L. (1977) Thermal Unfolding Transition of Ribonuclease A Measured by  $2'$ : CMP Binding. **Biochemistry** **16**: 3572-3576
- OAS, T. G & KIM, P. S. (1988). A peptide model of a protein folding intermediate. **Nature** **336**: 42-48.
- ORT, P; ZALUNIN, I; GASPAROV, V. S; CHESTUKHINA, G. G & SPEPHANOV, M. V. (1995) Domain Organization of *Bacillus thurugiensis* CryIIIA  $\delta$ -Endotoxin Studied by Denaturation in Guanidine Hydrochloride Solutions and Limited Proteolysis. **Jou. of Prot. Chem.** **14**:241-248.

PACE, C. N & CREIGHTON, T. E. (1974) The Disulphide Folding Pathway of Ribonuclease T1. **J. Mol. Biol.** **188**: 477-486

PACE, N. C; SHIRLEY, A .B & THOMSON, A . J. (1974) Measuring the Conformational Stability of a Protein. **Biochemistry** **13**: 311-327.

PACE, C. N. (1986) Determination and Analysis of Urea and Guanidine Hydrochloride Denaturation Curves. **Methods. Enzimol.** **131**: 266-279.

PACE, N; LAURENTS, V. D & THOMSON. J. A. (1989) pH Dependence of the Urea and Guanidine Hydrochloride Denaturation of Ribonuclease A and Ribonuclease T1. **Biochemistry** **29**: 2564-2572.

PACE, N. C; HEINEMANN. U; HAHAN. U; SAENGER. W. (1991) Ribonuclease T1: Structure, Function, and Stability. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.** **30**: 343-360.

PFEIL, W & PRIVALOV, P. L. (1976) Thermodynamic Investigations of Proteins. **Biophys. Chem.** **4**: 23-32

PRIVALOV, P. L. (1988) Stability of Protein Structure and Hydrophobic Interaction. **Prot. Chem.** **39**: 191-232

- PRIVALOV, P. L ; TIKTOPULO, E. I; VENYAMINOV, S. YU; GRIKO, V. YU;  
MAKHATADZE, G. I & KHECHINASHVILI, N. N. (1974) Heat Capacity and  
Conformational of Proteins in The Denaturated State. **J. Mol. Biol.** **205**: 737-  
750
- ROGANA, E; PENHA-SILVA, N. & MARES-GUIA, M. (1989) The Substituent  
Effect on Complex Formation Between  $\alpha$ -Trypsin and Para-Substituted  
Benzamidinium Ions: A Thermodynamic Study. **Braz. J. Med. Biol. Res.** **22**:  
1177-1190.
- ROTHWARF, D. M. & SCHERAGA, H. (1993a) Regeneration of bovine pancreatic  
ribonuclease A .1 Steady - State distribution. **Biochemistry** **32**: 2671-2679.
- ROTHWARF, D. M. & SCHERAGA, H. (1993b) Regeneration of bovine pancreatic  
ribonuclease A .1 Steady - State distribution. **Biochemistry** **32**: 2680-2689.
- ROWE, S. E & TANFORD, C. (1973) Equilibrium and Kinetics of the  
Denaturation of a Homogeneous Human Immunoglobulin Light Chain  
**Biochemistry** **24**: 4822-4827.
- SANTORO, M. M. & BOLEN, D. W. (1988) Unfolding Free Energy Changes  
Determined By The Linear Extrapolation Method. 1. Unfolding Of  
Phenylmethanesulfonyl  $\alpha$ - Chymotrypsin Using Different Denaturants. **J.**  
**Amer. Chem. Soc.** **27**: 8063-8068.

SANTORO, M. M. & BOLEN, D. W. (1992) A Test of the Linear Extrapolation of Unfolding Free Energy Denaturant Concentration Range. **Biochemistry** 31: 4901-4907.

SCHELLMAN, J. A. (1987) Selective Binding and Solvent Denaturation. **Biopolymers** 26: 549-559

SELA, M; WHITE, F. H; ANFISSEN, C. B. (1959) The Reductive of Disulfide Bonds and its Application to Problems of Protein Structure. **Biochim. et Biophys. Acta.** 31: 417-426.

SHELLMAN, J. A. (1978) Solvent Denaturation. **Biopolymers** 17: 1305-1322

SHORTLE, D & MEEKER, A. L. (1986) Mutants Forms of Staphylococcal Nuclease With Altered Patterns of Guanidine Hydrochloride and Urea Denaturation. **Prot.: Struc. func. and Gen.** 1:81-89

SHORTLE, D & MEEKER, A. L. (1989) Residual Structure in Large Fragments of Staphylacoccal Nuclease: Effects of Amino Acid Substitutions. **Biochemistry** 28: 936-944.

SHORTLE, D & MEEKER, A. L; FREIRE, E. (1988) Stability Mutants of Staphylococcal Nuclease: Large Compensating Enthalpy - Entropy Changes for the Reversible Denaturation Reaction. **Amer. Chem. Soc.** **27**: 4761-4768.

SHIRLEY, A. B; STANSSENS, P; PACE, N. C. (1989) Conformational Stability and Activity of Ribonuclease T1 and Mutants. **The Jou. of Biol. Chem.** **264**: 11621-11625

SHORTLE, D; WANG, W; GILLESPIE, J. R & WRABL, J. A. (1996) Protein Folding for Realists: A Timeless Phenomenon. **The Prot. Soc.** **5**: 991-1000

SRINIVASALU, S & RAO, A. G. A. (1996) The Detection of Kinectic Intermediates During the Unfolding of Lipxygenase-1 by Urea or Guanidine Hydrochloride. **Biochim. Biophys. Acta.** **1294**: 115-120.

STRAUME, M; MURPHY, K; FREIRE, E. (1992) Thermodynamic Strategies for Potein Design: Increased Temperature Stability. **Symposium Series.**

SUBRAMANIAM, V.; BERGENHEM, N. C. H; GAFANI, A.; STEEL, D. G. (1995) Phosphorescence Reveals a Continued Slow Anneali of the Protein Core Following Reactivation of *Escherichia coli* Alkaline Phosphatase. **Biochemistry** **34**: 1133 -1136.



- TANFORD, C. (1962) Contribution of Hydrophobic Interactions to the Stability of the Globular Conformation of Proteins. **Jacs.** **84**: 4241-4247.
- TANFORD, C. (1968) Protein Denaturation. **Advan In Prot. Chem.** **23**: 121-217
- TANFORD, C. (1970) Protein Denaturation: Theoretical Models For The Mechanism Of Denaturation. **Adv. Prot. Chem.** **24**: 2-95.
- TANFORD, C. (1973) Isothermal Unfolding of Globular Proteins in Aqueous Urea Solutions. **J. Am. Chem. Soc.** **84**: 2040-2059
- TEACE, J. M. & BENJAMIN, D. C. (1976) Antibody As An Immunological Probe For Studyng The Refolding Of Bovine Serum Albumin II. Evidence For The Independent Refolding Of The Domains Of The Molecule. **J. Biol. Chem.** **251**: 4609-4615.
- TEACE, J. M. & BENJAMIN, D. C. (1977) Antibody As An Immunological Probe For Studyng The Refolding Of Bovine Serum Albumin II. Evidence For The Independent Refolding Of The Domains Of The Molecule. **J. Biol. Chem.** **252**: 4521-4526.

- THOMSON, J. A; SHIRLEY, G. R; GRIMSLEY, G. R & PACE, N. (1989) Conformational Stability Mechanism of Folding. **The Jour. of Biol. Chem.** **20**: 11614-11620
- VANHOVE, M; RAQUET, X & FRÉRE, J. M. (1995) Investigation of the Folding Pathway of the TEM - 1  $\beta$ -Lactamase. **PROTEIN: Struc. Func. Gen.** **22**: 110-118.
- VILANUEVA, B. G & HERKOVITS, T. T. (1971) Changes in the Exposure of the Tyrosyl and Tryptophyl Residues in Trypsin Due to Diisopropylphosphoryl and Benzamidine Inhibition. **Biochemistry** **10**: 4589-4594.
- VILANUEVA, B. G & HERKOVITS, T. T. (1971) Exposure of the Tyrosyl and Tryptophyl Residues in Trypsin and Trypsinogen. **Biochemistry** **10**: 3358-3363
- VON HIPPEL, P. H. & GILL, S. C. (1989) Calculation of Protein Extinction Coefficients from Amino Acid Sequence Data. **Anal. Biochem.** **182**: 319-326.
- XIAO, S. G. & ZHOU, J. M. (1996) Conformational Changes At The Active Site Of Bovine Pancreatic Rnase A At Low Concentrations Of Guanidine Hydrochloride Probed By Pyridoxal 5'- Fosfato. **Biochim. Biophys. Acta** **1294**: 1-7.

XIE, D; BHAKUNI, V; FREIRE, E. (1991) Calorimetric determination of the Energetics of the Molten Globule Intermediate in Protein Folding: Apo- $\alpha$ -lactalbumin. **Biochemistry** 30: 10673-10677

WALKER, M. J. (1984) **Methods In Mol. Biol.: Prot.** New Jersey, Humana Press, 1-35

WEISSMAN, J. J. & KIM, P. S. (1991) Reexamination of the folding of BPTI predominance of native intermediates. **Science** 253: 1386-1393.

YAO, M. & BOLEN, D. W. (1995) How Valid Are Denaturant-Induced Unfolding Free Energy Measurements? Level Of Conformance To Common Assumptions Over An Extended Range Of Ribonuclease A Stability. **Biochemistry** 34: 3711-3781.

YOSHIDA, K; SHIBATA, T. & MASAI, J. (1993) Protein Anatomy: Spontaneous Formation of Filamentous Helical Structures from the N-Terminal Module of Barnase. **Biochemistry** 32:2162-2166.

**Nome:** • **I - Formação Universitária:**  
Ana Graci Brito • **Graduação:** Bacharel em Química  
• Universidade Federal de Uberlândia - Uberlândia MG

**Filiação:** • **II - Estágios:**  
Aduartino de Brito Freire • *"Promoção e acompanhamento de atividades de garantia e qualidade, participação em testes relativos ao desenvolvimento de novos produtos e processos, análises microbiológicas"*.  
Raimunda Leite de Brito • **Instituição:** Cargill Agrícola S.A.

**Nascimento:** • *"Pesquisas na área de Cinética Química, eletroforese, padronização de técnicas espectrofotométricas, efeito de osmólitos sobre a atividade de proteínas"*.  
04/01/67 • **Local:** Universidade Federal de Uberlândia

**Documentação:** • **III - Participação em Eventos Científicos:**  
RG:M3536777 SSP/MG • *"Produção de membranas de hemodiálise, utilizando-se o bagaço de cana de açúcar"*.  
CIC/CPF: 678252306/04 • **Evento:** Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência (SBPC) - 1989.  
TE:334720102/72 Zona:278 • *"Determinação de metanol, etanol, acetaldeído, teor de metais pesados e carboidratos em bebidas alcoólicas"*.  
• **Evento:** Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ) - 1990.

**Nacionalidade:** • *"Determinação de metanol, etanol, acetaldeído, teor de metais pesados e carboidratos em bebidas alcoólicas"*.  
Brasileira • **Evento:** Primeiro Congresso Científico da Universidade Federal de Uberlândia - 1991.

**Naturalidade:** • *"Oxidação induzida por oxigênio singlete, degradação de tetrafenil etileno sensibilizada por azul de metileno"*.  
Brasilândia - MG • **Evento:** Quinto encontro regional da S.B.Q. de Minas Gerais, promovido pelo Departamento de Química da UFOP - 1991.

• *"Uma descrição didática do método de ligação do corante para quantificação de proteínas"*.  
• **Evento:** Sétimo encontro regional da Sociedade Brasileira de Química de Minas Gerais, promovido pelo Departamento de Química da Universidade Federal de Uberlândia - 1993.

• *"Osmoregulation of bovine trypsin by sucrose"*.  
• **Evento:** Primeira reunião especial da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência (S.B.P.C) - 1993.

• *"The question of color variability among different proteins in the geral methods for protein quantitation"*.  
• **Evento:** XXIII Reunião Anual da SBBq - 1994

• *"The question of color variability among different proteins in the geral methods for protein quantitation"*.  
• **Evento:** IV Seminário de Iniciação Científica, promovido pela pró reitoria de ensino, pesquisa e extensão. 1994

• *"The question of color variability among different proteins in the geral methods for protein quantitation"*.  
• **Evento:** 46ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência (S.B.P.C) - 1994

• *"Effect of denaturant solvents on the UV spectra of model cromophores of proteins"*.  
• **Evento:** 25ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq) - 1996

• **IV - Monitorias:**  
• **Disciplina:** *Química Geral*  
• Universidade Federal de Uberlândia

• **V - Cursos Ministrados:**  
• **Técnicas Eletroforéticas**  
• **Evento:** XI Semana de Estudos de Estudos Biológicos, promovida pela coordenação do curso de Ciências Biológicas, Diretório Acadêmico Charles Darwin.  
• **Local:** Universidade Federal de Uberlândia  
• **Curso de aperfeiçoamento para professores de nível secundário**  
• **Curso administrado:** Atomística  
• **Local:** Escola Estadual Leon Renault - Belo Horizonte M.G

• **VI - Experiência Profissional:**  
• **Atividade:** Química responsável pelo controle e tratamento de caldeira e torres de resfriamento.  
• Pesquisas e desenvolvimento de produtos químicos para manutenção industrial (detergentes, solventes, decapantes, desengraxantes, fosfatizantes, impermeabilizantes, aditivos, etc).  
• **Local:** Sun Produtos Químicos LTDA

• **VII - Outras Informações**  
• **Curso:** Inglês  
• **Nível Básico e Intermediário:** Aulas particulares e escolas diversas.

**Química**  
**Química**

Única