



Universidade de São Paulo  
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de  
Ribeirão Preto  
Departamento de Química  
Programa de Pós-Graduação em Química

***Mecanismos de dissociação das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  da Na,K-ATPase  
por agentes químicos e físicos: comparação entre a enzima  
solubilizada e reconstituída em lipossomos***

**Carolina Fortes Rigos**

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,  
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da  
Universidade de São Paulo, como parte das  
exigências para a obtenção do título de Doutor  
em Ciências, Área: Química

RIBEIRÃO PRETO – SP

2007

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Universidade de São Paulo  
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de  
Ribeirão Preto  
Departamento de Química  
Programa de Pós-Graduação em Química

***Mecanismos de dissociação das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  da Na,K-ATPase  
por agentes químicos e físicos: comparação entre a enzima  
solubilizada e reconstituída em lipossomos***

**Carolina Fortes Rigos**

Orientador: Pietro Ciancaglini

Co-Orientador: Richard John Ward

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,  
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da  
Universidade de São Paulo, como parte das  
exigências para a obtenção do título de Doutor  
em Ciências, Área: Química

RIBEIRÃO PRETO – SP

2007

Rigos, Carolina Fortes

Mecanismos de dissociação das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  da Na,K-ATPase por agentes químicos e físicos: comparação entre a enzima solubilizada e reconstituída em lipossomos.

Ribeirão Preto, 2007

p.132

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química

Orientador: Ciancaglini, Pietro

Co-Orientador: Richard John Ward

## *AGRADECIMENTOS ESPECIAIS*

*ANDRÉ*

*Obrigada por sempre me fazer entender que as coisas são sempre mais  
simples e fáceis do que parecem.*

*É pouco dizer que você me apoiou em momentos difíceis...a verdade é  
que muitas vezes foi você quem me fez seguir adiante...*

*Essa tese eu dedico a você!*

## *AOS MEUS PAIS E IRMÃOS*

*Se não fosse por vocês, tenho certeza que hoje não teria que escrever esses agradecimentos, porque essa tese não existiria.*

*Pai, você pode não saber, mas sua vontade em terminar a faculdade, aos 40 anos, com trabalho, esposa e três filhos me fez acreditar que tudo o que se quer de coração é sempre possível. Nunca vou me esquecer de um momento em que fiquei te observando estudar de madrugada, e ali tive a certeza de que você era o meu maior herói, e ainda é até hoje!*

*Mãe, obrigada por sempre se preocupar comigo!*

*A dedicação de vocês me proporcionou a tranquilidade para estudar, que infelizmente nem todas as pessoas tem.*

## PIETRO

*Você representa o que significa a palavra competência, que eu interpreto como sendo a soma de duas qualidades: INTELIGÊNCIA E*

*TRABALHO...MUITO TRABALHO!*

*Ter você como referência é motivo de orgulho! E é também saber que eu ainda tenho muito a aprender!*

*Muito Obrigada por me proporcionar um excelente ambiente de trabalho, e por ser um orientador excepcional.*

## AOS AMIGOS DO LABORATÓRIO

*As relações de convivência diária são as mais perigosas, mas têm a compensação de serem as mais prazerosas. Muito obrigada a todos, porque me permito dizer que trabalho me divertindo, e me divirto trabalhando. E ainda que a certeza seja a de que cada um siga a sua vida por diferentes lugares, vou sempre levar comigo as ótimas lembranças desses anos!*

## *Agradecimentos*

*Ao Prof. Dr. Richard John Ward, por me co-orientar nessa tese;*

*Hérica, Katia, Prislaine, Tony, companheiros de muitos anos, que agora seguem em outras cidades, com sucesso no que se propuseram a fazer;*

*Ana Maria, Fernanda, Luiz Eduardo, Marcelle, Rosângela e Simone, que estão atualmente no laboratório;*

*Aos técnicos Dra. Ivana Aparecida Borin e Nilton Rosa Alves, sempre muito prestativos;*

*Aos funcionários do biotério Rinaldo e "Zé"; sempre atenciosos no fornecimento dos animais;*

*A Priscila Cerviglieri Ciancaglini, pela correção dos textos em inglês;*

*Aos alunos de iniciação científica Imaculada, Juliana, Maytê e Ricardo....a presença de vocês no laboratório é sempre especial, nos fazendo muitas vezes refletir com suas perguntas, e também trazendo a descontração necessária. Um agradecimento especial ao Roberto Públio, que colaborou de maneira direta nos trabalhos com a enzima;*

*Aos professores Dr. Guillermo Montich e Dr. Bruno Maggio, pela colaboração nos 2 meses de estágio na Universidad Nacional de Córdoba – Argentina; através do Projeto de cooperação internacional CAPES-SeCYT n°064-04;*

*Aos professores e funcionários do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP*

*A CAPES, FAPESP e CNPq, pela bolsa e auxílios concedidos ao laboratório;*

*A todos os meus amigos que tive a felicidade de conhecer em Ribeirão Preto!*



# ÍNDICE

**Abstract**\_\_\_\_\_IX

**Resumo**\_\_\_\_\_XII

## **1. Introdução**

1.1 A Na,K-ATPase\_\_\_\_\_1

1.2 Solubilização e reconstituição da Na,K-ATPase\_\_\_\_\_14

1.3 Técnicas Biofísicas

1.3.1 Dicroísmo Circular (CD)\_\_\_\_\_15

1.3.2 Fluorescência\_\_\_\_\_18

1.3.3 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)\_\_\_\_\_20

1.3.4 Infravermelho (FTIR)\_\_\_\_\_21

**2. Objetivo**\_\_\_\_\_23

**3. Material e Métodos**\_\_\_\_\_24

## **4. Resultados e Discussão**

4.1 Desnaturação térmica da Na,K-ATPase solubilizada e em sistemas de DPPC:DPPE

4.1.1 Análise por dicroísmo circular e atividade pNFFase\_\_\_\_\_39

4.1.2 Estudos de infravermelho\_\_\_\_\_47

4.1.3 Estabilidade térmica da Na,K-ATPase solubilizada e reconstituída em lipossomos constituídos de DDPC:DPPE, analisada por atividade ATPase e pNFFase_____	51
4.1.4 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)_____	66
4.1.5 Fluorescência intrínseca de triptofano_____	74
4.1.6 Mecanismo de desnaturação da Na,K-ATPase pela ação da temperatura_____	82
4.2 Efeito do cloreto de guanidina na Na,K-ATPase solubilizada_____	84
4.3 Efeito de meios tamponantes	
4.3.1 Análise por dicroísmo circular_____	94
4.3.2 Análise por fluorescência intrínseca de triptofano_____	98
4.4 Análise de tensão superficial e elasticidade_____	104
<b>5. Conclusão</b> _____	<b>118</b>
<b>6. Referências Bibliográficas</b> _____	<b>121</b>
<b>7. Adendo</b> _____	<b>133</b>

## Abstract

Na,K-ATPase is a protein found in the plasmatic membrane of almost all animal cells and it uses the energy from ATP hydrolysis to transport 3 Na<sup>+</sup> ions and 2 K<sup>+</sup> ions. It is formed by subunits called  $\alpha$  and  $\beta$ . One controversial aspect refers to its native and functional association form as a  $\alpha\beta$  protomer or still in  $(\alpha\beta)_2$  or  $(\alpha\beta)_4$  oligomers form. One way to study this protein in our laboratory is by its solubilization from membrane, and later reconstitution in liposome from DPPC:DPPE. The kinetic and structural characterization fo this system shows that the enzyme presents itself in the oligomeric form  $(\alpha\beta)_2$ .

The aim of this work was to evaluate the dissociation and denaturation mechanisms of the solubilized NA,K-ATPase as well as the one reconstituted in DPPC:DPPE liposome, by physic (temperature) and chemical agents (relation protein:detergent, use of chaotropic agents as Guanidine chloride, or still by the pH changes, to interpret its association and regulation forms. To that end, experiments of circular dichroism (CD), calorimetry (DSC), superficial tension, elasticity , catalytic activity (ATPase an pNPPase) were done.

The CD studies in function of temperature variation have shown that a transition occurs in the ellipticity curve (222 nm) at 43.7°C for the solubilized enzyme and at 42.0°C for the enzyme reconstituted in liposome. These transitions were also found by the FTIR technique.

The experiments by DSC for the solubilized enzyme have shown the presence of three peaks at 54.7°C, 64.7°C and 67.8°C. As for the

reconstituted enzyme, transitions in lower temperatures between 30°C and 40°C (concerning the lipids) and also the preservation of the transition peak for the protein at 68.0°C were observed.

The Tryptophane fluorescence analysis for both enzyme forms has revealed emission maximum peak shifts starting from 60°C. The Guanidine presence has shown two transition points at 3 and 5 mol.L<sup>-1</sup> for the solubilized Na,K-ATPase.

The effect of different buffer media has shown that the enzyme presents higher contents in  $\alpha$ -helix at pH 7.5, concomitant with an increase of the intensity of tryptophane fluorescence emission in the pH range of 5.0 to 8.5.

Analyzing all the techniques together we can propose a dissociation/denaturation mechanism in function of the temperature. First, the enzyme goes from its oligomeric  $(\alpha\beta)_2$  state and forms  $\alpha\beta$  protomers. The ATPase activity é totally lost ( over 60°C) when the subunits are completely separated, when an  $\alpha$  subunits aggregation then occurs, through the cytoplasmatic domains.

Finally, the analysis of the enzyme in different proportions of protein:detergent reveals that the NA,K-ATPase, in the presence of concentrations bellow CMS, is in the  $(\alpha\beta)_2$  or yet in the  $(\alpha\beta)_4$  form (Depending on protein concentration). Now for concentrations above CMS, the separation of the subunits occurs and consequent catalytic activity loss.

Due to the ATPase activity dependence on its conformational form and oligomerization state, this study done with biophysical and

biochemistry techniques, results in new information on the comprehension of the mechanisms that control the association processes, which is important to the enzyme function in the natural membrane.

## Resumo

A Na,K-ATPase é uma proteína encontrada na membrana plasmática de praticamente todas as células animais, que utiliza a energia derivada da hidrólise do ATP para transportar 3 íons Na<sup>+</sup> e 2 íons K<sup>+</sup>. É composta por duas subunidades denominadas  $\alpha$  e  $\beta$ . Um aspecto que ainda gera controvérsias se refere à sua forma de associação nativa e funcional como um protômero  $\alpha\beta$  ou ainda na forma de oligômeros  $(\alpha\beta)_2$  ou  $(\alpha\beta)_4$ . Uma forma de estudar essa enzima é pela sua solubilização da membrana, e posteriormente reconstituição em lipossomos de DPPC:DPPE. A caracterização cinética e estrutural desse sistema mostra que a enzima se apresenta na forma oligomérica  $(\alpha\beta)_2$ .

O objetivo desse trabalho foi avaliar os mecanismos de dissociação e de desnaturação da Na,K-ATPase solubilizada bem como da reconstituída em lipossomos de DPPC:DPPE, por agentes físicos (temperatura) e químicos (relação proteína:detergente, uso de agentes caotrópicos como a guanidina e mudanças de pH), para interpretar as suas formas de associação e regulação. Para isso, foram realizados experimentos de dicroísmo circular (CD), calorimetria (DSC), infravermelho (FTIR), fluorescência de emissão do triptofano, tensão superficial, elasticidade, atividade catalítica (ATPase e pNPPase).

Os estudos de CD em função da variação de temperatura mostraram que ocorre uma transição na curva de elipticidade (222 nm) a 43,7°C para a enzima solubilizada e a 42,0°C para a enzima reconstituída em

lipossomos. Estas transições foram também encontradas pela técnica de FTIR.

Os experimentos por DSC para a enzima solubilizada revelaram a presença de três picos em 54,7; 64,7 e 67,8°C. Já para a enzima reconstituída observam-se transições em menores temperaturas entre 30 a 40°C (referentes aos lipídios) e ainda a preservação do pico de transição para proteína em 68,0°C.

A análise de fluorescência de triptofano para ambas formas de enzima revelou deslocamentos de pico máximo de emissão a partir de 60°C. Já a presença de guanidina mostrou dois pontos de transição em 3 e 5 mol.L<sup>-1</sup> para a Na,K-ATPase solubilizada.

O efeito de diferentes meios tamponantes revelou que a enzima apresenta maiores conteúdos em  $\alpha$ -hélice em pH 7,5, concomitante com um aumento na intensidade de emissão de fluorescência do triptofano na faixa de pH de 5,0 a 8,5.

Analisando conjuntamente todas as técnicas podemos propor um mecanismo de dissociação/desnaturação da enzima em função da temperatura. Primeiramente a enzima passa do seu estado oligomérico  $(\alpha\beta)_2$  e forma protômeros  $\alpha\beta$ . A atividade ATPase é perdida completamente (acima de 60°C) quando as subunidades são completamente separadas, ocorrendo então uma agregação das subunidades  $\alpha$ , através dos domínios citoplasmáticos.

Finalmente, a análise da enzima em diferentes proporções de proteína:detergente revela que a Na,K-ATPase, na presença de concentrações abaixo da CMC, se encontra na forma  $(\alpha\beta)_2$  ou ainda  $(\alpha\beta)_4$

(dependendo da concentração de proteína). Já para concentrações acima da CMC ocorre a separação das subunidades e conseqüente perda de atividade catalítica.

Devido à dependência da atividade ATPase com seu estado conformacional e seu estado de oligomerização, este estudo realizado por técnicas bioquímicas e biofísicas, resulta em novas informações acerca da compreensão dos mecanismos que controlam o processo de associação, o qual é importante para a função da enzima na membrana natural.



## **1. Introdução**

### **1.1 A Na,K-ATPase**

A Na,K-ATPase ou bomba de sódio é uma proteína integral encontrada na membrana plasmática de praticamente todas as células animais. Utiliza a energia derivada da hidrólise do ATP para transportar Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> através da membrana contra seu gradiente eletroquímico, o que colabora para manter a concentração de Na<sup>+</sup> baixa (12 mM) e de K<sup>+</sup> alta (cerca de 140 mM) dentro de células eucarióticas. Esse gradiente eletroquímico gerado fornece a força para o transporte intracelular de solutos vitais como a glicose, aminoácidos e neurotransmissores no organismo e para a absorção de metabólitos no intestino, bem como energia para outras vias de transporte que são responsáveis pela regulação do volume celular; para processos epiteliais de secreção, dentre outros (transportes ativos secundários, tanto contra ou co-transportes) (Lopina, 2001; Rajasekaran et al., 2005; Panayiotidis et al., 2006). A medula interna é o local onde a enzima se apresenta em maior concentração. Em um animal em repouso, mais de 20% do ATP celular é consumido pela Na,K-ATPase para manter as funções descritas (Martin, 2005).

Esta enzima faz parte da família das ATPases do tipo P, que representam uma família de transportadores que são caracterizados pela formação de um intermediário fosforilado (em um resíduo de aspartato) durante o ciclo catalítico, e cerca de 200 membros desta família são atualmente identificados (Axelsen e Palmgren, 1998; Hasler et al., 2001; Kaplan, 2002; Horisberger, 2004). De todos os membros, somente a Na,K-

ATPase e a H,K-ATPase apresentam mais de uma subunidade na sua estrutura (Noguchi et al., 1987; Blanco, 2005; Panayiotidis et al., 2006).

A subunidade  $\alpha$  contém aproximadamente 1000 resíduos de aminoácidos e possui massa molecular de cerca de 110 kDa (Pressley, 1996; Kaplan, 2002). Esta subunidade contém o sítio de ligação de ATP e de fosforilação, bem como alguns aminoácidos essenciais para a ligação dos íons sódio, potássio e diferentes inibidores, e apresenta 10 segmentos transmembrana (Bamberg et al., 1993; Jorgensen et al., 2003; Blanco, 2005). Tanto sua região N-terminal quanto a C-terminal estão localizadas no lado intracelular da membrana, tendo ainda na sua estrutura 5 alças extracelulares e 4 intracelulares (Kaplan, 2002; Horisberger, 2004).

Existem três principais estruturas intracelulares para esta subunidade: uma grande alça central entre M4 e M5, composta por cerca de 430 resíduos de aminoácidos; a região N-terminal de cerca de 90 resíduos e ainda uma alça entre M2 e M3 com cerca de 120 resíduos. Os domínios N (domínio de ligação do nucleotídeo) e P (domínio de fosforilação) são formados pela alça M4 e M5; muitos estudos utilizando modificação química, proteólise, clivagem química e ligações cruzadas (cross-linking) têm identificado uma série de resíduos considerados essenciais para a ligação de nucleotídeos (Pedemonte e Kaplan, 1990). O domínio N contém o sítio de ligação do ATP e se estende até o sítio de fosforilação Asp369 do domínio P (Jorgensen et al., 2003). O domínio A (domínio atuador) é um pequeno domínio citoplasmático, formado pelo segmento N-terminal e a alça entre M2 e M3 (Toyoshima et al., 2000; Kaplan, 2002; Jorgensen et al., 2003). Adicionalmente, todos os resíduos

que estão envolvidos com coordenação dos cátions no estado ocluído estão localizados na região transmembrana (Kaplan, 2002).

Já a subunidade  $\beta$  tem massa molecular entre 40 e 60 kDa, sendo composta por cerca de 370 aminoácidos. Destes, cerca de 30 resíduos de aminoácidos são expostos no citosol e 300 resíduos formam a porção extracelular (Lingrel et al., 1994; Geering, 1996; 2001; Hasler et al., 2001; Jorgensen et al., 2003). Esta subunidade apresenta um único segmento transmembrana e um ectodomínio que carrega três pontes de sulfeto e diversas cadeias de açúcar; possui ainda uma curta região N-terminal citoplasmática e uma região C-terminal extracelular (Hasler et al., 1998).

Evidências experimentais sugerem que a subunidade  $\beta$  interage com a subunidade  $\alpha$  em múltiplos sítios, os quais estão localizados tanto no ectodomínio quanto no segmento transmembrana e no domínio citoplasmático (Hasler et al., 1998, 2001). O sítio de interação entre estas subunidades, atualmente mais claramente definido, está localizado na alça extracitoplasmática entre os segmentos transmembrana M7 e M8 da subunidade  $\alpha$ , que interage com o domínio  $\beta$  localizado dentro dos 64 aminoácidos adjacentes ao segmento transmembrana (Fambrough et al., 1994; Colonna et al., 1997; Jorgensen et al., 2003). A interação nesta região mostrou ser importante para a correta inserção na membrana da subunidade  $\alpha$  da Na,K-ATPase (Beggah et al., 1997; Béguin et al., 1998, 2000; Hasler et al., 2001). Outro possível sítio de interação está localizado nos 10 aminoácidos da região C-terminal da subunidade  $\beta$  (Beggah et al., 1993; Hasler et al., 1998). Outros estudos sugerem que as duas subunidades interagem no domínio da membrana, com a hélice

intramembrana da subunidade  $\beta$  em contato com porções do domínio M8 a M10 da subunidade  $\alpha$  (Sarvazyan et al., 1995; Hasler et al., 2001; Ivanov et al., 2000). Finalmente, tem-se também a sugestão de que a região N-terminal citoplasmática da subunidade  $\beta$  interage com a subunidade  $\alpha$  (Geering et al., 1996; Hasler et al., 2001).

A contribuição da Na,K-ATPase para os diversos processos que são relacionados a essa enzima requer que exista um ajuste específico à necessidade de cada tecido. Uma das estratégias adotadas pelos organismos é a de conferir às enzimas uma versatilidade funcional, sendo isso adquirido através da existência de isoformas para as subunidades, surgindo assim uma heterogeneidade da enzima (Blanco, 2005).

Até o presente momento foram identificadas quatro isoformas distintas para a subunidade  $\alpha$ . Estas isoformas são encontradas em diferentes proporções em células para diferentes tecidos: a isoforma  $\alpha_1$  é encontrada em praticamente todas as células, sendo a forma mais encontrada em rim, onde uma regulação especialmente fina da Na,K-ATPase é requerida. Esta isoforma pode ser fosforilada por c-AMP-dependente (PKA), c-GMP-dependente (PKG) proteína quinase e ainda por tirosina quinase (Lopina, 2001). As isoformas  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$  são encontradas distribuídas em diversos tecidos, como cérebro, coração, cartilagem, útero e placenta, por exemplo, e por fim a forma  $\alpha_4$  é aparentemente localizada em testículos, sendo encontrada em humanos e ratos (Sweadner, 1989; Sahmraj e Lingrel, 1994; Woo et al., 2000; Kaplan, 2002, Blanco, 2005).

Para a subunidade  $\beta$  têm sido reportadas três isoformas (Shull et

al., 1986; Martin-Vasallo et al., 1989; Gloor et al., 1990; Malik et al., 1996; Blanco, 2005; Madan et al., 2007). O sequenciamento de subunidades  $\beta$  para um número de espécies de diferentes tecidos revela uma baixa homologia entre as isoformas, cerca de 40% entre  $\beta_1$  e  $\beta_2$  por exemplo. Assim como no caso da subunidade  $\alpha_1$ , a subunidade  $\beta_1$  é predominante em rim de mamíferos. As isoformas  $\beta_2$  e  $\beta_3$  estão presentes em diversos tecidos, como cérebro, cartilagem, músculo esquelético, dentre outros. Além disso, a existência de uma possível quarta isoforma tem sido proposta em músculo (Skou e Esmann, 1992; Lingrel e Kuntzweiler, 1994; Pestov et al., 1999; Martin-Vasallo et al., 2000; Zhao et al., 2004; Blanco, 2005).

Um outro aspecto interessante que contribui para a maior heterogeneidade da enzima é o fato de que as diferentes isoformas podem ser combinadas de diferentes maneiras para formar enzimas que possuem atividade catalítica; já foram estudadas:  $\alpha_1\beta_1$ ,  $\alpha_1\beta_2$ ,  $\alpha_1\beta_3$ ,  $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_2\beta_2$ ,  $\alpha_2\beta_3$ ,  $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_3\beta_2$ ,  $\alpha_3\beta_3$ ,  $\alpha_4\beta_1$ ,  $\alpha_4\beta_3$  (Blanco, 2005).

Até o momento, são conhecidas duas principais funções apresentadas pela subunidade  $\beta$ . A primeira é a função essencial na maturação da subunidade catalítica  $\alpha$ , que, como descrito acima, favorece a correta inserção na membrana e conseqüentemente fornece resistência contra proteólise e degradação celular de subunidades  $\alpha$  sintetizadas (O'Brien et al., 1994; Pressley, 1996; Geering et al., 1996; Beggah et al., 1997; Béguin et al., 1998, 2000; Hasler et al., 1998; 2001). Em adição a esta importante função estrutural, a subunidade  $\beta$  também influencia as

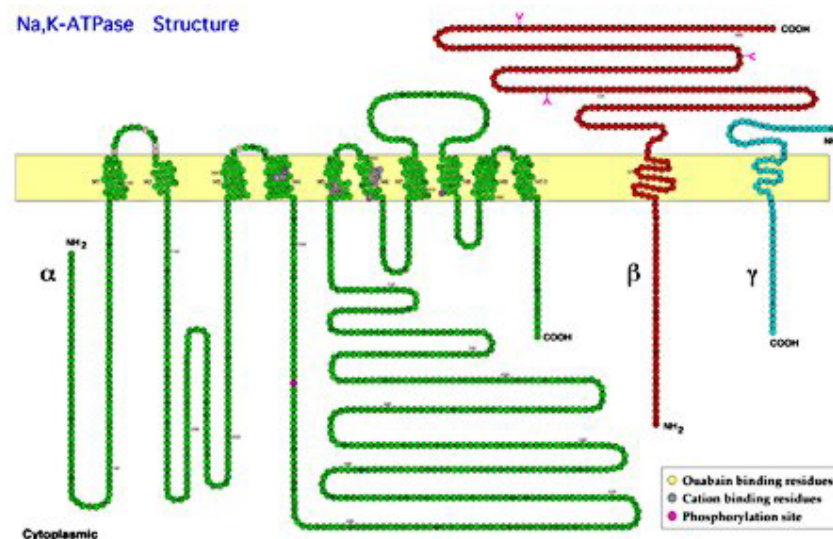
propriedades de transporte da bomba de Na<sup>+</sup> expressa na superfície celular. Diversos estudos têm reportado que a subunidade  $\beta$  está envolvida na afinidade aparente de K<sup>+</sup> pela Na,K-ATPase (Jaisser et al., 1992; Lutsenko e Kaplan, 1993; Eakle et al., 1994; Geering et al., 2001). Isto ocorre porque a função de transporte de K<sup>+</sup>, comum às Na,K-ATPase e H,K-ATPase, está associada a uma composição particular de aminoácidos que não é compatível com uma eficiente inserção da subunidade  $\alpha$  na membrana, indicando que esta inserção deve ser realizada com a subunidade  $\beta$  (Geering, 2000; Hasler et al., 2001). Além disso, as três pontes dissulfeto presentes na cadeia  $\beta$  também são essenciais para a atividade catalítica da enzima, sendo que a ruptura das duas pontes mais próximas à porção C-terminal impede a associação das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  (Noguchi et al., 1994).

Assim, as interações entre as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  através de seus segmentos transmembrana e domínios citoplasmáticos parecem ter importância tanto estrutural quanto funcional (Ivanov et al., 2000; Hasler et al., 2000, 2001; Jorgensen et al., 2003). Tentativas de separar as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  acarretaram a perda de atividade catalítica ou a obtenção de uma subunidade  $\alpha$  com atividade catalítica bastante diferente daquela da forma associada (Skou e Esmann, 1992; Blanco et al., 1994).

Também pode ser considerada a existência de uma pequena proteína com um único segmento transmembrana com a extremidade N-terminal voltada para o meio extracelular e C-terminal voltado para o citoplasma, denominada  $\gamma$ , que foi originalmente definida como uma

terceira subunidade da bomba de sódio (Béguin et al., 1997; Garty e Karlish, 2005). Ela foi descoberta por Forbush et al. (1978) e é expressa principalmente no rim. Muitos pesquisadores isolaram esta subunidade como um proteolípido com massa molecular de cerca de 10 kDa (Béguin et al., 1997; Therien et al., 1999; Geering, 2006). Esse peptídeo faz parte da família FXYD, que são curtos polipeptídeos com um único domínio transmembrana e ainda apresentam um segmento N-terminal extracelular e um C-terminal citoplasmático (Garty e Karlish, 2005). Dentre as diversas funções apresentadas por essa subunidade, pode ser citado como exemplo que em reduz em alguns tecidos a afinidade ao  $\text{Na}^+$  celular, resultando em uma pequena diminuição na afinidade do  $\text{K}^+$  extracelular. Pode também aumentar a afinidade aparente por ATP, e ainda reduzir a afinidade do  $\text{Na}^+$  citoplasmático, atuando portanto como um regulador da enzima (Garty e Karlish, 2005).

**Esquema I.** Representação esquemática das estruturas das subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  da Na,K-ATPase (Blanco e Mercer, 1998).



Uma questão que ainda gera controvérsias a respeito da Na,K-ATPase se refere à relação entre a estrutura quaternária e sua função. O principal questionamento é se o protômero ( $\alpha\beta$ ) é suficiente para o transporte dos cátions ou se este mecanismo de transporte requer associações do tipo  $(\alpha\beta)_n$  entre protômeros. É geralmente aceito que o heterodímero ( $\alpha\beta$ ) seja a unidade estrutural mínima da enzima, e vários estudos mostraram a presença de associações das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  com estequiometria 1:1 tanto para a enzima na membrana como para a enzima solubilizada com detergente, demonstrando que o complexo formado não ocorre devido a colisões ao acaso na membrana, mas sim por associações funcionais proteína:proteína ou agregações não específicas (Askari, 1987; Glynn, 1985; Boldyrev, 2001; Ivanov et al., 2002; Martin, 2005). Essas associações podem ocorrer devido à interação entre as subunidades  $\alpha$  da enzima. Isto foi determinado pelos métodos de cross-linking e imunoprecipitação (Periyasama et al., 1983; Askari, 1987; Costa et al., 2003).

Assim, embora existam autores que consideram o protômero como a unidade funcional e estrutural da enzima (Vilsen et al., 1987; Hayashi et al., 1989; Ward e Cavieres, 1993, 1996; Martin et al., 2000; Takeda e Kawamura, 2001), existem outros que consideram que a enzima nativa da membrana funciona como oligômeros, na forma de um dímero  $(\alpha\beta)_2$  (Thoengs e Schoner, 1997; Kobayashi et al., 1997; Linnertz et al., 1997, 1998; Antolovic et al., 1999; Santos e Ciancaglini, 2003, Costa et al., 2003, Rigos et al., 2006), ou ainda na forma de um tetraprotômero  $(\alpha\beta)_4$



(Mahaney et al., 1990; Tsuda et al., 1998; Yokoyama et al., 1999; Taniguchi et al., 2001; Donnet et al., 2001).

Uma maneira de se estabelecer a estrutura funcionalmente ativa e inserida na membrana foi considerar que o transporte de íons pela Na,K-ATPase envolve a interação e cooperação de dois sítios de ligação pelo ATP (Jorgensen, 1982; Antolovic et al., 1999). Para isso, foram levantadas duas possibilidades: uma considerando que estes sítios de hidrólise residem em duas diferentes subunidades  $\alpha$  do diprotômero  $(\alpha\beta)_2$  (Askari et al., 1988; Schoner et al., 1994; Linnertz et al., 1998; Antolovic et al., 1999) e outra considerando que a enzima funcionalmente ativa apresenta uma única subunidade  $\alpha$  (associada a uma  $\beta$ ), onde residem dois sítios de hidrólise para o ATP na mesma subunidade (Cavieres, 1987, Ward e Cavieres, 1993, 1996).

Além disso, diversas técnicas têm sido empregadas para essa caracterização da estrutura quaternária da enzima, tais como inativação por radiação, que sugere que a atividade catalítica associada com o transporte dos íons e a hidrólise do ATP requer o contato estrutural entre duas unidades  $(\alpha\beta)$ , resultando em uma estrutura  $(\alpha\beta)_2$  (Norby e Jensen, 1989; Skou e Esmann, 1992). O mesmo tipo de associação foi obtido quando se emprega a microscopia eletrônica (Deguchi et al., 1977). Outra técnica empregada é a espectroscopia de transferência por saturação, indicando que a unidade estrutural mínima pode ser um diprotômero ou a enzima pode formar ainda oligômeros  $(\alpha\beta)_4$  (Mahaney et al., 1990). A análise por cristais bi-dimensionais revela que a enzima tem diferentes modos de organização dentro da membrana (Maunsbach et al., 1991,

Skou e Esmann, 1992). Estudos quantitativos usando espalhamento de luz laser de baixo ângulo acoplado com cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) mostram que uma interação oligomérica é requerida para a hidrólise do ATP no caso da enzima solubilizada com detergente (Hayashi et al., 1989; Mimura et al., 1993; Taniguchi et al., 2001). Estes estudos também mostram que a enzima funciona como uma mistura de oligômeros, como protômeros (150 kDa), diprotômeros (300 kDa), e tetraprotômeros (Hayashi et al., 1997; Yokoyama et al., 1999; Taniguchi et al., 2001). A transferência de energia por fluorescência é consistente com interações oligoméricas para a Na,K-ATPase solubilizada (Hayashi et al., 1997, 2000). Também a microscopia eletrônica da Na,K-ATPase obtida de rim de cachorro confirma a estrutura tetraprotomérica (Yokoyama et al., 1999).

Trabalhos recentes têm revelado que essa enzima tem uma função adicional de transdutor de sinal do meio extracelular para o interior da célula, modulando o crescimento e adesão celular, e ainda o início do processo de apoptose. Embora já tenham sido publicados artigos que abordam os vários aspectos da enzima, pouco é conhecido sobre o seu envolvimento durante o processo dessa morte celular. O mecanismo no qual a Na,K-ATPase atua como biosinalizador é baseado na ligação do hormônio esteróide ouabaína, e então a enzima passa a ter uma interação física com outras moléculas sinalizadoras (Aperia, 2007). De acordo com Costa et al. (2003), esse papel “secundário” da interação da Na,K-ATPase com outras proteínas pode estar relacionada com a dimerização da enzima, uma vez que foi sugerido que essas interações ocorram no “loop”

M4 e M5 da subunidade  $\alpha$ , o que justificaria a formação de dímeros na célula, ainda que essa formação, como já descrito, possa não ser essencial para o transporte dos cátions na membrana. Porém, uma vez que a enzima é retirada da membrana e solubilizada, ela se apresenta como uma mistura de protômeros associados-dissociados, sendo que a relativa quantidade deles depende tanto da concentração de proteína quanto da dos ligantes. Além disso, existem evidências que mostram que a bicamada lipídica na qual a enzima está inserida também controla a interação entre os protômeros da Na,K-ATPase (Mimura et al., 1993; Askari, 2000; Lopina, 2001).

O contra-transporte de íons realizado pela Na,K-ATPase segue o mecanismo bem conhecido proposto por Albers e Post há cerca de trinta anos onde, em certas condições fisiológicas, três íons sódio são movidos para fora da célula e dois íons potássio são transportados para o citoplasma, na estequiometria de uma molécula de ATP hidrolisada, e envolve um ciclo em que a enzima apresenta dois estados conformacionais: uma forma  $E_1$ , a qual tem uma alta afinidade pelos íons sódio, e  $E_2$ , com alta afinidade pelo íon potássio (Albers, 1967; Post et al., 1969; Martin, 2005). O modelo atualmente descrito sugere que a enzima passa por dois estágios durante a ligação e transporte dos íons: uma forma não ocluída, onde há interação dos íons ao sítio de ligação, com a enzima acessível a um dos lados da membrana, sendo possível o transporte. Por outro lado, a forma ocluída da enzima refere-se a uma interação efetiva do íon ao sítio, passando a Na,K-ATPase a ser inacessível aos dois lados da membrana (Jorgensen et al., 2003).

Referindo-se a este modelo, com o sistema na forma  $E_1$  e com o “portão” aberto para o lado citoplasmático, três íons sódio são ligados, dois destes como um complexo neutro e um terceiro como um íon. O sistema é cataliticamente ativo. Neste momento, a afinidade da enzima por ATP é alta (Norby e Jensen, 1971), e com o ATP ligado ocorre então sua hidrólise (gerando ADP) e a enzima é fosforilada. Essa ligação de fosfato com alta energia formada ( $E'_1\sim P$ ) fecha o “portão” para o lado citoplasmático. Os três íons sódio passam a estar na sua forma ocluída. Os dois passos seguintes envolvem variações conformacionais e rearranjos do fosfato ligado com alta energia para um estado de baixa energia ( $E'_1\sim P$  para  $E_2\text{-}P$ ): primeiramente, ocorre a desocclusão e liberação de um  $\text{Na}^+$  da forma  $E''_1\sim P$  para o lado extracelular da membrana. A transição para a forma  $E_2\text{-}P$  desocluída abre o “portão” para a desocclusão dos dois íons  $\text{Na}^+$  restantes, e a afinidade diminui para  $\text{Na}^+$  e aumenta para  $\text{K}^+$ . Por isto, dois  $\text{Na}^+$  são trocados por dois íons  $\text{K}^+$  no meio extracelular ( $E_2\text{-}P\text{Na}_2$  para  $E_2\text{-}P\text{K}_2$ ). Com dois íons  $\text{K}^+$  ligados o sistema é desfosforilado: o “portão” extracelular fecha e os dois íons  $\text{K}^+$  são ocluídos ( $E'_2(2\text{K})$ ); o ATP ligado ao  $E'_2(2\text{K})$  no lado citoplasmático, com uma baixa afinidade, aumenta a velocidade no qual o “portão” citoplasmático abre e diminui a afinidade por  $\text{K}^+$  ( $E'_2(2\text{K})\text{.ATP}$  para  $E''_2(2\text{K})\text{.ATP}$ ). Os dois íons  $\text{K}^+$  são substituídos por três íons  $\text{Na}^+$  no meio citoplasmático, e então se reinicia o ciclo (Albers et al. 1967; Post et al., 1969; Glynn e Karlish, 1990; Jorgensen et al., 2001).

Este sistema de transporte é uma bomba muito eficiente: para cada ATP hidrolisado são utilizados cerca de 70 a 85% da energia livre desta

hidrólise. Com as concentrações intra e extracelular de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  normais, a atividade da bomba é 10-15% da sua capacidade máxima (Skou, 1998).

A atividade catalítica da Na,K-ATPase pode ser regulada diretamente pela proteína quinase A (PKA) em Ser943 e proteína quinase G (PKG) a Ser11 e Ser18 da subunidade  $\alpha$  (Therien e Blostein, 2000; Panayiotidis et al., 2006). Além disso, a atividade da bomba pode ser modulada por outros determinantes, como a concentração dos substratos, com a bomba sendo ativada por  $\text{Na}^+$  e ATP no lado intracelular e por  $\text{K}^+$  no lado extracelular, ou ainda a presença de componentes de membrana associados como espectrina, actina e anquirina, dentre outros, e finalmente a presença de hormônios como corticoesteróides e inibidores endogênicos como glicosídeos cardíacos (Panayiotidis et al., 2006). Dentre esses últimos, a ouabaína é o mais importante, ligando-se à porção extracelular da enzima, seletivamente na sua forma fosforilada  $\text{E}_2\text{P}$ , muito provavelmente devido à posição adequada de alguns grupos importantes para a interação da Na,K-ATPase com este inibidor (Kaplan, 2002). Como consequência, tem sido descrito que essa ligação da ouabaína à Na,K-ATPase afeta múltiplas funções celulares, como por exemplo podem ocorrer efeitos na expressão gênica, ligação celular, modificação da resposta imune, dentre outros (Xie et al., 2003).

O vanadato, um análogo do estado de transição do fosfato, é um potente inibidor das ATPases do tipo P, incluindo assim a Na,K-ATPase. Em concentrações nanomolar e na presença de íons magnésio, o vanadato inibe a Na,K-ATPase, ligando-se ao sítio de fosforilação, localizado no domínio citoplasmático da cadeia  $\alpha$  (MacGregor e Walker, 1993; Dafnis e

Sabatini, 1994; Fedosova et al., 1998; Santos e Ciancaglini, 2003). Devido a sua similaridade estrutural com fosfato, mimetiza o estado de transição para a fosforilação/desfosforilação da enzima na forma E<sub>2</sub>, bloqueando o ciclo catalítico da enzima (MacGregor e Walker, 1993; Fedosova et al., 1998; Rice et al., 2001).

## **1.2 Solubilização e reconstituição da Na,K-ATPase**

Estudos de proteínas de membrana em seu microambiente nativo são de difícil interpretação devido à complexidade e interferências de outros constituintes da membrana nativa (Gennis, 1989; Yeagle, 1993; Wu et al., 2002). Assim, uma técnica que é utilizada para o seu estudo é a retirada da proteína da membrana, através do uso de um detergente, que deve manter a proteína em um estado funcional e enovelado (Privé, 2007).

Uma ferramenta poderosa para a elucidação de aspectos funcionais e estruturais dessas proteínas associadas à membrana é a sua incorporação em vesículas constituídas de fosfolipídios (proteolipossomos). A habilidade dessas vesículas para mimetizar a organização e algumas funções de membranas celulares faz destas estruturas um modelo conveniente para o estudo das propriedades de sistemas biológicos de membranas organizados (Rigos et al., 2006; Santos et al., 2006).

Assim, foi padronizada no nosso laboratório uma metodologia de solubilização instantânea de uma membrana utilizando o detergente não iônico C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> (sem uso de SDS), seguida de purificação da Na,K-ATPase na forma (αβ)<sub>2</sub> com uma única etapa cromatográfica (Santos e Ciancaglini, 2000; Santos et al., 2002). Foram posteriormente realizados estudos de

incorporação da enzima em diversas proporções de lipídios, e tanto a composição quanto as quantidades desses lipídios afetam a atividade da Na,K-ATPase. Dentre todas as relações de lipídios empregados, a que mostrou conservar a atividade catalítica da enzima com maior eficiência foi a de DPPC:DPPE (1:1). Estudos cinéticos com esse sistema mostraram que a enzima reconstituída dessa maneira está na forma “right side out”, ou seja, possui os sítios de ligação do ATP para fora da bicamada lipídica (Santos e Ciancaglini, 2003; Santos et al., 2005).

### **1.3 Técnicas Biofísicas**

#### **1.3.1 Dicroísmo Circular (CD)**

Dicroísmo circular (CD) é uma técnica muito utilizada para estudos de moléculas quirais em solução. O CD nos fornece a informação sobre a absorção desigual da luz esquerdo e destro circularmente polarizada por moléculas ativas. Isto ocorre quando um grupo cromóforo é parte de uma estrutura assimétrica, ou quando é imobilizado dentro de um ambiente assimétrico (Schmid, 1990; Bulheller et al., 2007). Devido à disponibilidade de instrumentos de alta precisão, o CD se tornou a técnica mais empregada para medir a atividade óptica de proteínas, podendo ser quantificadas suas estruturas secundárias:  $\alpha$ -hélice,  $\beta$ -folha, curvatura  $\beta$  ou torção  $\beta$  e estruturas ao acaso também denominadas não organizadas (Brahms e Brahms, 1980; Yang et al., 1986; Bulheller et al., 2007). Esta técnica também pode ser utilizada para monitorar perturbações na estrutura de proteínas quando esta interage com outras moléculas ou ainda em função de mudanças de pH ou adição de agentes desnaturantes

(Rodger e Ismail, 2000). Além disso, pode monitorar mudanças conformacionais de proteínas, cujos espectros de CD entre a estrutura enovelada e desenovelada são usualmente muito diferentes (Cantor e Timasheff, 1982; Gresalfi e Wallace, 1984; Schmid, 1990; Sreerama et al., 2004).

Proteínas são polímeros lineares de seqüência bem definida de aminoácidos (estrutura primária), com a atividade biológica crucialmente dependente da sua estrutura tridimensional. Elas formam unidades secundárias regulares devido ao fato da ligação peptídica – (CO – NH) – entre aminoácidos ser plana e rígida, tendo um caráter parcial de dupla ligação. As unidades secundárias estruturais de moléculas quirais resultam em sinais de CD mais ou menos bem definidos, sendo esta a principal característica que possibilita usar esta técnica no estudo de estruturas de proteínas, já que a maioria dos aminoácidos, embora contenham pelo menos um átomo de carbono assimétrico, apresentam somente pequenas bandas de CD (Adler et al., 1973; Cantor e Timasheff, 1982; Bulheller et al., 2007).

O espectro de dicroísmo de proteínas apresenta duas regiões, divididas em próximo e longe (distante). O longe, ou região da amida (170-250 nm), é relacionado às conformações da cadeia principal, e a região do próximo, UV (250-300 nm), onde contribuições peptídicas são insignificantes, é relacionada com contribuições aromáticas, através principalmente das interações dos aminoácidos fenilalanina, tirosina e triptofano, embora transições de ligações dissulfeto (cistinas) também colaboram para a total intensidade de absorção (Adler et al., 1973; Cantor



e Timasheff, 1982; Kelly et al., 2005).

Espectros de CD distintos têm sido descritos para conformações puras como  $\alpha$ -hélice,  $\beta$ -folha, curvatura  $\beta$  e também a espiral “ao acaso”. A  $\alpha$ -hélice é a estrutura secundária predominante em muitas proteínas; cada passo da hélice inclui 3,6 resíduos de aminoácidos por volta. Seus espectros de CD são caracterizados por uma banda negativa em 222 nm (transição  $n \rightarrow \pi^*$ ) e outra em 208 nm, a qual é parte de uma transição  $\pi \rightarrow \pi^*$ , apresentando ainda uma banda positiva em 192 nm (Gresalfi e Wallace, 1984; Rodger e Ismail, 2000).

As características espectroscópicas da  $\beta$ -folha têm provido maior dificuldade de observação em CD que a das  $\alpha$ -hélices, devido ao fato de que tais estruturas foram rastreadas nos ângulos diedrais, portanto são geralmente estruturalmente mais variadas. As características gerais de espectros de CD para  $\beta$ -folha são uma banda negativa a cerca de 216 nm e uma banda positiva em 195 nm (Greenfield e Fasman, 1969; Bayley, 1980; Rodger e Ismail, 2000; Kelly et al., 2005). A curvatura  $\beta$  apresenta no seu espectro de dicroísmo uma banda negativa em torno de 225 nm, referente à transição  $n \rightarrow \pi$ , uma forte transição  $\pi \rightarrow \pi^*$  entre 200 nm e 205 nm, e uma forte banda negativa entre 180 e 190 nm. Finalmente, um espectro de CD típico da espiral ao acaso é caracterizado por um forte sinal de CD negativo abaixo de 200 nm e uma banda positiva em cerca de 218 nm (Rodger e Ismail, 2000; Kelly et al., 2005).

Uma aplicação desta técnica consiste na utilização dos resultados obtidos para a determinação das porcentagens das estruturas secundárias

de uma proteína, através de um processo de desconvolução, pois o espectro de CD de proteínas observado é um somatório dos sinais de todas as conformações secundárias (Sreerama et al., 2004; Kelly et al., 2005). Uma variedade de métodos têm sido propostos para estimar as frações de estrutura secundária de proteínas (Chen et al., 1972, 1974; Brahms e Brahms, 1980; Hennessey e Johnson, 1981; van Stokkum et al., 1990; Bohm e Jaenicke, 1992; Sreerama e Woody, 1994). Os diversos métodos para desconvolução de espectros de CD são baseados em diferentes algoritmos, podendo ser citados: regressão de máximos/mínimos (Provencher e Glöckner, 1981), decomposição de valor singular (Hennessey e Johnson, 1981; Manavalan e Johnson, 1987; van Stokkum et al., 1990; Toumadje et al., 1992; Sreerama e Woody, 1993), método rede neural (Bohm e Jaenicke 1992), análise do fator de componente principal (Pancoska et al., 1991), análise de vínculo convexo (Perczel et al., 1991) e simples procedimento de regressão de quadrados (Chen et al., 1974).

As medidas de dicroísmo circular podem ser realizadas em solução, e somente uma pequena quantidade de material é requerida para a análise. Além disso, sendo o método não destrutivo, as amostras podem ser reutilizadas após estas medidas (Schmid, 1990).

### **1.3.2 Fluorescência**

Uma das técnicas espectroscópicas mais sensível disponível para o estudo de mudanças conformacionais na estrutura de proteínas é a fluorescência, sendo esta representada por um fenômeno com dois

estágios distintos: excitação e emissão. Um cromóforo fluorescente (fluoróforo) absorve um fóton de luz, permanecendo no estado excitado por poucos nanossegundos e então emite um fóton de baixa energia. A intensidade de fluorescência da amostra depende então tanto da eficiência de absorção da luz quanto da eficiência de emissão do fóton a partir de um fluoróforo excitado (Johnson, 2005).

Os espectros são o resultado da presença de cromóforos naturais na estrutura de quase todas as proteínas, representados por resíduos de alanina, tirosina e triptofano, sendo este último aminoácido o mais importante neste tipo de detecção (responsável por 90% da fluorescência total devido ao seu núcleo indol). Os resíduos de triptofano podem ser seletivamente excitados em comprimentos de onda que variam de 295 a 305 nm, e apresentam um pico máximo de emissão em torno de 340 nm (Lakowicz, 1983). Além disso, são observadas tanto mudanças de intensidade quanto deslocamentos no pico de fluorescência. A emissão de resíduos de triptofano em uma proteína nativa pode ser maior ou menor que a emissão de triptofano livre em solução aquosa. Conseqüentemente, tanto um aumento quanto uma diminuição da intensidade de fluorescência pode ocorrer através do desenovelamento de uma proteína (Schmid, 1990; Johnson, 2005).

Já a mudança do espectro de emissão para a região do azul é um resultado do bloqueio de resíduos de triptofano pela matriz da proteína, enquanto que a mudança para maiores comprimentos de onda representa a exposição dos resíduos ao solvente. O tempo de vida de fluorescência de resíduos de triptofano varia de 1 a 6 nseg, sendo o espectro de emissão de

proteínas é sensível à ligação de substratos, reações de associação e finalmente desnaturação da proteína (Lakowicz, 1983).

### **1.3.3 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)**

Até pouco tempo, as técnicas calorimétricas praticamente não eram aplicadas a amostras biológicas, pois requeriam muito material e não tinham a sensibilidade necessária para uma análise confiável. No entanto, avanços técnicos recentes levaram ao desenvolvimento de microcalorímetros, que conseguem detectar pequenas quantidades de calor liberado ou consumido na interação e na alteração conformacional de biomoléculas tais como: proteínas, membranas (lipídeos/proteínas) e ácidos nucleicos (Privalov e Dragan, 2007).

A calorimetria diferencial de varredura (DSC) é uma técnica de grande importância na caracterização termodinâmica de modelos de membranas e biomembranas, além disso, representa um dos métodos mais empregados em estudos de desenvolvimento de proteínas, fornecendo informações na organização estrutural e interações dos domínios cooperativos. Baseado nos valores fornecidos por essa técnica, a análise termodinâmica de enovelamento de uma proteína permite a elucidação de características da sua estrutura terciária e ainda a determinação das contribuições das interações que mantêm a estabilidade da estrutura nativa (Privalov e Dragan, 2007).

Essa técnica consiste de duas células, uma contendo a amostra e outra uma solução de referência inerte, que são aquecidas a uma velocidade pré-programada. Quando existem variações térmicas na

amostra, o sistema de controle supre essa amostra com mais ou menos energia para manter em zero a diferença de temperatura. A partir disso, pode-se obter a entalpia de van' t Hoff ( $\Delta H_v$ ), a entalpia calorimétrica ( $\Delta H_c$ ), a temperatura no pico máximo ( $T_p$ ) e a temperatura à metade da área do pico ( $T_m$ ). Estes quatro parâmetros juntos definem a estabilidade de uma proteína. Dentre essas variáveis, é importante ressaltar a relação entre a entalpia de van' t Hoff e a entalpia calorimétrica, pois representa uma medida da cooperatividade de transição, e pode fornecer informações no número e organização de domínios de uma proteína que passa por um processo de desnaturação. Para proteínas monoméricas, é esperado que as duas entalpias tenham valores iguais (Srinivas et al., 2001).

#### **1.3.4 Infravermelho (FTIR)**

A técnica de espectroscopia de infravermelho (IV) teve um grande avanço nas duas últimas décadas, e conseqüentemente um rápido crescimento em popularidade. Uma vantagem descrita desse método é a alta qualidade obtida com pequenas quantidades de proteína (aproximadamente  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Assim, é usual tanto como uma opção alternativa ou como um complemento para outras técnicas em estudos de proteínas de membrana. Além disso, o ambiente lipídico não perturba a resolução ou sensibilidade do espectro e pode também ser objeto de um estudo simultâneo, e então fornecer informações de interações proteína:lipídio. (Surewicz et al., 1992; Arrondo e Goñi, 1999).

Deve ser reforçado que a espectroscopia de infravermelho é uma técnica empregada nos estudos de conformação de proteínas e dinâmica.

Esta técnica constitui uma das metodologias experimentais empregadas para estimar estrutura secundária de polipeptídios e proteínas. No entanto, estes estudos são de difícil interpretação quando realizados em solução aquosa, devido à água absorver intensamente em uma região espectral importante em torno de  $1640\text{ cm}^{-1}$ , assim os estudos de proteína tem sido realizados empregando  $\text{D}_2\text{O}$  (óxido de deutério) como solvente (Arrondo e Goñi, 1999).

O espectro de infravermelho de uma proteína exhibe diferentes bandas amidas, as quais representam diferentes modos de vibração dessa proteína. De todos os modos amida de um grupo peptídico, o mais utilizado nos estudos de estrutura secundária é a banda amida I, que ocorre principalmente devido ao estiramento  $\text{C}=\text{O}$  da ligação peptídica e fornece informações a respeito da estrutura secundária da proteína, a qual compreende a região entre aproximadamente  $1600$  e  $1700\text{ cm}^{-1}$ . Mais especificamente, bandas da região da amida I entre  $1650$  e  $1658\text{ cm}^{-1}$  são geralmente consideradas características de estrutura em  $\alpha$ -hélice. Já o aparecimento de bandas na região de aproximadamente  $1640\text{ cm}^{-1}$  é característico de estruturas em  $\beta$ -folha (Miyazawa 1961; Hiramatsu e Kitagawa, 2005). Deve ser feita uma ressalva de que para muitas proteínas mais que um componente pode ser observado nessa região. A análise estrutural usualmente implica em um tratamento matemático usado para extrair informações contidas nas bandas (Arrondo e Goñi, 1999; Manning, 2005).

## **2. Objetivo**

O objetivo geral do trabalho foi o de avaliar os possíveis mecanismos de desenovelamento da Na,K-ATPase na sua forma solubilizada (utilizando o detergente C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>) e ainda para a enzima reconstituída em lipossomos de DPPC:DPPE.

Para isso foram empregadas técnicas biofísicas (dicroísmo circular, fluorescência, infravermelho e calorimetria) e também bioquímicas (atividade enzimática ATPase e pNFFase) na caracterização da enzima durante o seu processo de desnaturação com a temperatura, pH (através da variação dos meios tamponantes) e o agente caotrópico cloreto de guanidina. Além disso, foram também analisadas diferentes relações proteína/detergente através das técnicas de tensão superficial e elasticidade (método da gota pendente).

### **3. Material e Métodos**

#### **3.1 Preparação da Na,K-ATPase solubilizada e purificada na forma $(\alpha\beta)_2$**

As frações de membrana da Na,K-ATPase foram extraídas da medula externa de rim de coelho e homogeneizadas em tampão Imidazol 20 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 6,8, contendo sacarose 0,25 mol.L<sup>-1</sup>, EDTA 6 mmol.L<sup>-1</sup> e Tris 6 mmol.L<sup>-1</sup>, a 4°C. O homogeneizado bruto obtido foi centrifugado a 10.000xg por 35 minutos, a 4°C, sendo que o pellet foi desprezado e o sobrenadante submetido a uma ultracentrifugação a 180.000xg por 1 hora, a 4°C. O pellet obtido na ultracentrifugação foi ressuspensão e novamente homogeneizado no tampão inicial. A fração de membrana obtida foi então incubada com C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> na relação proteína:detergente de 1:1 (p/p), instantaneamente a 4°C e em seguida ultracentrifugada a 100.000xg por 1,5 hora, a 10°C e a Na,K-ATPase solubilizada foi obtida no sobrenadante. Em seguida, a enzima foi concentrada utilizando-se um sistema Amicon, equipado com membrana YM-10 e posteriormente dialisada em tampão Tris.HCl 5 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,0, contendo EDTA 1 mmol.L<sup>-1</sup>, KCl 150 mmol.L<sup>-1</sup> e C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> 0,005 mg.mL<sup>-1</sup> por 2 horas, a 4°C (Santos et al., 2002).

A Na,K-ATPase solubilizada foi purificada em sistema **Äkta purifier** (Amersham Biosciences) empregando-se coluna de Sepharose 6FF (2,6 x 200 cm), equilibrada e eluída com tampão Tris.HCl 5 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,0, contendo EDTA 1 mmol.L<sup>-1</sup>, KCl 150 mmol.L<sup>-1</sup> e C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> 0,005 mg.mL<sup>-1</sup>, a 4°C. O eluato foi monitorado continuamente a 280 nm e as



frações coletadas foram acompanhadas por atividade pNFFase e ATPase. As frações que apresentam atividade ATPase foram reunidas e concentradas por ultrafiltração em sistema Amicon, dialisadas em tampão Tris.HCl 5 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,0, contendo C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> 0,005 mg.mL<sup>-1</sup> por 2 horas a 4°C, congeladas empregando-se gelo seco e acetona e finalmente armazenadas em freezer a -20°C.

### **3.2 Dosagem de proteína**

As concentrações de proteína foram determinadas pelo método descrito por Hartree (1972) na presença de SDS 20% (p/v) utilizando a soroalbumina bovina (BSA) como padrão.

### **3.3 Determinação da atividade ATPase**

A atividade ATPase foi determinada descontinuamente a 37°C, utilizando-se um espectrofotômetro Spectronic Modelo Genesis 2 (Milton Roy), pela dosagem do fosfato inorgânico liberado, em meio reacional HEPES 50 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,5, contendo ATP 3 mmol.L<sup>-1</sup>, KCl 10 mmol.L<sup>-1</sup>, MgCl<sub>2</sub> 5 mmol.L<sup>-1</sup> e NaCl 50 mmol.L<sup>-1</sup> em volume final de 1,0 mL, conforme descrito por Santos e Ciancaglini (2000). A reação foi sempre iniciada pela adição de enzima ao meio reacional e interrompida pela adição de solução gelada de TCA 30% (p/v), em tempos reacionais pré-estabelecidos.

Os tubos foram, então, colocados em banho de gelo para diminuir a hidrólise do ATP e então imediatamente centrifugados por 10 minutos. Em seguida, foi efetuada a dosagem de fosfato, seguindo o método

descrito por Heinonen e Lahti (1981). Em cada experimento foram incluídos controles sem a enzima para se estimar a hidrólise não enzimática do substrato. Uma unidade de enzima foi definida arbitrariamente como 1nmol de fosfato liberado por minuto, nas condições padrões do teste.

### **3.4 Determinação da atividade pNFFase por método descontínuo**

A atividade p-nitrofenilfosfatase (pNFFase) da enzima foi determinada descontinuamente, a 37°C, através da liberação de p-nitrofenolato, em 410 nm ( $\epsilon_{410 \text{ nm, pH } 13} = 17.600 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ), em um espectrofotômetro Spectronic Modelo Genesis 2 (Milton Roy). As condições padrões dos ensaios foram: HEPES 50 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,5, contendo: pNFF 10 mmol.L<sup>-1</sup>, KCl 15 mmol.L<sup>-1</sup> e MgCl<sub>2</sub> 10 mmol.L<sup>-1</sup> em um volume final de 1,0 mL, conforme descrito por Santos e Ciancaglini (2000). A reação foi iniciada pela adição da enzima ao meio reacional e interrompida pela adição de NaOH 1 mol.L<sup>-1</sup>, em tempos preestabelecidos.

Em cada experimento foram incluídos controles sem a enzima para se estimar a hidrólise não enzimática do substrato. Uma unidade de enzima foi definida arbitrariamente como 1nmol de p-nitrofenolato liberado por minuto, nas condições padrões do teste.

### **3.5 Preparação da mistura lipídio-detergente**

A mistura lipídio-detergente para a obtenção dos lipossomos foi preparada dissolvendo-se o fosfolipídio em clorofórmio, sendo este

removido através da passagem de uma corrente de nitrogênio pela solução com formação de um filme nas paredes do recipiente. Este filme foi mantido a vácuo por 1 hora, para garantir a completa secagem e desidratação do meio. Os lipídios foram então ressuspensos em tampão Tris.HCl 5 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,0, contendo EDTA 1 mmol.L<sup>-1</sup>, KCl 150 mmol.L<sup>-1</sup> e C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> 10 mg.mL<sup>-1</sup> e deixado em banho-maria à temperatura de 60°C durante uma hora com agitações a cada 10 minutos. Posteriormente, a mistura de lipídios solubilizados foi sonicada por 1 minuto, empregando-se sonicador de ponta (VibraCell VC-600) e deixada por 1 hora à temperatura ambiente.

### **3.6 Reconstituição da Na,K-ATPase em lipossomos e clivagem com tripsina**

Os proteolipossomos foram preparados por co-solubilização de lipídios e proteína, na proporção de 1:1 (p/p) de DPPC:DPPE (dipalmitoilfosfatidilcolina: dipalmitoilfosfatidiletanolamina) e 1:3 (p/p) lipídio:proteína. A Na,K-ATPase solubilizada e purificada foi adicionada à mistura de lipídios e detergente por 10 minutos e esta suspensão foi mantida em banho de gelo. O detergente foi em seguida removido pela adição da resina Biobeads (200 mg.mL<sup>-1</sup>) com trocas em intervalos de 5, 10 e 45 minutos. A resina foi separada da solução por centrifugação a 4.000xg por 10 minutos e, finalmente, a suspensão de vesículas foi ultracentrifugada por 1 hora, a 100.000xg e 4°C, e o pellet foi ressuspensão em 5 mmol.L<sup>-1</sup> de tampão Tris.HCl, pH 7.0, contendo KCl 150 mmol.L<sup>-1</sup>.

Para realizar a clivagem da enzima, a Na,K-ATPase reconstituída em lipossomos de DPPC:DPPE (0.6 mg.mL<sup>-1</sup>) foi tratada com 0,2 mg.mL<sup>-1</sup> de tripsina durante 30 minutos a 37°C. As unidades polipeptídicas e tripsina foram eliminadas por ultracentrifugação por 1 h a 100.000xg e 4°C, e os pellets foram ressuspensos em 5 mmol.L<sup>-1</sup> de tampão Tris.HCl, pH 7.0, contendo KCl 150 mmol.L<sup>-1</sup>.

Os lipossomos, livres de Na,K-ATPase, foram preparados pela adição de tampão ao invés da solução de enzima purificada e processado conforme descrito anteriormente.

### **3.7 Inativação térmica**

A inativação térmica da enzima foi avaliada monitorando-se tanto a atividade pNFFase quanto a atividade ATPase, para a Na,K-ATPase solubilizada e incorporada em lipossomos. A enzima foi mantida em um banho termostático em temperaturas fixas de: 50,0°C; 52,5°C; 55,0°C; 57,5°C; 60,0°C; 62,5°C e 65,0°C, e alíquotas de 30 µL foram retiradas para a determinação da atividade, realizada conforme descrito nos itens 3.3 e 3.4. A temperatura foi atingida com o auxílio de um sistema Peltier.

### **3.8 Cálculo dos parâmetros termodinâmicos**

Pela Eq.  $\text{Log}[S] = -k/2,3 \cdot t + \text{log}[S]_0$  pode-se traçar um gráfico de  $\text{log}[S]$  x t em várias temperaturas, obtendo-se assim vários valores de k :

$$\text{Coeficiente angular} = -k/2,3$$

Com os valores de k em várias temperaturas, pode-se traçar um gráfico de Arrhenius ( $\ln k \times 1/T$ ), onde T é expresso em Kelvin ( $^{\circ}\text{C} + 273$ ):

- Equação de Arrhenius:  $\ln k = -E_a/R \cdot 1/T + \ln A$  ;
- Coeficiente angular:  $-E_a/R$ ;
- Coeficiente linear:  $\ln A$ .

Neste gráfico, os valores de k obtidos da atividade ATPase resultarão em dois decaimentos, que foram tratados separadamente como etapas rápida e lenta. Para a atividade pNFFase, os parâmetros foram calculados para a etapa rápida e lenta observadas anteriormente. Assim, obtêm-se os valores da energia de ativação e da constante A.

Pela Eq.  $E_a = RT + \Delta H$ , obtêm-se o valor da entalpia da reação.

Para calcular o valor da entropia, utiliza-se a relação:

$$A = RT/Nh \cdot e^{(\Delta S + R) / R} \quad (\text{equação 1})$$

Rearranjando esta equação, tem-se:

$$\Delta S = [\ln(AhN/RT) \cdot R] - R. \quad (\text{equação 2})$$

A energia livre de Gibbs é calculada pela equação:

$$\Delta G = -RT(\ln(AhN/RT)) + E_a \quad (\text{equação 3})$$

onde:

$$R = 8,314 \text{ J/mol.K}$$

$$h = 6,626 \times 10^{-34} \text{ Js}$$

$$N = 6,02 \times 10^{23}$$

### **3.9 Caracterização estrutural da enzima solubilizada por Dicroísmo Circular (CD).**

Os estudos de dicroísmo circular (CD) foram realizados conforme descrito por Franzoni et al. (1997) utilizando-se um equipamento Jasco 810 equipado com célula termostaticada do tipo Peltier (equipamento multiusuário obtido por um projeto da FAPESP). Os experimentos foram realizados para as seguintes condições:

**3.9.1 Temperatura** - Os espectros de CD foram coletados de 200 a 250 nm para a enzima solubilizada e reconstituída em lipossomos de DDPC:DPPE, na faixa de temperatura de 10°C a 80°C, com incremento de 5°C e agitação feita com uma barra magnética em uma célula de caminho óptico de 1 cm. As amostras foram incubadas por 1 minuto a cada temperatura para ambas amostras e a variação da temperatura foi realizada com o auxílio de um sistema Peltier. Para a enzima solubilizada os experimentos foram realizados para 37,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  da Na,K-ATPase na presença de tampão Tris.HCl 5  $\text{mmol.L}^{-1}$ , pH 7,0, contendo EDTA 1  $\text{mmol.L}^{-1}$ , KCl 150  $\text{mmol.L}^{-1}$  e C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> 0,005  $\text{mg.mL}^{-1}$ . Para cada medida foram realizados 3 experimentos, de onde se pode fazer uma média dos dados obtidos.

**3.9.2 Meios tamponantes** - Os espectros foram coletados submetendo a Na,K-ATPase solubilizada (50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) a diferentes valores de pH, utilizando para isto os seguintes tampões: Mes 5  $\text{mmol.L}^{-1}$  – pH 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; Imidazol 5  $\text{mmol.L}^{-1}$  – pH 6,5; 7,0; 7,5; Tris 5  $\text{mmol.L}^{-1}$  – pH 7,5; 8,0; 8,5; 9,0 e Ampol 5  $\text{mmol.L}^{-1}$  – pH 9,0; 10,0. Em todos os tampões preparados foram adicionados EDTA 1  $\text{mmol.L}^{-1}$ , KCl 150  $\text{mmol.L}^{-1}$  e  $\text{C}_{12}\text{E}_8$  0,005  $\text{mg.mL}^{-1}$ , em cubeta de 1 cm de passo óptico.

### **3.10 Cálculo da elipticidade em $\text{mdegcm}^2\text{dmol}^{-1}$**

A elipticidade molar foi calculada de acordo com a equação:

$$[\theta]_{\lambda} = \theta_{\text{obs}} \times \text{MW (or MRW)} / 10 \times d \times C$$

onde  $\lambda$ = comprimento de onda;  $\theta_{\text{obs}}$ = elipticidade observada; MW= peso molecular; MRW= média de peso molecular de resíduos de aminoácidos (O MRW usado para um grande grupo de proteínas é de aproximadamente 115); d= comprimento da cubeta em cm e C= concentração de proteína em g/mL (Adler 1973).

### **3.11 Desconvolução dos espectros de CD**

O conteúdo da estrutura secundária foi desconvoluido a partir dos espectros de CD por três métodos: Selcon 3, CONTILL e CDSSTR, os quais fazem parte do programa de software CDPro disponível em: <http://lamar.colostate.edu/sreeram/CDPro> (Sreerama e Woody, 2000).

Os três programas de desconvolução foram ampliados empregando-se as técnicas descritas por Sreerama e Woody (2000).

As desconvoluções foram realizadas com o auxílio do grupo de pesquisa da Prof. Dra. Leila M. Beltramini do IFSC-USP, através Dra. Patricia Targon Campana.

### **3.12 Caracterização estrutural por fluorescência.**

Os ensaios de fluorescência intrínseca do triptofano da enzima solubilizada e reconstituída em lipossomos foram realizados em cubetas de quartzo de caminho óptico de 1 cm, em espectrofluorímetro Spectronic SLM 8100 a 25°C. O comprimento de onda de excitação utilizado foi de 295 nm e o de emissão de 300 a 450 nm, o polarizador foi ajustado para excitação a 90° e emissão a 0°. A voltagem fotomultiplicadora foi de 600V. Para a realização dos ensaios variou-se:

**3.12.1 Concentração de proteína.** Foi realizado um gradiente de concentração de proteína solubilizada e purificada em tampão Tris.HCl 5 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,0, contendo EDTA 1 mmol.L<sup>-1</sup>, KCl 150 mmol.L<sup>-1</sup> e C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> 0,005 mg.mL<sup>-1</sup>, variando-se a concentração de 1,0 a 60,0 µg.mL<sup>-1</sup>.

**3.12.2 Temperatura** Os ensaios de fluorescência intrínseca do triptofano da enzima solubilizada, do proteolipossomo e do proteolipossomo tripsinizado foram realizados em cubetas de quartzo de caminho óptico de 0,1 cm. Todos os resultados mostrados são uma média de três experimentos realizados em cada condição. Para os



experimentos realizados com a enzima solubilizada, foram utilizados 200  $\mu\text{L}$  de uma concentração de proteína de 0,492  $\text{mg.mL}^{-1}$ . O proteolipossomo e o proteolipossomo tratado com tripsina foram obtidos conforme descrito nos itens 3.5 e 3.6 de Material e Métodos, e analisados também com 200  $\mu\text{L}$  de amostra. A análise de variação da temperatura foi realizada com um sistema de aquecimento Peltier, para uma faixa de temperatura de 23 a 80°C.

**3.12.3 Concentração de cloreto de guanidina.** A Na,K-ATPase solubilizada (20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) foi incubada por 24 h em tampão Tris.HCl 5  $\text{mmol.L}^{-1}$ , pH 7,0, contendo EDTA 1  $\text{mmol.L}^{-1}$ , KCl 150  $\text{mmol.L}^{-1}$  e  $\text{C}_{12}\text{E}_8$  0,005  $\text{mg.mL}^{-1}$  na presença de concentrações crescentes de cloreto de guanidina: 0,005; 0,01; 0,03; 0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0  $\text{mol.L}^{-1}$ . O efeito do tempo de incubação da amostra com cloreto de guanidina foi realizado para uma concentração do reagente de 3  $\text{mol.L}^{-1}$ , com 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  em 347 nm, em tampão Tris.HCl 5  $\text{mmol.L}^{-1}$ , pH 7,0, contendo EDTA 1  $\text{mmol.L}^{-1}$ , KCl 150  $\text{mmol.L}^{-1}$  e  $\text{C}_{12}\text{E}_8$  0,005  $\text{mg.mL}^{-1}$ .

**3.12.4 Meios tamponantes.** Os espectros foram coletados submetendo a Na,K-ATPase solubilizada (20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) a diferentes valores de pH, utilizando para isto os seguintes tampões: Mes 5  $\text{mmol.L}^{-1}$  – pH 4,0; 5,15; 6,0; Tris 5  $\text{mmol.L}^{-1}$ – pH 7,0; 7,5; 8,0; 8,5 e Ampol 5  $\text{mmol.L}^{-1}$  - pH 9,0 e 10,6. Em todos os tampões preparados foram adicionados EDTA 1  $\text{mmol.L}^{-1}$ , KCl 150  $\text{mmol.L}^{-1}$  e  $\text{C}_{12}\text{E}_8$  0,005  $\text{mg.mL}^{-1}$ . O experimento foi realizado em cubeta de 1 cm de passo óptico, com

tempo de incubação da amostra de 4 horas. Também foram realizados experimentos de efeito do tempo de incubação da enzima para os tampões Mês pH 4,0; Tris pH 7,5 e Ampol pH 10,6.

### **3.13 Caracterização estrutural por calorimetria**

Esses experimentos foram realizados durante estágio de 2 meses realizado na Universidad Nacional de Córdoba, no laboratório dos professores Dr. Guillermo Montich e Dr. Bruno Maggio. O equipamento utilizado foi o Microcal DSC, com capacidade de 0,5 mL de amostra na cela. As medidas foram realizadas sobre um excesso de pressão de 20 Mpa. A velocidade de aquecimento foi de 1°C/min. O processamento dos dados obtidos foram realizados com o software VPViewerDSC. Primeiramente, foram realizadas várias curvas de calorimetria com o tampão de trabalho a fim de estabilizar o equipamento. Experimentos de DSC para a enzima solubilizada foram realizados em tampão Tris.HCl 5 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,0, contendo EDTA 1 mmol.L<sup>-1</sup>, KCl 150 mmol.L<sup>-1</sup> e C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> 0,005 mg.mL<sup>-1</sup>, com concentrações de proteína purificada de 1,64 μmol.L<sup>-1</sup>. Os proteolipossomos e ainda os proteolipossomos clivados com tripsina foram obtidos conforme descrito nos itens 3.5 e 3.6. Também foi realizada a calorimetria do lipossomo, produzido conforme descrito nos itens 3.5 e 3.6. Para cada amostra foram realizados dois ciclos de aquecimento, com uma média de três medidas.

### **3.14 Caracterização estrutural por infravermelho**

#### **3.14.1 Padronização da técnica e obtenção das medidas**

Esses experimentos foram realizados durante estágio de 2 meses realizado na Universidad Nacional de Córdoba, no laboratório dos professores Dr. Guillermo Montich e Dr. Bruno Maggio. Os espectros de infravermelho foram obtidos em um Nicolet Nexus spectrometer, usando uma célula de CaF<sub>2</sub> com espaçadores de teflon de 50 µm em uma célula metálica. O espectrofotômetro foi purgado com corrente de nitrogênio por 1 hora antes de ser iniciada a coleta do espectro, para reduzir distorções provocadas por vapor de água. As curvas foram obtidas no intervalo de 400 – 4000 cm<sup>-1</sup>, com uma resolução de 2 cm<sup>-1</sup>. Para a enzima solubilizada, a amostra foi liofilizada com sucessivas lavagens com o tampão de trabalho em D<sub>2</sub>O. O pellet correspondente ao proteolipossomo foi preparado conforme descrito nos itens 3.5 e 3.6 de Material e Métodos, porém para os estudos de infravermelho o pellet foi ressuspenso em uma solução deuterada contendo 150 mL de KCl 150 mmol.L<sup>-1</sup>, com sucessivas lavagens para a troca efetiva de H por D. Uma série de medidas foram realizadas em um tempo de 24 horas, para analisar se o processo de troca de H por D varia em função do tempo, e o processo descrito mostrou ser instantâneo. Experimentos de desnaturação térmica foram realizados usando um sistema Peltier de controle de temperatura. A média de velocidade de aquecimento foi de cerca de 1°C/min.

### **3.15 Medida de tensão superficial pelo método da gota pendente**

Um dos métodos de determinação da tensão superficial é baseado no formato de uma gota pendente. Essencialmente, o formato da gota é determinado por uma combinação de efeitos da tensão superficial e gravidade. Forças superficiais tendem a formar gotas esféricas, enquanto a gravidade tende a alongar a gota pendente.

As vantagens do método são inúmeras, uma vez que utiliza pequenas quantidades de amostra, além do fato de que a técnica cobre intervalos de tempo que podem variar de segundos até horas ou dias (Fainerman et al., 2001), sendo que processos bastante lentos também podem ser acompanhados.

As tensões superficiais foram medidas pelo método da gota pendente, empregando o método da análise do perfil eixo-simétrico da gota (ADSA), usando um tensiômetro automático modelo OCA-20, Dataphysics, Alemanha. Para tal, uma gota da solução aquosa de interesse é formada por uma seringa, acoplada a uma bomba de injeção, na extremidade de uma agulha com ponta reta e diâmetro conhecido, contida em uma cubeta ótica contendo um certo volume da solução trabalhada, para manter a atmosfera saturada, de forma a evitar a evaporação da gota durante as medidas. Dessa forma, a gota pode ser filmada por meio de uma câmara CCD. Um programa com um processo de disparo programado de filmagem, a partir do posicionamento conveniente de uma linha de referência, permite filmar imagens mesmo antes da formação da gota. O tempo zero é definido com a formação da interface (gota) após analisar o filme e selecionando-

o quadro a quadro. A tensão superficial é determinada digitalizando a imagem e analisando o seu perfil, quadro a quadro, ajustando-o à equação de Young-Laplace (Davies e Rideal, 1963).

### **3.16 Elasticidade Dilatacional Superficial**

Para as medidas de elasticidade superficial dilatacional, o mesmo aparato foi utilizado (OCA-20, Dataphysics), com o adicional de um sistema de oscilação de frequência, e um software adequado para a aquisição dos dados.

Dessa forma, a oscilação na gota é iniciada depois de o sistema ter atingido o equilíbrio, acompanhado pela não variação da tensão superficial em função do tempo. Foi estabelecido como equilíbrio o sistema que apresentava variação de tensão superficial menor que  $0,5 \text{ mN.m}^{-1}$  durante um intervalo de tempo de 10 minutos.

Um dispositivo piezelétrico, conectado a um gerador de função de onda e localizado acima da agulha, produz um movimento senoidal na gota, em valores específicos de frequência e amplitude pré-determinados. As imagens da oscilação da gota são também gravadas com uma vídeo-câmera. Ao final do experimento, o software recupera as imagens e calcula os valores de área e o valor de tensão superficial correspondente, para cada ciclo de oscilação aplicado. Por meio de análise por transformada de Fourier, o módulo dilatacional superficial complexo ( $E$ ) e o ângulo de fase ( $\theta$ ) são determinados.

#### **4. Resultados e Discussão**

Proteínas são macromoléculas relativamente estáveis, entretanto, altamente susceptíveis à degradação, tanto química quanto física. A degradação química se refere geralmente a modificações envolvendo ligações covalentes, como deaminação e oxidação. Já as degradações físicas envolvem desenovelamento de proteínas e ainda agregação. Como cada proteína é única, terá também uma única característica de estabilidade sobre condições diversas de desnaturação (alterações nos valores de pH, temperatura e ainda adição de agentes desnaturantes químicos, como cloreto de guanidina e uréia), podendo ser caracterizada esta estabilidade a partir destes processos (Mierlo et al., 2000; Chi et al., 2003).

Para avaliar a estabilidade da Na,K-ATPase (tanto para a enzima solubilizada na forma  $(\alpha\beta)_2$  quanto para a proteína inserida em sistemas de lipossomos constituídos de DPPC:DPPE), foram realizados estudos de desnaturação térmica, os quais foram acompanhados por variações na atividade enzimática (ATPase e pNFFase) desta proteína e também pelas técnicas de dicroísmo circular, fluorescência, infravermelho e calorimetria. Além disso, a fluorescência e o dicroísmo circular foram utilizados para acompanhar variações na estrutura da enzima com a ação do agente desnaturante cloreto de guanidina e também pelas variações do pH do meio. Finalmente, o efeito de diferentes proporções entre a proteína e o detergente utilizado na sua solubilização foram avaliados através das técnicas de tensão superficial e elasticidade, com o acompanhamento da atividade ATPase.

## **4.1 Desnaturação térmica da Na,K-ATPase solubilizada e em sistemas de DPPC:DPPE**

### **4.1.1 Análise por dicroísmo circular e atividade pNFFase**

Para determinar o processo de desenovelamento da Na,K-ATPase solubilizada e em lipossomos, uma série de estudos de desnaturação térmica foram realizados, monitorando-se a proteína tanto por técnicas biofísicas (para a avaliação de alterações na estrutura) quanto por técnicas bioquímicas, através da análise da atividade, utilizando para isto o substrato pNFF.

Assim, para avaliar primeiramente os efeitos na estrutura secundária da Na,K-ATPase foram obtidos espectros de dicroísmo circular para a enzima solubilizada variando a temperatura de 10 a 80°C (Figura 1). Os espectros revelam uma característica de estrutura secundária predominante em  $\alpha$ -hélice.

Na Figura 2 é mostrado o gráfico da elipticidade em 222 nm em função da temperatura, além do efeito na atividade pNFFase para a enzima solubilizada com C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>. Para os resultados de elipticidade, é mostrado um ajuste sigmoidal, sugestivo de uma transição de desenovelamento cooperativo da forma dimérica até atingir uma forma desnaturada a altas temperaturas. Além disso, observa-se uma redução dos valores de elipticidade em cerca de 30% do valor inicial. À temperatura de 60°C, quando se pode considerar que a proteína está completamente desnaturada (ocorre uma perda completa da atividade pNFFase), os valores de elipticidade são reduzidos para 25% do valor de elipticidade inicial (T=10°C). O ponto médio de desenovelamento (T<sub>m</sub>)

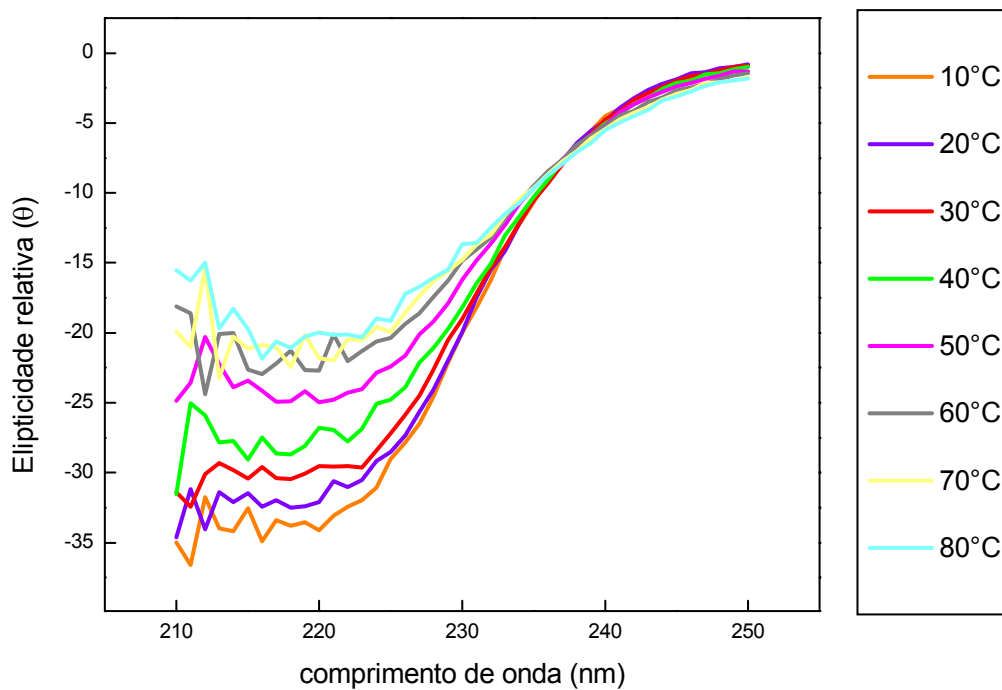
observado para a enzima solubilizada foi de 43,7°C. Depois da desconvolução dos espectros de dicroísmo, esta diminuição em valores absolutos de elipticidade corresponde à diminuição do conteúdo de  $\alpha$ -hélice de 40 para 28%.

Os resultados de atividade pNFFase observados para a desnaturação térmica da enzima indicam uma possibilidade de ajuste em que se observam dois pontos de cooperatividade, com a primeira transição ocorrendo com redução de 30% da atividade inicial a  $T_{50\%}$  de 35°C, e o segundo com  $T_{50\%}$  de 52°C. Além disso, os valores de atividade se reduzem a zero antes de ocorrer a completa perda da estrutura secundária da enzima.

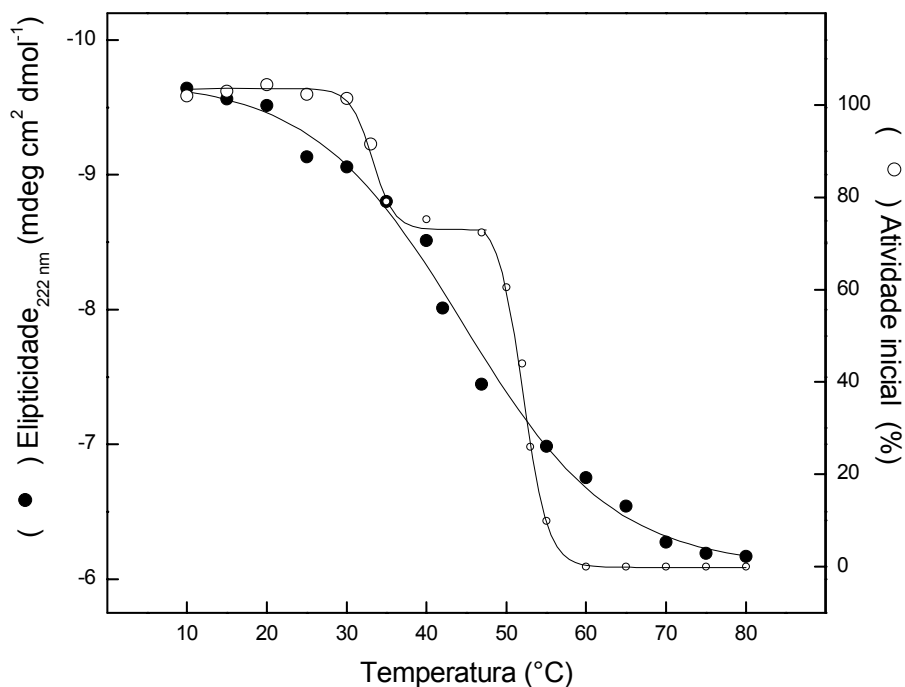
O espectro de dicroísmo circular para a Na,K-ATPase solubilizada e incorporada em lipossomos é mostrado na Figura 3 para duas temperaturas. A 25°C, o espectro de ambos apresenta um perfil similar, e os mínimos característicos de conteúdo de estrutura secundária  $\alpha$ -hélice (208 e 222 nm) estão presentes. A 80°C, um aumento na absorbância óptica da amostra impossibilita a coleta de dados em comprimentos de onda menores que 210 nm, entretanto o perfil dos espectros indica um mínimo em 222 nm, o qual é consistente com a preservação dos elementos da estrutura secundária para esta temperatura.

Para se relacionar a estrutura secundária da enzima solubilizada com sua estrutura quando inserida na membrana, a caracterização da Na,K-ATPase por dicroísmo circular (CD) durante a desnaturação térmica também foi realizada para a enzima em lipossomos de DPPC:DPPE, com o acompanhamento da atividade pNFFase (Figura 4). Os valores dos sinais

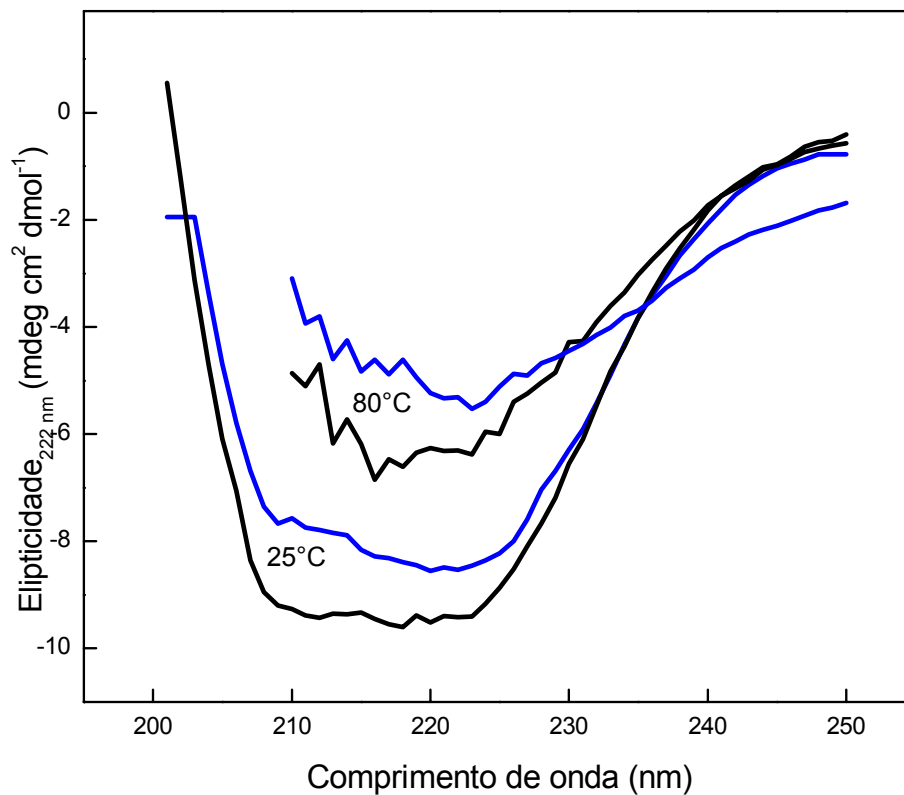




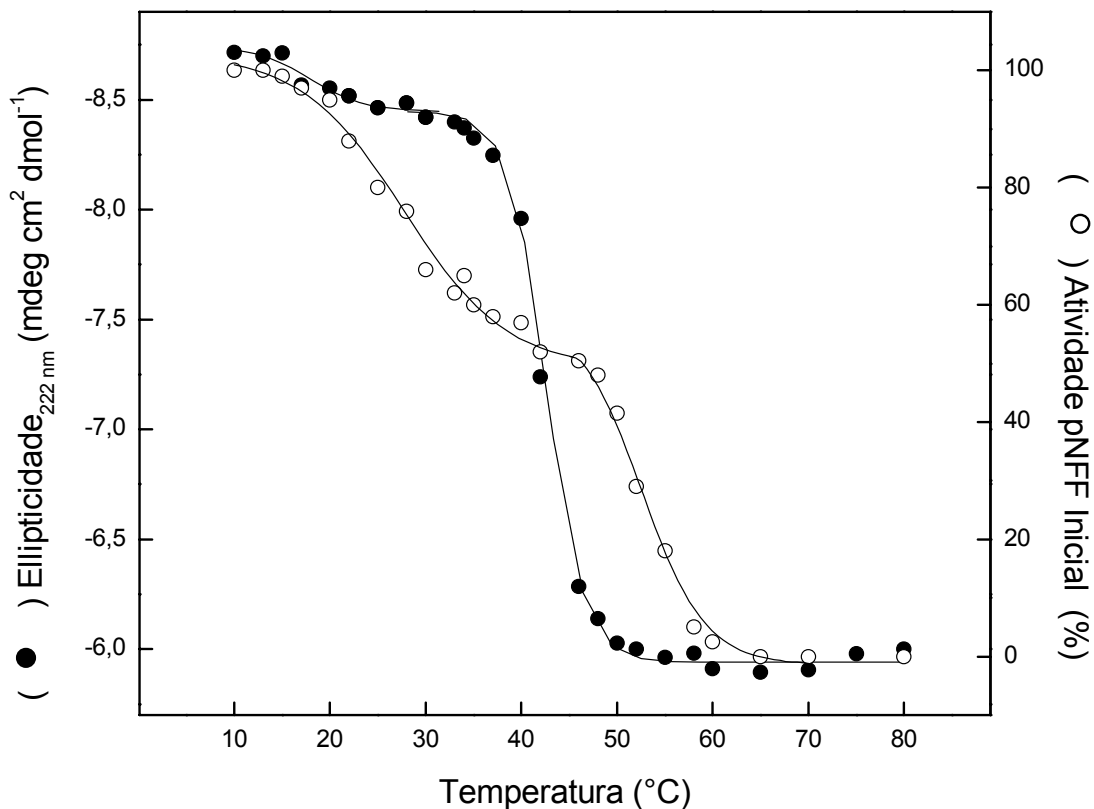
**Figura 1.** Análise de CD da desnaturação térmica da Na,K-ATPase variando a temperatura de 10°C a 80°C em tampão Tris.HCl 5 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,0, contendo EDTA 1 mmol.L<sup>-1</sup>, KCl 150 mmol.L<sup>-1</sup> e C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> 0,005 mg.mL<sup>-1</sup>. Os espectros foram realizados conforme descrito no item 3.9.1 de Material e Métodos.



**Figura 2.** Desnaturação térmica da Na,K-ATPase solubilizada na presença de  $0,005 \text{ mg.mL}^{-1}$  de  $\text{C}_{12}\text{E}_8$ . O gráfico apresenta as variações nos valores de elipticidade relativa a  $222 \text{ nm}$  (●), obtidos a partir da Figura 1. A atividade pNFFase em função da variação da temperatura (○) foi determinada conforme descrito no item 3.7 de Material e Métodos.



**Figura 3.** Espectros de dicroísmo circular da Na,K-ATPase a 25°C e 80°C para a enzima solubilizada ou reconstituída em lipossomos de DPPC:DPPE (—) em Tris-HCl 5 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,0, contendo 150 mmol.L<sup>-1</sup> de KCl. Os espectros foram obtidos conforme descrito no item 3.9.1 de Material e Métodos.



**Figura 4.** Desnaturalização térmica da Na,K-ATPase reconstituída em lipossomos de DPPC:DPPE, obtido conforme descrito nos itens 3.5 e 3.6 de Material e Métodos. O gráfico apresenta as variações nos valores de ellipticidade relativa a 222 nm (●), a partir dos espectros apresentados na Figura 3. A atividade pNFFase em função da variação da temperatura (○) foi determinada conforme descrito no item 3.7 de Material e Métodos.

de elipticidade sofreram uma redução de 31% com um ajuste sigmóide, com  $T_{50\%}$  de 42°C. A desconvolução dos espectros de dicroísmo da enzima reconstituída apresentaram valores de 31% iniciais de  $\alpha$ -hélice, o qual diminuiu para 24%. Já a redução dos valores de atividade pode ser mostrada novamente por um ajuste com duas transições. No primeiro passo a atividade inicial é reduzida em 53% do valor inicial (100%), com temperatura de transição de 25°C, e o segundo passo apresenta uma ausência de atividade, com  $T_{50\%}$  de 53°C.

O comportamento esperado seria o de um aumento na temperatura do ponto médio de desenovelamento ( $T_m$ ), em decorrência de uma maior estabilidade da enzima conferida pela bicamada lipídica. Ao invés disso, observamos uma  $T_m$  bastante semelhante para aquela observada para a enzima solubilizada, representada pelo valor de 46°C no proteolipossomo. Além disso, a atividade da enzima é completamente abolida na mesma temperatura que foi observada para a enzima solubilizada (60°C).

Para a compreensão deste processo é necessário saber que a Na,K-ATPase é composta de regiões que estão expostas ao meio aquoso e outras regiões que estão em contato com os componentes lipídicos da membrana (Esquema I). Além disso, os fragmentos transmembrana da Na,K-ATPase são altamente estáveis e não contribuem para a transição de desenovelamento da proteína na temperatura estudada. Já as porções extra e intracelulares podem ter o mesmo comportamento de proteínas solúveis em água. É descrito ainda que o lado intracelular possui uma grande alça citoplasmática (composto por 440 resíduos de aminoácido), o

qual deve representar a maior unidade cooperativa de desenovelamento da enzima (Grinberg et al., 2001).

Vale a pena também comentar que o proteolipossomo foi preparado no nosso laboratório conforme descrito nos itens 3.5 e 3.6 de Material e Métodos, e que a caracterização cinética da Na,K-ATPase neste sistema foi realizada e mostrou ter uma orientação “right-side-out” (Santos e Ciancaglini, 2003), ou seja, os domínios citoplasmáticos da enzima estão voltados para o lado extracelular do proteolipossomo. A grande alça citoplasmática fica acessível ao processo de desnaturação térmica, apresentando então grande semelhança com os resultados obtidos para a enzima solubilizada, e justificando assim o fato da enzima perder completamente a atividade, sem contudo apresentar uma significativa redução da sua estrutura secundária.

Outros autores também realizaram estudos de desnaturação térmica da Na,K-ATPase. Jorgensen e Andersen (1985), através de estudos de termoinativação, mostraram que a agregação das unidades  $\alpha\beta$  a altos oligômeros acompanham a inativação térmica da Na,K-ATPase solúvel e na membrana, e estes autores sugerem que os passos para o processo de desnaturação ocorra em duas etapas, sendo possível que a inativação térmica da atividade da Na,K-ATPase envolva um aumento na exposição dos resíduos hidrofóbicos ao solvente polar, com resultante desestabilização da estrutura da proteína.

Já Heimburg et al. (1997) estudaram a enzima utilizando a espectroscopia de infravermelho, demonstrando que a atividade catalítica da Na,K-ATPase de membrana de tubarão a altas temperaturas diminui

rapidamente com o aumento da temperatura e a enzima se torna praticamente inativa a 58°C, temperatura bem próxima à encontrada neste estudo (60°C tanto para a enzima solubilizada quanto para a enzima incorporada em lipossomos).

Donnet et al. (2001), em seus estudos de desnaturação térmica da enzima extraída de rim de rato através de clivagem proteolítica, também demonstraram que a enzima, quando aquecida a 55°C, é desnaturada, e mostraram que a proteína mantém nestas condições parte de sua estrutura secundária (“molten globule”). Eles sugerem ainda que o processo de desnaturação térmica da Na,K-ATPase ocorra em estágios, com a extremidade C-terminal sendo exposta ao lado extracelular.

#### **4.1.2 Estudos de infravermelho**

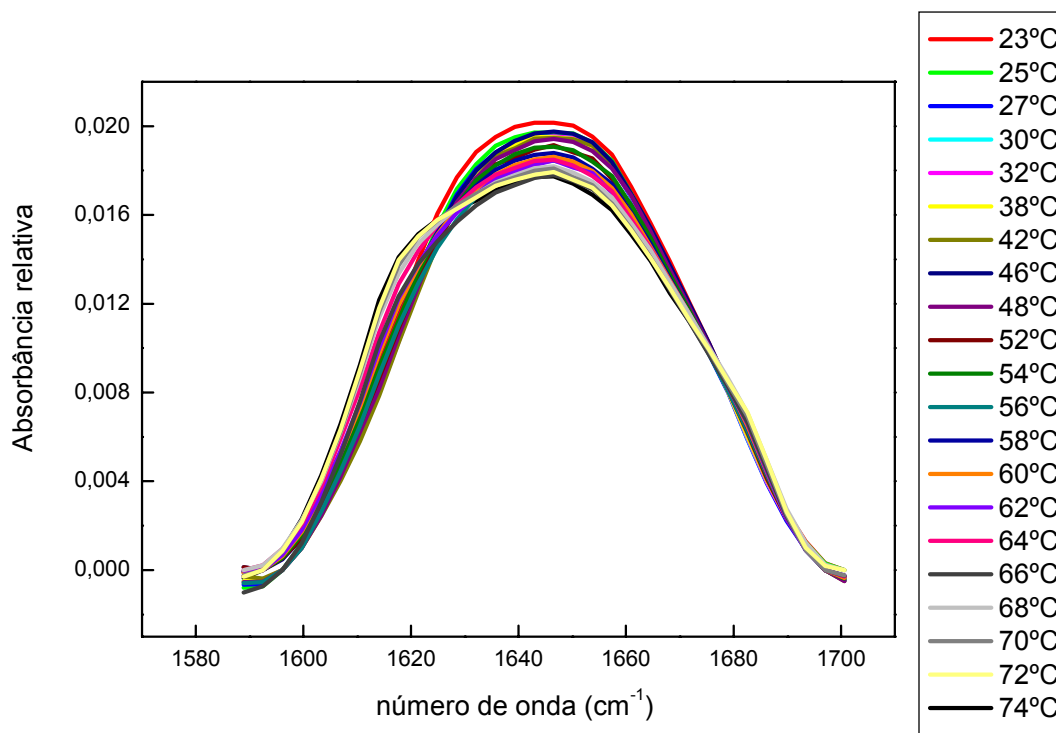
Com o objetivo de complementar os estudos realizados empregando-se a técnica de dicroísmo circular, foram realizados espectros da desnaturação térmica da enzima por espectroscopia de infravermelho. Para esses experimentos utilizamos a enzima inserida em lipossomos constituídos de DDPC:DPPE.

Assim, inicialmente é necessário padronizar a obtenção dos proteolipossomos na presença de D<sub>2</sub>O, para posterior obtenção dos espectros na ausência de água (resultados não mostrados). Os espectros de absorção dos proteolipossomos (Na,K-ATPase-DPPC:DPPE) obtidos revelaram uma banda relativamente intensa entre os números de onda de 1600 e 1700 cm<sup>-1</sup>, confirmando mais uma vez a presença da proteína nos sistemas vesiculares em questão (Figura 5). Uma análise da variação da

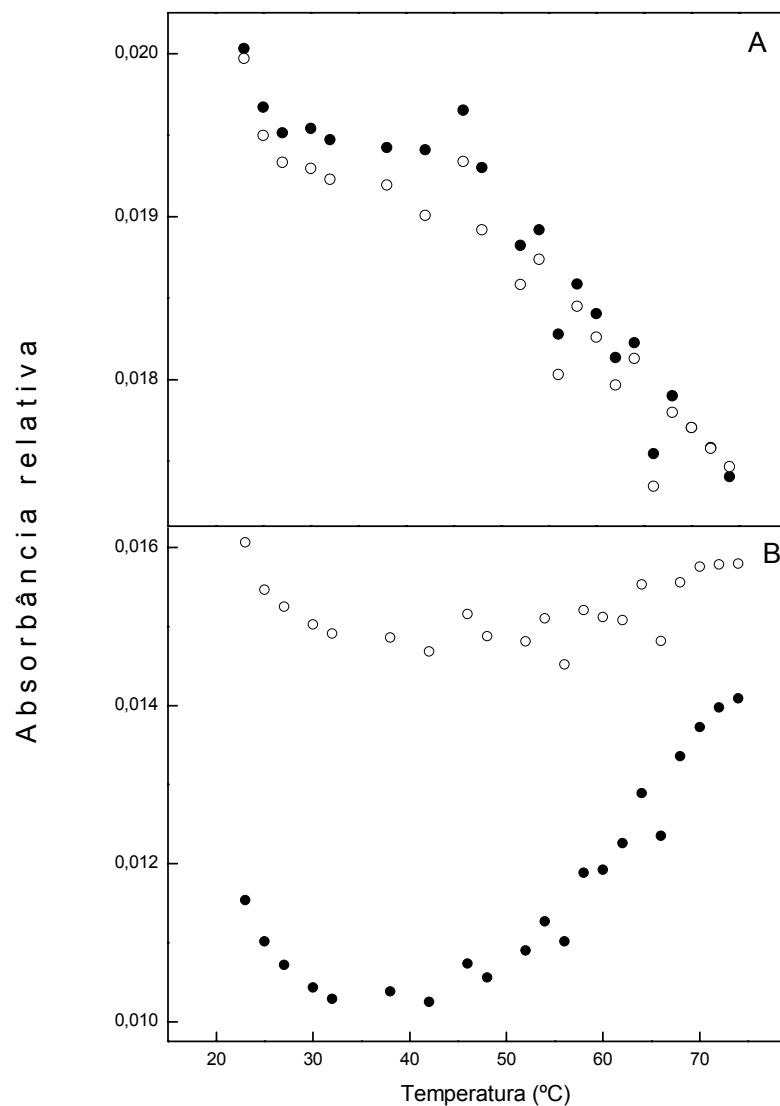
absorbância em função da temperatura revela que tanto para o número de onda de  $1650\text{ cm}^{-1}$  quanto para  $1640\text{ cm}^{-1}$  se pode observar uma diminuição nos valores de absorbância conforme se tem um aumento na temperatura (Figura 6), o que significa uma redução das estruturas secundárias  $\alpha$ -hélice e  $\beta$ -folha. Porém, para  $1618\text{ cm}^{-1}$  ocorre um aumento nos valores de absorbância a partir de cerca de  $45^\circ\text{C}$ , indicando um processo de agregação começando nessa temperatura. Arrondo et al. (1994) também concluíram que o processo de desnaturação da citocromo c oxidase analisada por FTIR com o aumento da temperatura ocorre devido a um processo de agregação da proteína. De acordo com os autores, isso é coerente com o fato de que se mantém muito da estrutura secundária da enzima durante o experimento. Isso muito provavelmente está em concordância com os resultados de desnaturação em função da variação da temperatura obtidos para a Na,K-ATPase tanto para dicroísmo circular quanto para infravermelho.

Diversos autores descrevem que os processo de desnaturação acima de  $40^\circ\text{C}$  (temperatura de transição dos lipídios) levam à agregação na forma  $\alpha$ - $\alpha$ , sem a participação da subunidade  $\beta$ , e ainda que um aquecimento acima de  $60^\circ\text{C}$  leva a uma completa perda da atividade enzimática (Donnet et al., 2001; Rigos et al., 2006). Foram realizados previamente estudos de infravermelho do proteolipossomo clivado com tripsina, que mostrou que os resultados descritos aqui são coerentes, uma vez que para essa amostra a banda correspondente ao processo de agregação desaparece, justificando assim a agregação ocorrer através dos domínios extra-lipossomais da subunidade  $\alpha$ .





**Figura 5.** Espectros de Infravermelho obtidos para o proteolipossomo (Na,K-ATPase-DPPC:DPPE), obtidos em função da variação da temperatura (23 a 74°C), conforme descrito no item 3.14 de Material e Métodos. O tratamento dos dados foi realizado para a região da banda amida I.



**Figura 6.** Absorbâncias dos números de onda (●) 1650 cm<sup>-1</sup> e (○) 1640 cm<sup>-1</sup> (A) e (●) 1618 cm<sup>-1</sup> e (○) 1624 cm<sup>-1</sup> (B) em função da variação da temperatura (23 a 74°C). Os valores foram obtidos a partir dos espectros da Figura 5.

Com isso, fica claro que o processo de perda de atividade da Na,K-ATPase, tanto para a enzima solubilizada quanto para o proteolipossomo, pode ocorrer sem contudo haver uma perda considerável de estrutura secundária da enzima.

Vale a pena comentar que muitas tentativas para identificar as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  separadas ou associadas tanto na forma  $\alpha\beta$  quanto na  $(\alpha\beta)_2$  foram realizadas por cromatografia por exclusão (coluna de Superose) e eletroforese não desnaturante (resultados não mostrados). As cromatografias renderam picos nas massas moleculares esperadas, mas não apresentaram reprodutibilidade: alguns cromatogramas mostraram que a proteína se apresentava em um único pico (referente ao volume de exclusão da coluna), em outros casos ocorreram sobreposições dos picos, sugerindo que pequenas mudanças na concentração de proteína, quantidade de detergente, condicionamento da amostra protéica, temperatura e processo de congelamento afetam significativamente o resultado obtido. Assim, nesse caso é necessário investir mais tempo para compreender um pouco mais todos esses mecanismos.

#### **4.1.3 Estabilidade térmica da Na,K-ATPase solubilizada e reconstituída em lipossomos constituídos de DDPC:DPPE, analisada por atividade ATPase e pNFFase.**

A termodinâmica de desnaturação de proteínas de membrana não tem sido estudada com a mesma extensão que de proteínas solúveis (em água). Isto ocorre devido a diversas razões, como a dificuldade de obter proteínas de membrana em quantidades suficientes para estes estudos, a

complexidade de suas interações com o ambiente lipídico ou de detergente e sua tendência a agregar durante o processo de desnaturação. Entretanto, estudos termodinâmicos podem fornecer uma maior compreensão das forças estabilizadoras de proteínas de membrana e as mudanças estruturais que elas sofrem a altas temperaturas, bem como realçar características específicas de uma proteína em um ambiente anfifílico (Sehgal e Otzen, 2006).

Assim, a obtenção dos valores termodinâmicos importantes como energia de ativação ( $E_a$ ), entalpia ( $\Delta H$ ), entropia ( $\Delta S$ ) e energia de Gibbs ( $\Delta G$ ) para a avaliação da estabilidade da Na,K-ATPase foi realizada através do efeito do tempo na inativação da enzima incorporada a sistemas de DPPC:DPPE em diferentes temperaturas. É muito importante também o estudo termodinâmico comparativo entre a enzima solubilizada e a reconstituída em sistemas miméticos de membrana porque assim se pode relacionar o quão estável é a proteína fora do ambiente lipídico. Este efeito foi avaliado para a atividade catalítica utilizando os substratos ATP e pNFF.

A desnaturação da Na,K-ATPase em lipossomos nas temperaturas escolhidas foi monitorada por um período de até 200 min, para um intervalo de temperatura de 50 a 65°C, conforme procedimento descrito no item 3.7 de Material e Métodos. No tempo zero, os valores de atividade foram considerados como 100%. A redução na atividade catalítica da enzima neste intervalo de tempo, para o substrato pNFF, pode ser descrita como a soma de dois decaimentos exponenciais, o primeiro mais rápido e o segundo mais lento (Figura 7). O tempo relacionado ao término do

primeiro decaimento diminui conforme se tem um aumento da temperatura de incubação; de 50°C até 57,5°C este tempo chega a 30 minutos, sendo reduzido a apenas 5 minutos quando a temperatura empregada é de 65°C. Além disso, para a temperatura de 52,5°C tem-se uma redução de 50% em relação à atividade inicial para o tempo de 210 minutos, enquanto que a incubação a 65°C leva a uma redução quase completa da atividade da enzima após 20 minutos.

O mesmo processo de avaliação da estabilidade da enzima em sistemas de lipossomos de DPPC:DPPE foi realizado para o substrato ATP (Figura 8). Neste caso, o processo pode ser descrito ocorrer em apenas uma etapa, para uma variação de temperatura de 50 a 65°C. Uma ausência de atividade é encontrada após 150 minutos para 57,5°C, 40 minutos para 60,0°C, 25 minutos para 62,5°C e apenas 10 minutos para 65,0°C. Para temperaturas menores de incubação, a redução da atividade encontrada não ocorre de maneira completa; por exemplo, para 52,5°C a redução chega a 25% da inicial após 3,5 horas de incubação.

A partir das regressões lineares obtidas neste experimento, pode-se calcular o valor de  $k$ , e então construir o gráfico de  $\ln k$  em função do inverso da temperatura, conhecido como “gráfico de Arrhenius” (Figura 11). Utilizando o pNFF como substrato (Figura 11A), é possível construir duas retas a partir dos valores iniciais de estabilidade térmica a várias temperaturas, uma correspondendo à etapa rápida do processo de desnaturação, enquanto a outra corresponde à etapa lenta. Para cada processo, foram calculados os valores de  $E_a$ ,  $\Delta H$ ,  $\Delta S$  e  $\Delta G$ , os quais estão sumarizados na Tabela I, conforme descrito no item 3.8 de Material e

Métodos. Já o gráfico obtido a partir dos resultados realizados com o substrato ATP apresentou um perfil onde pode ser realizado um ajuste em que se obtém uma reta (Figura 11B), e a partir dessa também foram calculados os parâmetros termodinâmicos, mostrados na Tabela I.

**Tabela I.** Valores termodinâmicos de inativação da Na,K-ATPase inserida em lipossomos de DPPC:DPPE para os substratos ATP e pNFF. Os valores foram obtidos a partir das Figuras 11A e 11B, conforme descrito no item 3.8 de Material e Métodos.

<b>Substrato</b>	<b>Etapa</b>	<b>E<sub>a</sub> (kcal)</b>	<b>ΔH° (kcal.mol<sup>-1</sup>)</b>	<b>ΔS° (cal.mol<sup>-1</sup>)</b>	<b>ΔG° (kcal.mol<sup>-1</sup>)</b>
<b>ATP</b>	<i>Única</i>	71,14	71,83	0,148	26,23
	<i>Rápida</i>	39,00	38,40	0,052	22,73
<b>pNFF</b>	<i>Lenta</i>	76,28	75,68	0,168	26,03

Conforme se pode observar a partir dos parâmetros termodinâmicos mostrados na Tabela I, os valores de ΔH° e ΔG° para a etapa lenta do substrato pNFF (75,68 e 26,03 kcal.mol<sup>-1</sup>) e o ATP (71,83 e 26,23 kcal.mol<sup>-1</sup>) foram extremamente semelhantes. Isso mostra que, apesar dos sítios de ligação dos substratos estarem localizados em locais diferentes, e ainda que o ciclo reacional de ambos serem distintos, eles são afetados da

mesma maneira quando a Na,K-ATPase inserida em lipossomos é aquecida a diferentes temperaturas (Krumscheid et al., 2004; Tanoue et al., 2006).

A desnaturação da Na,K-ATPase solubilizada nas temperaturas escolhidas foi monitorada por um período de até 150 minutos, para um intervalo de temperatura de 52,5 a 62,5°C, conforme procedimento descrito no item 3.7 de Material e Métodos. No tempo zero, novamente os valores de atividade foram considerados como 100%. A redução na atividade catalítica da enzima nesse intervalo de tempo, para o substrato pNFF, pode ser descrita como a soma de dois decaimentos exponenciais, o primeiro mais rápido e o segundo mais lento (Figura 9). O tempo relacionado ao término do primeiro decaimento diminui conforme se tem um aumento da temperatura de incubação: de 50°C até 57,5°C este tempo chega a 50 minutos, e quando a temperatura é de 62,5°C não é possível visualizar a etapa lenta desse gráfico, pois a desnaturação ocorreu muito rapidamente. Além disso, para a temperatura de 52,5°C tem-se uma redução de 20% em relação à atividade inicial para o tempo de 150 minutos, enquanto que a incubação a 62,5°C leva a uma redução quase completa da atividade da enzima após 5 minutos.

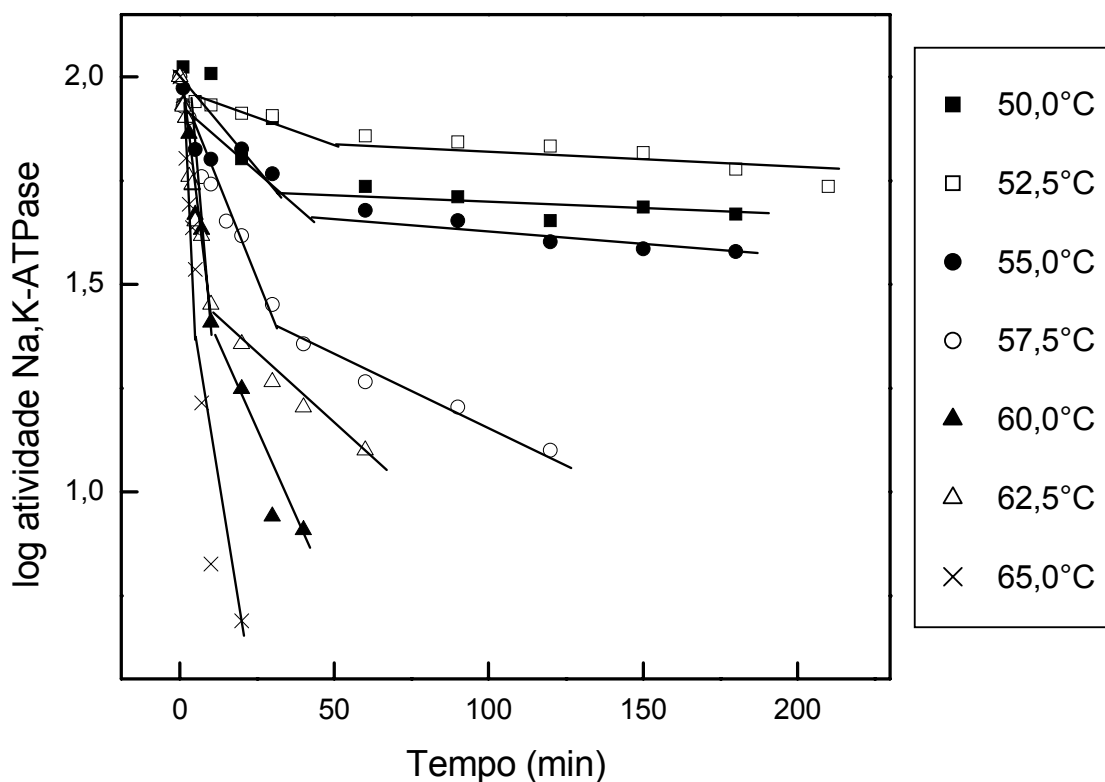
O mesmo experimento foi realizado para a enzima solubilizada na presença do substrato ATP. Nesse caso, o processo também ocorreu em duas etapas, o primeiro mais rápido e o segundo mais lento, para uma variação de temperatura de 50 a 62,5°C. Após 150 minutos, a atividade ATPase atingiu 40% da atividade inicial para a temperatura de 57,5°C, 50% para 60,0°C e chegou a zero em 100 minutos para 62,5°C. Para

temperaturas menores de incubação, a redução da atividade encontrada não ocorre de maneira completa; por exemplo, para 52,5°C a redução chega a 25% da inicial após 2,5 horas de incubação (Figura 10).

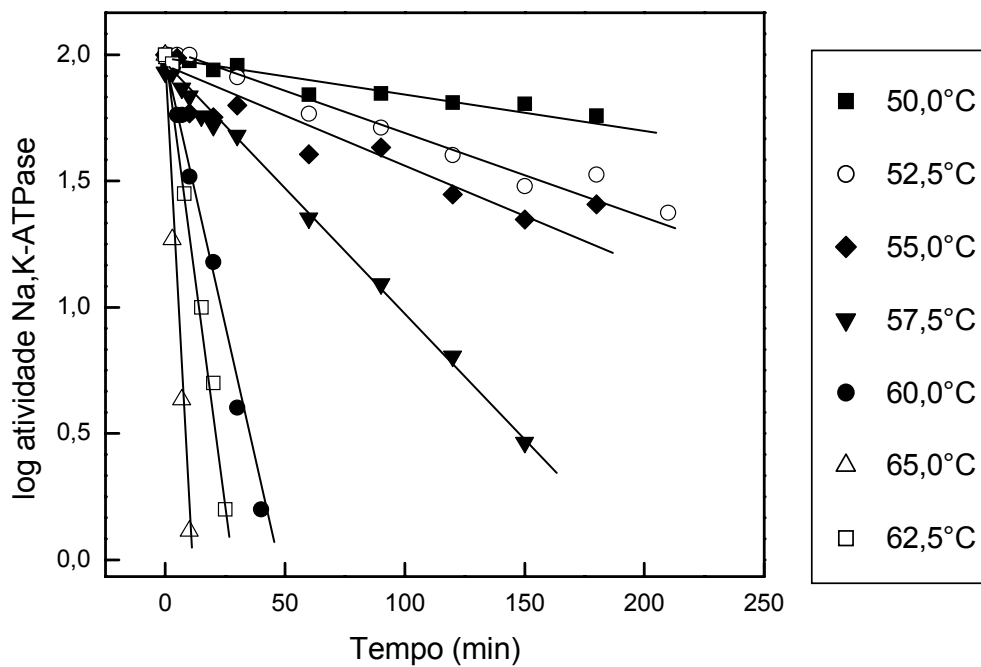
Do mesmo modo que foi feito para o proteolipossomo, foi construído o gráfico de  $\ln K$  em função de  $1/T$ , para assim serem obtidos os valores termodinâmicos do processo de desnaturação. Como pode ser observado na Figura 11C, foi possível construir somente uma reta a partir dos valores iniciais de estabilidade térmica a várias temperaturas para o substrato pNFF, reta essa referente à etapa lenta do processo. Isto provavelmente se deve à alta sensibilidade da enzima solubilizada a variações de temperatura quando ela atua na hidrólise do substrato pNFF, não sendo possível uma relação linear no gráfico de Arrhenius. Logo, foram calculados os valores de  $E_a$ ,  $\Delta H$ ,  $\Delta S$  e  $\Delta G$  somente para a etapa lenta, os quais estão sumarizados na Tabela II, conforme procedimento descrito no item 3.8 de Material e Métodos. No caso da desnaturação térmica da enzima solubilizada com a utilização do substrato ATP foi possível construir duas retas, referentes às etapas lenta e rápida do processo de desnaturação (Figura 11D); os valores termodinâmicos obtidos estão na Tabela II.

No caso da enzima solubilizada, embora os valores de  $\Delta G^\circ$  obtidos sejam bastante similares, foi encontrado um valor muito maior de  $\Delta H$  para a inativação obtida com o substrato pNFF na etapa lenta (108,85 kcal.mol<sup>-1</sup>) quando comparado à etapa lenta do ATP (49,10 kcal.mol<sup>-1</sup>).

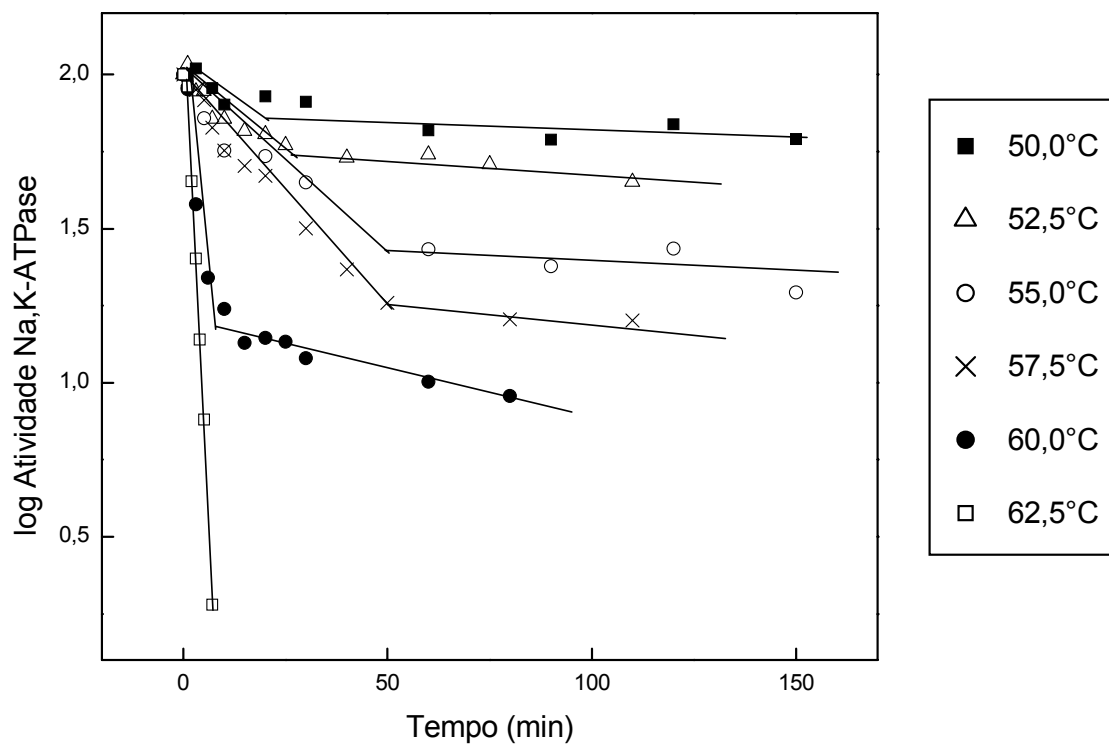




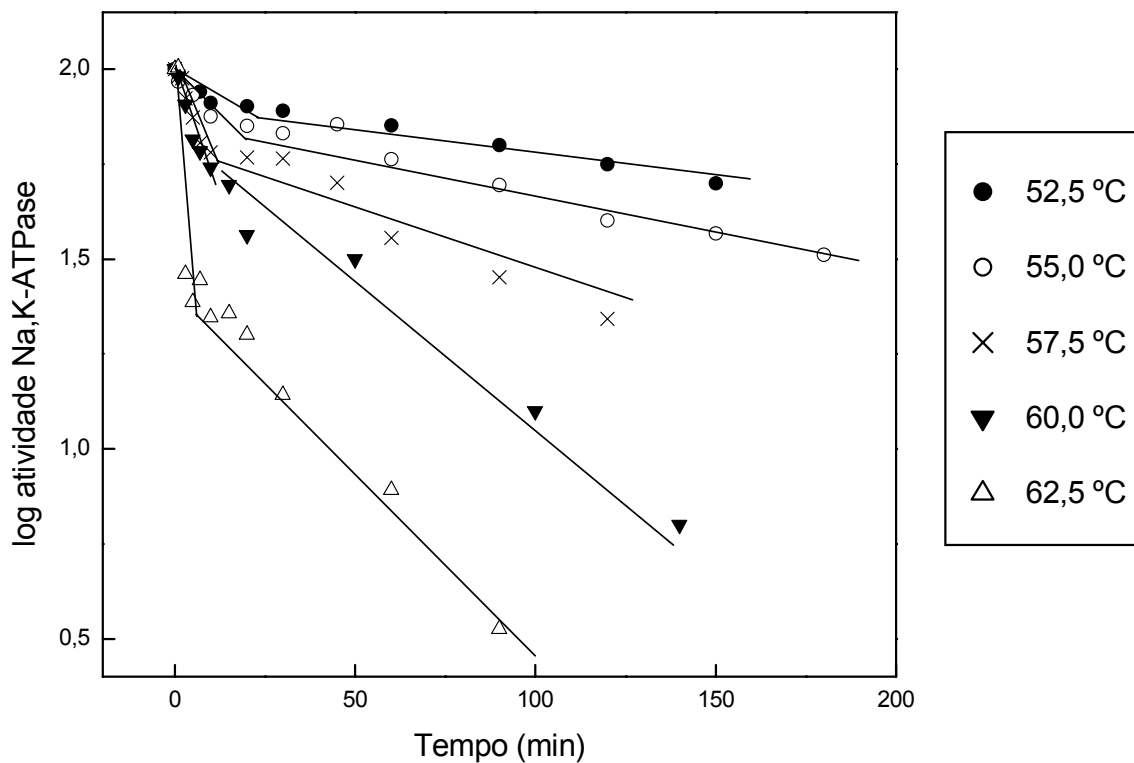
**Figura 7.** Estabilidade térmica em diferentes temperaturas para a Na,K-ATPase reconstituída em lipossomos de DPPC:DPPE, obtido conforme descrito nos itens 3.5 e 3.6 de Material e Métodos. A atividade pNFF foi determinada conforme procedimento descrito no item 3.4 de Material e Métodos.



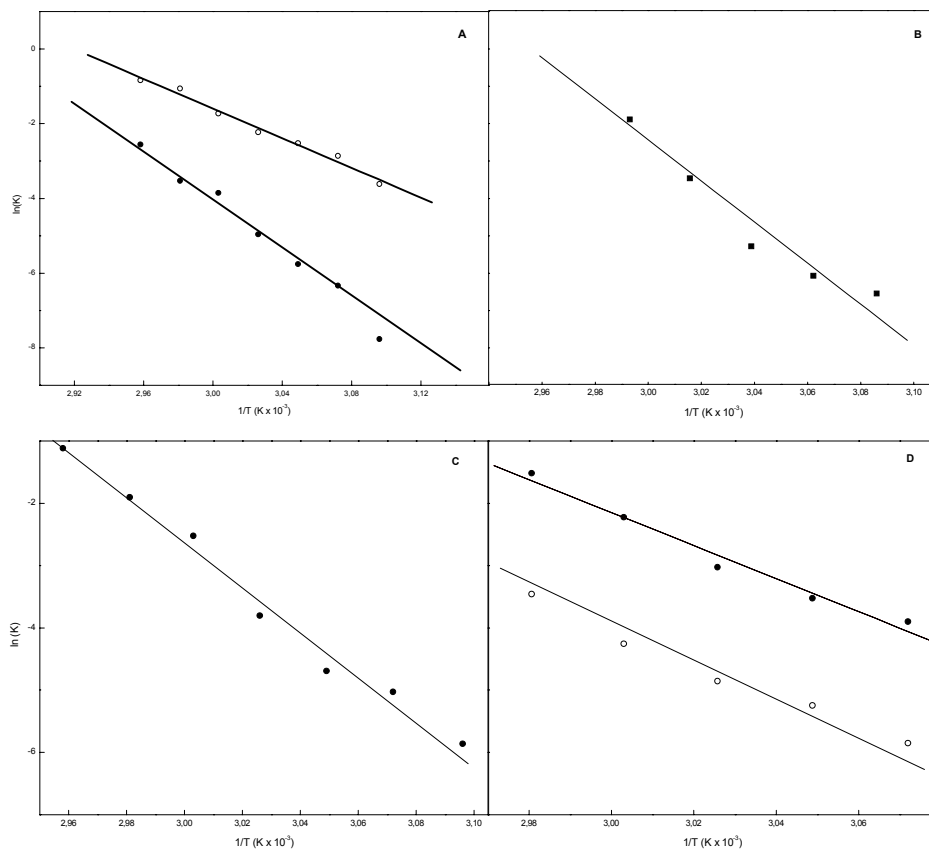
**Figura 8.** Estabilidade térmica em diferentes temperaturas para a Na,K-ATPase reconstituída em sistemas de lipossomo de DPPC:DPPE, obtido conforme descrito nos itens 3.5 e 3.6 de Material e Métodos. A atividade ATPase foi determinada conforme procedimento descrito no item 3.3 de Material e Métodos.



**Figura 9.** Estabilidade térmica em diferentes temperaturas para a Na,K-ATPase solubilizada com  $C_{12}E_8$ . A atividade pNFF foi determinada conforme procedimento descrito no item 3.4 de Material e Métodos.



**Figura 10.** Estabilidade térmica em diferentes temperaturas para a Na,K-ATPase solubilizada com  $C_{12}E_8$ . A atividade ATPase foi determinada conforme procedimento descrito no item 3.3 de Material e Métodos.



**Figura 11.** Gráficos de Arrhenius obtidos a partir dos valores de estabilidade térmica para a Na,K-ATPase: **A.** inserida em sistemas de DPPC:DPPE para o substrato pNFF - etapas rápida (○) e lenta (●); **B.** inserida em sistemas de DPPC:DPPE para o substrato ATP; **C.** solubilizada com C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> para o substrato pNFF para a etapa lenta; **D.** Na,K-ATPase solubilizada com detergente C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> para o substrato ATP para as etapas rápida (●) e lenta (○).

**Tabela II.** Valores termodinâmicos de inativação da Na,K-ATPase solubilizada com detergente C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> para os substratos ATP e pNFF. Os valores foram obtidos a partir das Figuras 11C e 11D, conforme descrito no item 3.8 de Material e Métodos.

<b>Substrato</b>	<b>Etapa</b>	<b>E<sub>a</sub> (kcal)</b>	<b>ΔS° (kcal.mol<sup>-1</sup>)</b>	<b>ΔH° (kcal.mol<sup>-1</sup>)</b>	<b>ΔG° (kcal.mol<sup>-1</sup>)</b>
<b>ATP</b>	<i>Rápida</i>	47,58	0,074	47,00	24,83
	<i>Lenta</i>	49,70	0,084	49,10	23,90
<b>pNFF</b>	<i>Rápida</i>	nd	nd	nd	nd
	<i>Lenta</i>	109,44	0,268	108,85	28,94

nd: não determinado

Uma comparação destes resultados descritos aqui pode ser feita com o trabalho realizado por Jorgensen e Andersen (1985). A partir da enzima obtida de rim de porco, eles realizaram um estudo de inativação térmica comparativo entre a enzima de membrana e a solubilizada também na presença do detergente C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>, na forma αβ, e ainda compararam as formas da enzima nos estados E1 e E2, utilizando em todos os casos o substrato ATP. Eles observaram que a inativação ocorre de uma maneira mais rápida para o caso da enzima na forma E1, pois

tanto a entalpia quanto a entropia de ativação foram maiores na forma E2 na presença de potássio que na forma E1 na presença de potássio, principalmente no caso da enzima solubilizada. Vale ressaltar que nos resultados aqui obtidos a enzima se encontra na presença de excesso de potássio, portanto está preferencialmente na forma E2, o que explica a similaridade no caso da enzima solubilizada com os resultados apresentados por Jorgensen e Andersen (1985).

No contexto de estrutura protéica, o termo estabilidade pode ser definido como sendo a tendência à manutenção de uma conformação nativa. Uma dada cadeia polipeptídica pode assumir, teoricamente, incontáveis conformações distintas e, como resultado disso, o estado desenovelado de uma proteína é caracterizado por um elevado grau de entropia conformacional. Essa entropia e as interações por meio das ligações de hidrogênio entre os diversos grupos da cadeia polipeptídica e o solvente tendem a manter o estado desenovelado. As interações químicas que se contrapõem a esses efeitos e estabilizam a conformação nativa incluem a ligação dissulfeto e as interações fracas (não covalentes): as ligações de hidrogênio e as interações hidrofóbicas bem como as iônicas. Uma apreciação do papel dessas interações fracas é especialmente importante para o entendimento de como as cadeias polipeptídicas dobram-se em estruturas secundárias e terciárias específicas, e combinam-se com outras proteínas para formar estruturas quaternárias (Nelson e Cox, 2002). Assim, existe uma grande dificuldade na interpretação dos resultados de  $\Delta H$  e  $\Delta G$ , pois ambos representam uma

soma das muitas diferentes contribuições de interações proteína-proteína, proteína-solvente e solvente-solvente (Seghal e Otzen, 2006).

De acordo com a literatura, o  $\Delta G$  que separa os estados enovelado e desenovelado em proteínas solúveis típicas sob condições fisiológicas se situa na faixa de apenas 5 a 15 kcal.mol<sup>-1</sup> (Nelson e Cox, 2002). Jaenicke (1999) também obteve resultados semelhantes, com  $\Delta G^\circ$  de aproximadamente 10 kcal.mol<sup>-1</sup> como resultado geral para numerosas proteínas globulares, em concordância com medidas diretas de funções termodinâmicas, aplicando experimentos de calorimetria. Já para trabalhos de desnaturação realizados com proteínas diméricas, os valores de  $\Delta G$  encontrados se situam na faixa de 25 kcal.mol<sup>-1</sup>, o qual está em concordância com os resultados apresentados para a Na,K-ATPase tanto solubilizada quanto inserida em lipossomos de DPPC:DPPE.

O resultado do exame de valores termodinâmicos revela uma diferença fundamental entre proteínas solúveis e de membrana: os elementos da estrutura secundária intrabicaçada das proteínas de membrana são altamente estáveis e resistem ao desenovelamento térmico, enquanto que suas regiões extramembrana têm um comportamento similar ao de proteínas solúveis (Almansa et al., 2003; Rigos et al., 2006). Vários autores postularam que a menor entalpia de desnaturação medida para proteínas de membrana em comparação a proteínas solúveis é um indicativo de um incompleto desenovelamento (Minetti e Remeta 2006). Por exemplo, a estabilidade conformacional da bacteriorodopsina (uma proteína de membrana usada como sistema modelo por muitos autores) foi estudada através de calorimetria, e foi encontrado um valor de entalpia



de  $110 \text{ kcal.mol}^{-1}$ , valor este menor do que os referentes a proteínas solúveis ( $\Delta H \approx 350 \text{ kcal.mol}^{-1}$ ), conforme descrito por Haltia e Freire (1995) e Pyrpasopoulos et al. (2006). De fato, análises baseadas somente na porção solúvel destas proteínas fornecem maior concordância com a magnitude do  $\Delta H$  esperado para proteínas solúveis (Minetti e Remeta, 2006).

Assim, este incompleto desenovelamento observado vem em concordância com os resultados da desnaturação térmica, uma vez que ocorre uma completa perda de atividade, mas não de estrutura secundária da Na,K-ATPase em lipossomos.

Portanto, quando são comparados os valores obtidos de  $\Delta H$  e  $\Delta G$  para as proteínas de membrana e solúveis percebe-se que é necessária uma menor energia para a desnaturação destas últimas (apresentam, de uma maneira geral, menores valores de  $\Delta G$  e maiores de  $\Delta H$ ), o que indica que as forças que estabilizam as proteínas de membrana são mais difíceis de serem rompidas.

Diferenças significativas são descritas a respeito das forças que estabilizam proteínas de membrana em relação a proteínas solúveis. Especificamente, o efeito hidrofóbico que representa uma força típica estabilizadora em proteínas solúveis, não contribui significativamente para o enovelamento dentro da bicamada lipídica. Ao invés disso, as forças predominantes de estabilidade de proteínas de membrana vêm das interações de van der Waals de cadeias laterais apolares (De Grado et al., 2003; Minetti e Remeta, 2006).

#### **4.1.4 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)**

A técnica de DSC foi utilizada para estudos estruturais da Na,K-ATPase solubilizada e purificada na forma  $(\alpha\beta)_2$ , para o proteolipossomo formado de DPPC:DPPE e ainda para esse proteolipossomo previamente tratado com tripsina. Também foram realizados experimentos de calorimetria diferencial para o lipossomo formado por DPPC:DPPE, a fim de se verificar os valores de  $\Delta G$   $\Delta H$  obtidos através desse estudo e compara-los com os obtidos através da cinética enzimática.

Os resultados obtidos através dessa técnica podem ser utilizados para o estudo do mecanismo de desnaturação de proteínas, e fornecem informações sobre a organização estrutural e interações dos domínios cooperativos. Baseado nos valores de DSC, a análise termodinâmica permite a elucidação de características da estrutura terciária de proteínas e ainda a determinação das contribuições de interações que mantêm a estabilidade da estrutura nativa (Grinberg et al., 2001).

Na Figura 12A são mostrados os perfil de DSC obtidos para a Na,K-ATPase purificada, com uma variação de temperatura de 20 a 90°C. Conforme se pode observar, a desconvolução do espectro resulta em 3 picos, indicando que a enzima apresenta uma desnaturação que envolve três transições de seus domínios cooperativos, com temperaturas de 54,7; 64,7 e 67,8°C. Quando a amostra é submetida a um segundo ciclo (Figura 12B), ela passa a apresentar somente um pico de transição, com temperatura de 67,2°C, podendo esse corresponder à transição do terceiro pico obtido para o 1° ciclo da enzima solubilizada (Figura 12A). Portanto, a transição representada por esse pico pode ser considerada um processo

reversível, enquanto que os outros dois picos correspondem a processos irreversíveis.

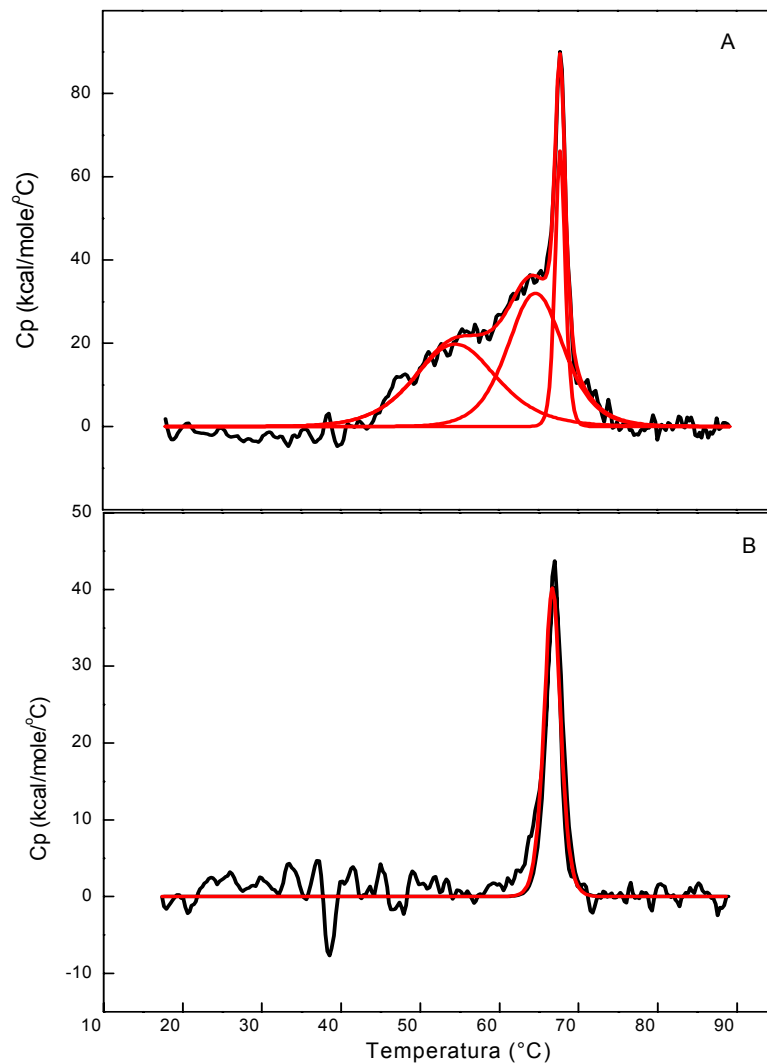
Recentemente, a DSC foi usada para estudos de desnaturação térmica de proteínas com multisubunidades heterólogas, como bacteriorodopsina, citocromo c oxidase e porinas (Brouillette et al., 1987; Kanh et al., 1992; Haltia et al., 1994), ou ainda proteínas de membrana, como a Ca,ATPase e H,K-ATPase (Lepock et al., 1990; Gasset et al., 1997), além da Na,K-ATPase de rim de porco (Grinberg et al., 2001).

Grinberg et al. (2001) também encontraram três picos para a análise calorimétrica da Na,K-ATPase, com temperaturas de 43,0; 54,5 e 58,5°C. Os menores valores de temperaturas de transição dos picos calorimétricos encontrados nesse trabalho pode ser decorrente do fato de que nesses estudos não estava presente no meio o íon K<sup>+</sup>, que conforme já discutido é descrito estabilizar a Na,K-ATPase (Jorgensen e Andersen, 1986; Donnet et al., 2001). De acordo com esses autores, a assimetria observada nos picos sugere que o desenovelamento da Na,K-ATPase é complexo na sua caracterização. A presença de um pico complexo pode ser a soma de diversos picos, correspondendo tanto a uma sucessiva transição dentro da própria molécula de proteína como a um simples sistema cooperativo ou ainda transições independentes dos seus domínios cooperativos. A última explicação é a mais comum de ocorrer, principalmente com proteínas oligoméricas. Eles descreveram ainda que os picos 1 e 3 podem ser relacionados à subunidade  $\alpha$  e ainda que o segundo pico seja decorrente de perda de estrutura da subunidade  $\beta$ .

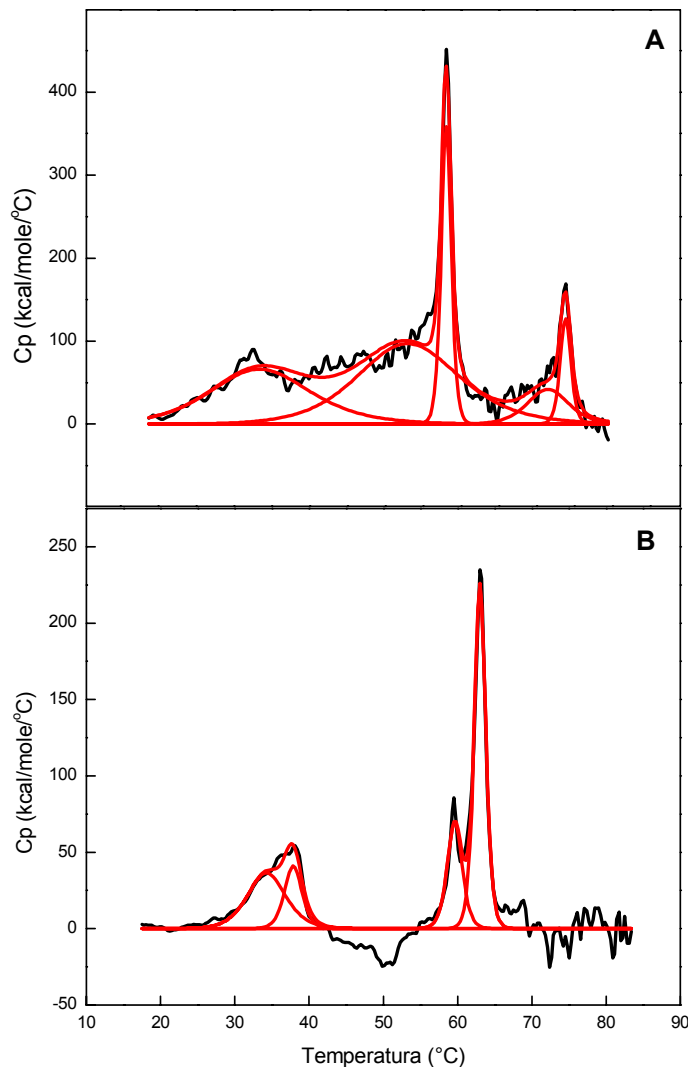
Já Gasset et al. (1997) obtiveram dois picos de capacidade calorífica a 53,9 e 61,8°C para a H,K-ATPase. A interpretação dos autores foi a de que ambos sinais observados foram decorrentes das alças citoplasmáticas da subunidade  $\alpha$ .

Para entender o mecanismo que leva à inativação da enzima, e ainda considerando-se que a proteína na sua forma purificada pode ter diferenças estruturais em relação à inserida na membrana, realizamos os estudos calorimétricos da Na,K-ATPase inserida em sistemas de DPPC:DPPE, obtido conforme descrito nos itens 3.5 e 3.6 de Material e Métodos, para assim comparar os resultados estruturais obtidos para esses dois sistemas distintos. Conforme se pode observar a partir da Figura 13A, a presença do pico correspondente ao terceiro da enzima purificada se mantém claramente ( $T=68^{\circ}\text{C}$ ), enquanto que ocorre o aparecimento de um pico à temperatura de  $83,8^{\circ}\text{C}$ . As transições observadas a menores temperaturas podem ser atribuídas aos lipídios do proteolipossomo (Cevic e Marsh, 1987), sendo que essas transições se mantêm no segundo ciclo de desnaturação, bem como o pico com transição em  $67,6^{\circ}\text{C}$  (Figura 13B).

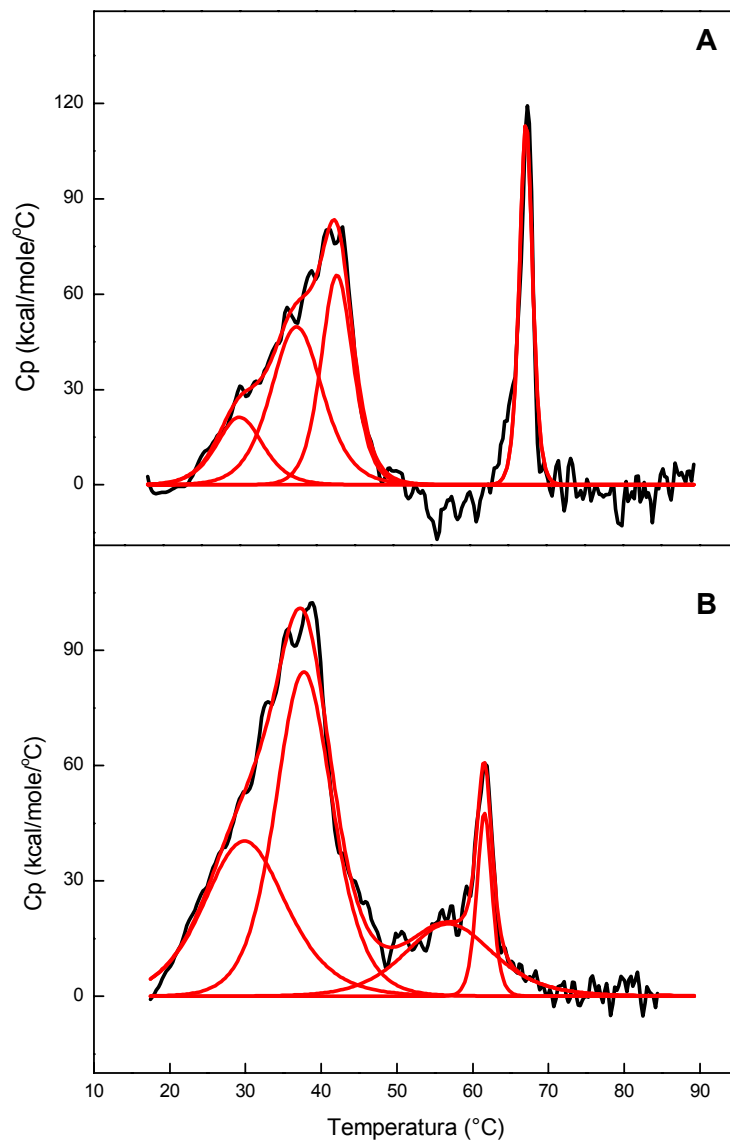
Para então se averiguar quais transições são consequência de segmentos transmembrana e quais podem ser relacionadas com as alças em que se encontram os sítios de ligação do substrato ATP bem como de fosforilação e do transporte dos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , foi realizado o tratamento do proteolipossomo com tripsina. Esta protease cliva as alças externas em vesículas *right side out*, correspondentes à região citoplasmática quando a enzima está inserida em uma membrana plasmática (Donnet et al., 2001).



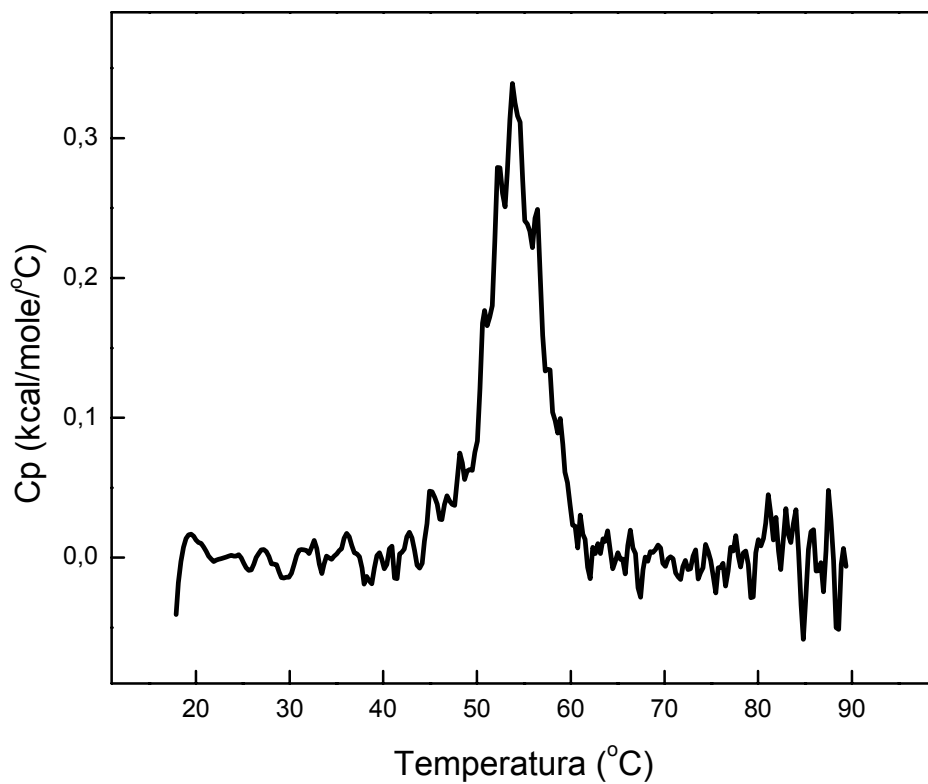
**Figura 12.** Primeiro (A) e segundo (B) ciclos da calorimetria da Na,K-ATPase purificada na forma  $(\alpha\beta)_2$  realizados em tampão Tris.HCl 5 mmol.L $^{-1}$ , pH 7,0, contendo EDTA 1 mmol.L $^{-1}$ , KCl 150 mmol.L $^{-1}$  e C $_{12}$ E $_8$  0,005 mg.mL $^{-1}$ , conforme descrito no item 3.13 de Material e Métodos. No gráfico estão mostrados os valores experimentais obtidos (—) e a melhor análise de desconvolução dos picos (—).



**Figura 13.** Primeiro (A) e segundo (B) ciclos da calorimetria do proteolipossomo de DPPC:DPPE E Na,K-ATPase, realizados em tampão Tris.HCl 5 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,0, contendo EDTA 1 mmol.L<sup>-1</sup>e KCl 150 mmol.L<sup>-1</sup>, conforme descrito no item 3.13 de Material e Métodos. No gráfico estão mostrados os valores experimentais obtidos (—) e a melhor análise de desconvolução dos picos (—).



**Figura 14.** Primeiro (A) e segundo (B) ciclos da calorimetria do proteolipossomo de DPPC:DPPE e Na,K-ATPase tratado com tripsina, realizados em tampão Tris.HCl 5 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,0, contendo EDTA 1 mmol.L<sup>-1</sup> e KCl 150 mmol.L<sup>-1</sup>, conforme descrito no item 3.13 de Material e Métodos. No gráfico estão mostrados os valores experimentais obtidos (—) e a melhor análise de desconvolução dos picos (—).



**Figura 15.** Calorimetria do lipossomo de DPPC:DPPE em tampão Tris.HCl 5 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,0, contendo EDTA 1 mmol.L<sup>-1</sup> e KCl 150 mmol.L<sup>-1</sup>, conforme descrito no item 3.13 de Material e Métodos. No gráfico estão mostrados os valores experimentais obtidos (—).



Na Figura 14A está apresentada a curva calorimétrica para o proteolipossomo clivado com tripsina. Novamente, ocorre o pico de transição calorimétrica em 67,4°C, enquanto que os picos decorrentes do aumento de temperatura na faixa de 20 a 50°C são atribuídos a transições de lipídios. Neste caso, para o segundo ciclo ocorre uma visível diminuição da intensidade do pico correspondente à proteína, com uma pequena redução também da temperatura (1°C), que passou para 66,4°C. (Figura 14B).

Com base nesses resultados, o primeiro pico de transição calorimétrica pode ser relacionado à separação das subunidades do protômero  $\alpha\beta$ . Uma vez que as subunidades estão separadas, é descrito ocorrer um processo de agregação da subunidade  $\alpha$ , conforme já discutido por alguns autores (Jorgensen e Andersen, 1985; Donnet et al., 2001), processo esse que pode ser caracterizado pelo segundo pico calorimétrico. A essa temperatura (64,73°C para a Na,K-ATPase solubilizada, conforme já mostrado nas Figuras 2 e 4), a enzima não possui atividade, sendo então completamente inativa. Esses dois processos são descritos serem irreversíveis, uma vez que não aparecem no segundo ciclo de inativação térmica analisada nesses experimentos. Já o terceiro pico calorimétrico mostrou ser decorrente de um processo reversível, e pode ser relacionado a um rearranjo das hélices transmembrana: uma vez que essas estruturas são extremamente estáveis, quando se tem uma redução da temperatura, elas voltam à conformação nativa.

A fim de comparar os resultados calorimétricos da transição dos lipossomos, foi realizado um experimento utilizando somente a preparação

de um lipossomo de DPPC:DPPE (Figura 15). Pode-se observar claramente que a presença da proteína altera a temperatura e o perfil de transição dos lipídios, apresentado no caso do lipossomo como uma transição com temperatura de 53,8°C.

Entretanto, estudos complementares de calorimetria são necessários para uma completa discussão dos mecanismos que levam à presença dos picos obtidos, como por exemplo a presença de substratos e ainda de diferentes íons no meio.

#### **4.1.5 Fluorescência intrínseca de triptofano**

A técnica de fluorescência fornece uma maior compreensão de toda a informação, desde a cinética à termodinâmica, sobre o conjunto, estrutura, função e regulação de proteínas de membrana. Pela correlação dos dados espectrais com os estados estruturais e funcionais específicos, pode-se obter diretamente e sem ambigüidade informações sobre estrutura, interações e mecanismos pelos quais as proteínas de membrana realizam suas funções (Johnson, 2005).

Além disso, os parâmetros espectrais da fluorescência de triptofano como posição, forma e intensidade são dependentes de propriedades eletrônicas e dinâmicas do ambiente cromóforo. A modificação do microambiente nos resíduos de triptofano tem sido estudada para avaliar mudanças na intensidade e comprimento de onda no pico de absorção máxima em espectros de fluorescência (Lakowicz, 1983; Akhtar, 2002).

Nas condições de excitação de 295 nm e emissão de 300 a 400 nm, foi determinada em qual faixa de concentração a Na,K-ATPase apresenta

uma intensidade de emissão máxima que pode ser aplicada em estudos de desnaturação. Para isso foi realizado um gradiente de concentração de proteína solubilizada e purificada conforme descrito no item 3.12.1 de Material e Métodos (Figura 16). Na inserção da Figura 16 é mostrada a curva obtida da intensidade de emissão de fluorescência em 340 nm em função da concentração de proteína, e aparentemente a fluorescência é diretamente proporcional à variação de concentração de proteína utilizada.

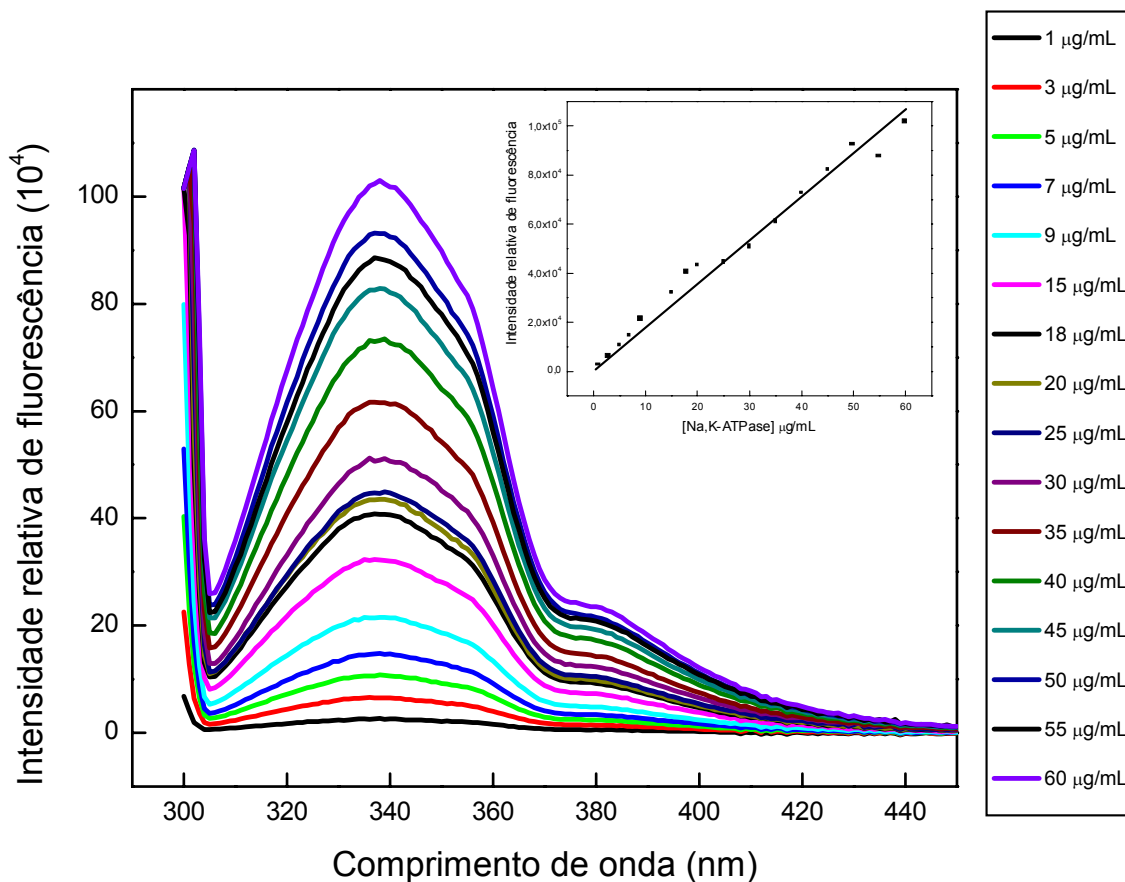
Em um primeiro experimento, foi realizada a fluorescência da Na,K-ATPase solubilizada e purificada na forma  $(\alpha\beta)_2$  (Figura 17) em função da variação da temperatura. Como pode ser observado, as mudanças no comprimento de onda do pico máximo de emissão foram de 339 a 343 nm. Ainda, foi constatado que, conforme se tem um aumento na temperatura (34 a 80°C), se observa uma diminuição nos valores de intensidade relativa de emissão de fluorescência (Figura 20A), que diminui 72% em relação ao valor encontrado para a medida realizada na temperatura de 34°C (100%).

Já para as medidas de emissão de fluorescência da Na,K-ATPase reconstituída em sistemas de DPPC:DPPE (Figura 18) foi determinado que, com o aumento da temperatura de 23 a 80°C, a intensidade relativa de fluorescência diminui para cerca de 30% do valor inicial. Porém, para essa amostra, foi observado um aumento no valor de comprimento de onda para a intensidade máxima de fluorescência. Esse valor foi de 337 nm até 349 nm, conforme se varia a temperatura nos valores já descritos anteriormente (Figura 20B).

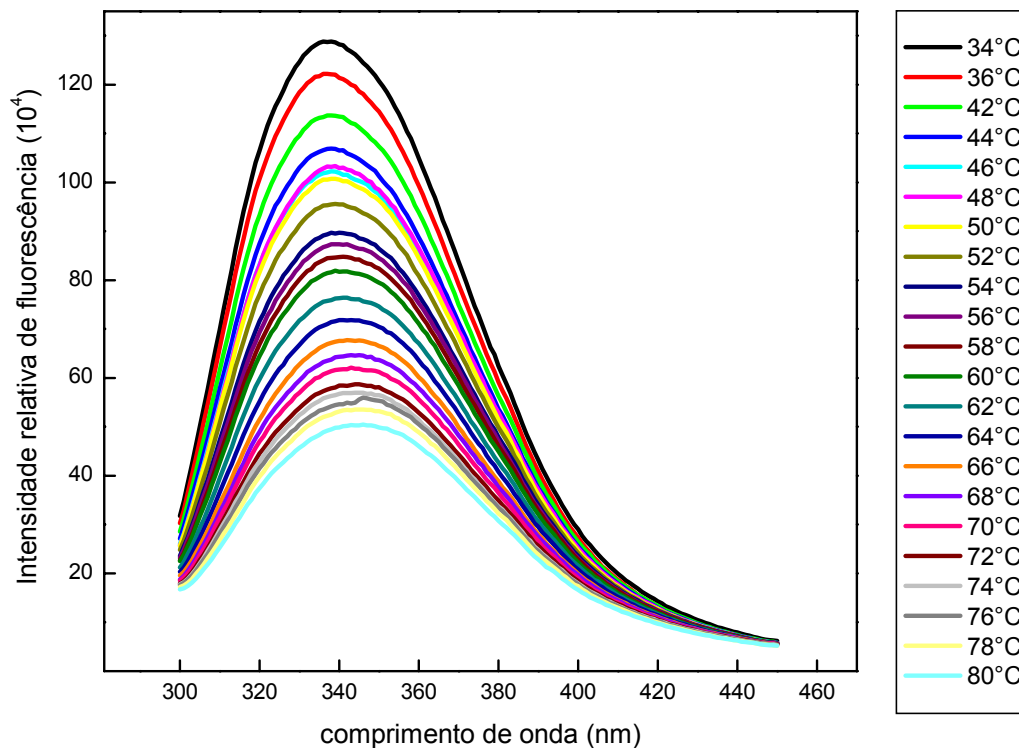
Finalmente, para o caso do proteolipossomo previamente tratado com tripsina, o intervalo de temperaturas na qual foram realizadas as medidas de emissão de fluorescência foi de 28 a 80°C, e esse aumento na temperatura resultou em uma diminuição de 78% nos valores de intensidade relativa de fluorescência (Figura 19). Também nesse caso foi observada uma mudança para maiores comprimentos de onda do pico máximo de emissão.

É descrito na literatura que a Na,K-ATPase é composta de 11 resíduos de triptofano, sendo que 3 desses estão localizados nos segmentos transmembrana, 4 estão nas alças extracelulares, e ainda nas alças intracelulares existem outros 4 resíduos (Vasilets e Schwarz, 1993). Assim, mesmo com a retirada do loop intracelular (com o tratamento com tripsina), a enzima ainda apresenta fluorescência intrínseca desse aminoácido.

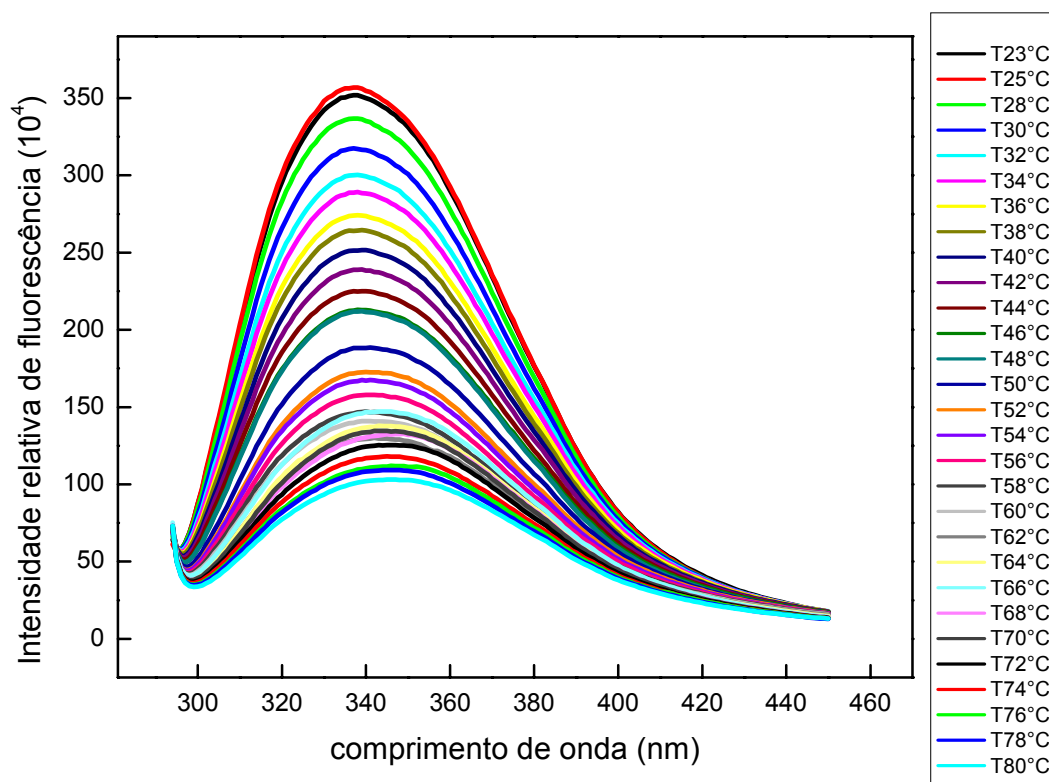
Uma variação considerável no comprimento de onda do pico de emissão máxima de fluorescência é observada acima de 60°C tanto para a enzima solubilizada quanto para o proteolipossomo. Esse tipo de mudança indica que os resíduos de triptofano estão menos expostos ao ambiente aquoso em relação à estrutura analisada à temperatura ambiente.



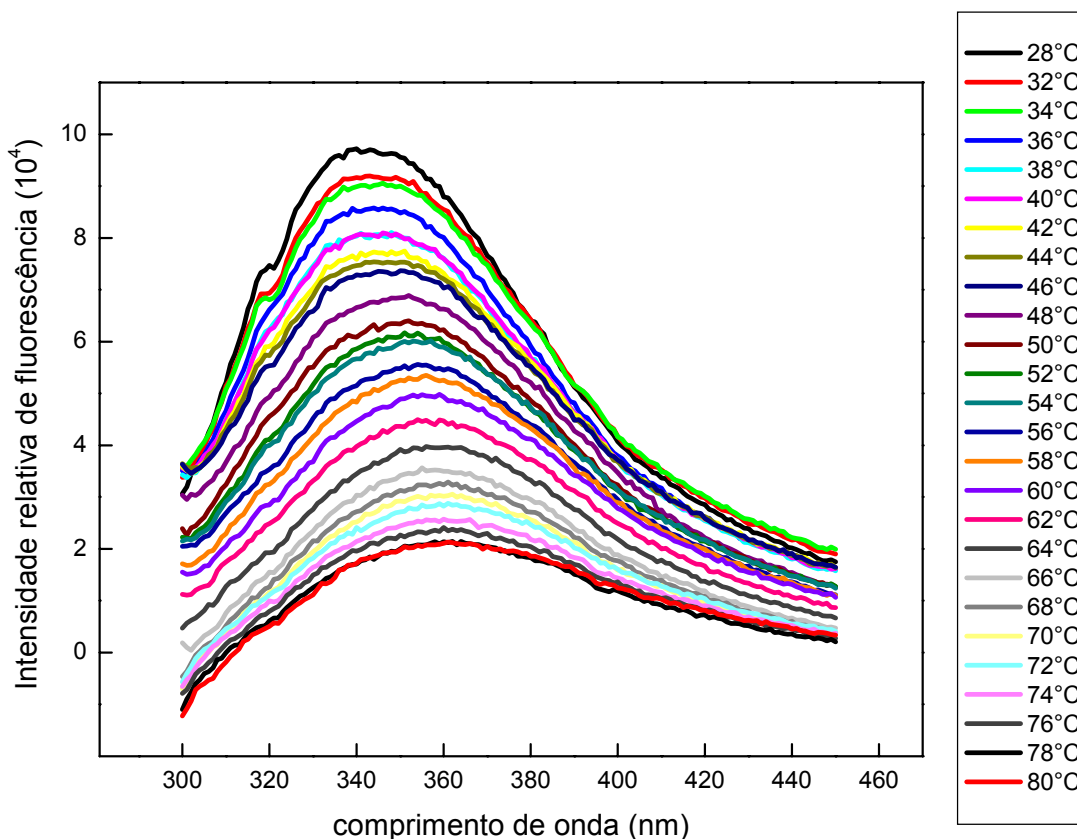
**Figura 16.** Espectros de fluorescência em função da variação da concentração da Na,K-ATPase solubilizada (1,0 a 60,0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Os espectros foram obtidos em tampão Tris.HCl 5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 7,0, contendo EDTA 1  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , KCl 150  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  e  $\text{C}_{12}\text{E}_8$  0,005  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , conforme descrito no item 3.12.1 de Material e Métodos. **Inserção.** Valores de fluorescência em 340 nm em função da variação da concentração de Na,K-ATPase solubilizada.



**Figura 17.** Espectros de fluorescência da Na,K-ATPase solubilizada e purificada, conforme descrito no item 3.12.2 de Material e Métodos, em função da variação da temperatura (34 a 80°C). Os espectros foram obtidos em tampão Tris.HCl 5 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,0, contendo EDTA 1 mmol.L<sup>-1</sup>, KCl 150 mmol.L<sup>-1</sup> e 0,005 mg.mL<sup>-1</sup> de C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> empregando-se uma cubeta de 0,1 cm de passo óptico.

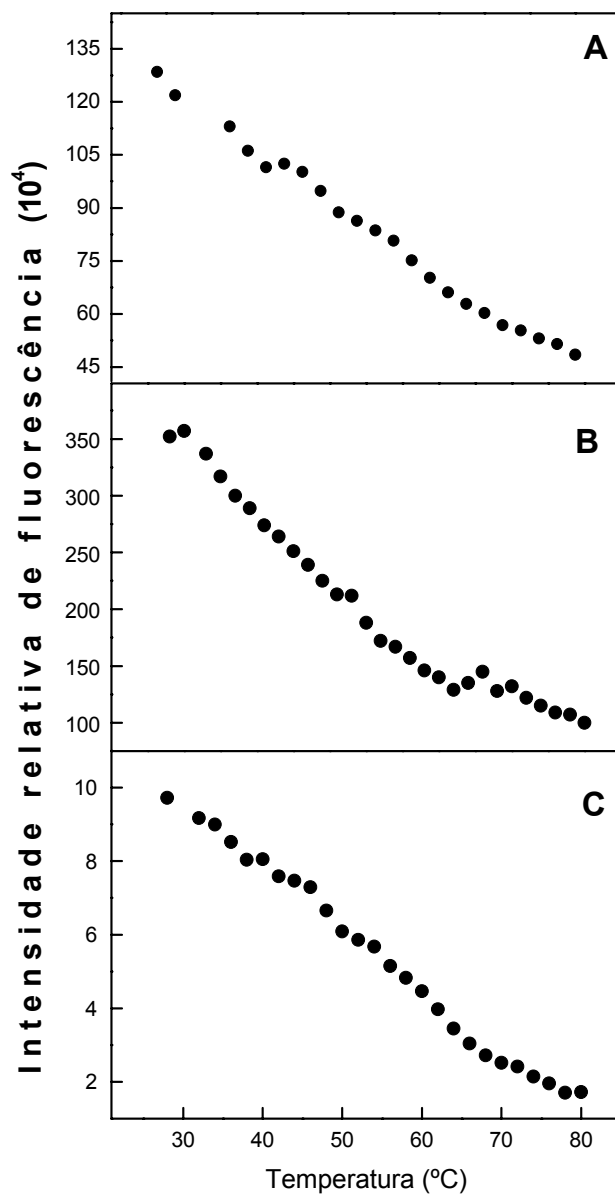


**Figura 18.** Espectros de fluorescência da Na,K-ATPase reconstituída em lipossomos de DPPC:DPPE (1:1), conforme descrito no item 3.12.2 de Material e Métodos, em função da variação da temperatura (23 a 80°C). Os espectros foram obtidos em tampão Tris.HCl 5 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,0, contendo EDTA 1 mmol.L<sup>-1</sup> e KCl 150 mmol.L<sup>-1</sup>, empregando-se uma cubeta de 0,1 cm de passo óptico.



**Figura 19.** Espectros de fluorescência da Na,K-ATPase reconstituída em lipossomos de DPPC:DPPE (1:1), tratada com tripsina conforme descrito no item 3.12.2 de Material e Métodos, em função da variação da temperatura (28 a 80°C). Os espectros foram obtidos em tampão Tris.HCl 5 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,0, contendo EDTA 1 mmol.L<sup>-1</sup>, KCl 150 mmol.L<sup>-1</sup>, empregando-se uma cubeta de 0,1 cm de passo óptico.





**Figura 20.** Intensidades relativas de fluorescência para os picos máximos de emissão em: 336 nm para a Na,K-ATPase purificada em função da variação da temperatura (A), 337 nm para a Na,K-ATPase reconstituída em lipossomos de DPPC:DPPE (B) e 337 nm para a Na,K-ATPase reconstituída em lipossomos de DPPC:DPPE tratado com tripsina (C). Os valores foram obtidos a partir dos espectros de fluorescência mostrados nas Figuras 17, 18 e 19.

#### **4.1.6 Mecanismo de desnaturação da Na,K-ATPase pela ação da temperatura**

De acordo com os resultados apresentados de dicroísmo circular, infravermelho, calorimetria e fluorescência, aliados aos de atividade ATPase e pNFFase, pode ser proposto um modelo para o mecanismo de desnaturação da Na,K-ATPase (Esquema II). A enzima se apresenta inicialmente na forma  $(\alpha\beta)_2$ , e perde sua atividade quando ocorre a separação das subunidades. Com isso, ocorre um processo de agregação das subunidades  $\alpha$ , conforme se pode observar por infravermelho. Vale a pena ressaltar que estudos de cinética previamente realizados sugerem fortemente que, nos sistemas de lipossomos DPPC:DPPE, a Na,K-ATPase encontra-se também na forma  $(\alpha\beta)_2$ . Esta observação se deve ao estudo comparativo realizado com a enzima solubilizada, mostrando que o efeito de íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , e ainda dos substratos ATP e pNFF apresentam praticamente o mesmo comportamento para os dois sistemas (Santos et al., 2002; 2006). Portanto, de acordo com os estudos realizados nesse trabalho, o mecanismo proposto pode ser aplicado tanto à Na,K-ATPase solubilizada com  $\text{C}_{12}\text{E}_8$  quanto na reconstituída em sistemas de lipossomos constituídos de DPPC:DPPE.

A separação dos protômeros  $\alpha\beta$  na estrutura oligomérica provavelmente ocorre à 35°C, temperatura essa referente à primeira transição na perda de atividade da enzima solubilizada.

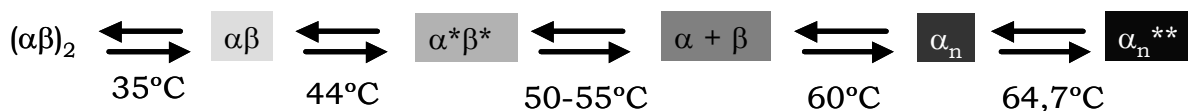
Tanto o dicroísmo quanto o infravermelho mostraram um ponto de desenovelamento à 44°C, o que mostra que nessa temperatura a enzima perde estrutura secundária, porém somente correspondendo a uma perda

total de 25%. Isso indica essa perda de estrutura, ainda que representada por pouca variação percentual, é fundamental para a próxima etapa no processo de desnaturação.

Na seqüência, a transição representada pela faixa de temperatura de 50 a 55°C pode ser classificada como de extrema importância dentro do mecanismo de desnaturação da Na,K-ATPase, uma vez que representa o primeiro pico de transição da calorimetria, além de estar na segunda transição de temperatura da perda de atividade da enzima.

Já a temperatura de 60°C é destacada como a da perda completa de atividade. Nessa temperatura ocorre a agregação da enzima, através de interações nos loops citoplasmáticos da subunidade  $\alpha$ , o que é mostrado pelas técnicas de infravermelho, fluorescência e ainda calorimetria.

Finalmente, a partir dos dados de calorimetria, na temperatura de 67,8°C (correspondente ao terceiro pico), a transição pode ser devido a uma alteração na conformação das hélices transmembrana, uma vez que essas são muito estáveis e portanto aparecem como sendo um processo reversível.



**Esquema II.** Modelo de desenovelamento da Na,K-ATPase proposto a partir da desnaturação térmica analisada por dicroísmo circular, fluorescência, calorimetria, infravermelho e atividades ATPase e pNFFase. A graduação de cinza mostrada representa a perda de atividade durante o processo (fundo branco mais ativo, preto inativo).

#### **4.2 Efeito do cloreto de guanidina na Na,K-ATPase solubilizada**

Processos que ocorrem nas membranas são essenciais para a viabilidade de toda a célula, mas estes processos são pouco compreendidos no nível molecular. A natureza e propriedades físicas complexas dos componentes moleculares envolvidos restringem os experimentos que podem ser aplicados para examinar a estrutura, variações conformacionais e interações das proteínas com os lipídios da membrana que acompanham estes processos (Johnson, 2005).

Para modificar o microambiente protéico que leva à perda da estrutura, foi utilizado o agente químico cloreto de guanidina (GdmCl), um dos mais poderosos sais desnaturantes, sendo comumente usado para desenovelar proteínas nativas, já que se trata de um sal monovalente que possui efeitos iônico e caotrópico (Mayr e Schmid, 1993). A análise das curvas de desnaturação pode indicar uma medida da estabilidade conformacional da proteína (Akhtar, 2002; Shukla et al., 2005).

Assim, primeiramente foi realizado um experimento de estabilidade da enzima a  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  na presença de  $3 \text{ mol.L}^{-1}$  de cloreto de guanidina (Inserção da Figura 22). Nesta concentração, a enzima perde cerca de 90% da atividade ATPase quando comparada à ausência de agente desnaturante (Rigos et al., 2003). Através da análise da curva apresentada pode-se constatar que, após 11 horas de incubação da proteína na presença do cloreto de guanidina, a intensidade de fluorescência foi reduzida em cerca de 4 vezes, um bom indicativo de que o agente desnaturante já entrou em estabilidade com a proteína. Para o completo efeito deste agente, nas análises de fluorescência a proteína foi mantida

em incubação com as diferentes concentrações de cloreto de guanidina durante 24 horas.

A incubação da Na,K-ATPase ( $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) na presença de concentrações crescentes de cloreto de guanidina ( $0 - 6 \text{ mol.L}^{-1}$ ) em tampão Tris.HCl  $5 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 7,0, contendo EDTA  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$ , KCl  $150 \text{ mmol.L}^{-1}$  e  $\text{C}_{12}\text{E}_8$   $0,005 \text{ mg.mL}^{-1}$ , por 24 h a  $25^\circ\text{C}$  resultou em espectros de fluorescência que podem ser observados nas Figuras 21 e 22. Como pode ser visto na Figura 21, baixas concentrações de guanidina ( $0,005$  a  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ ) não afetam significativamente a emissão de fluorescência, entretanto altas concentrações deste agente ( $1$  a  $6 \text{ mol.L}^{-1}$ ) levam a um aumento da intensidade de fluorescência, além de apresentar o efeito de “red shifts” (deslocamento do pico de emissão máximo para maiores comprimentos de onda) (Figura 22).

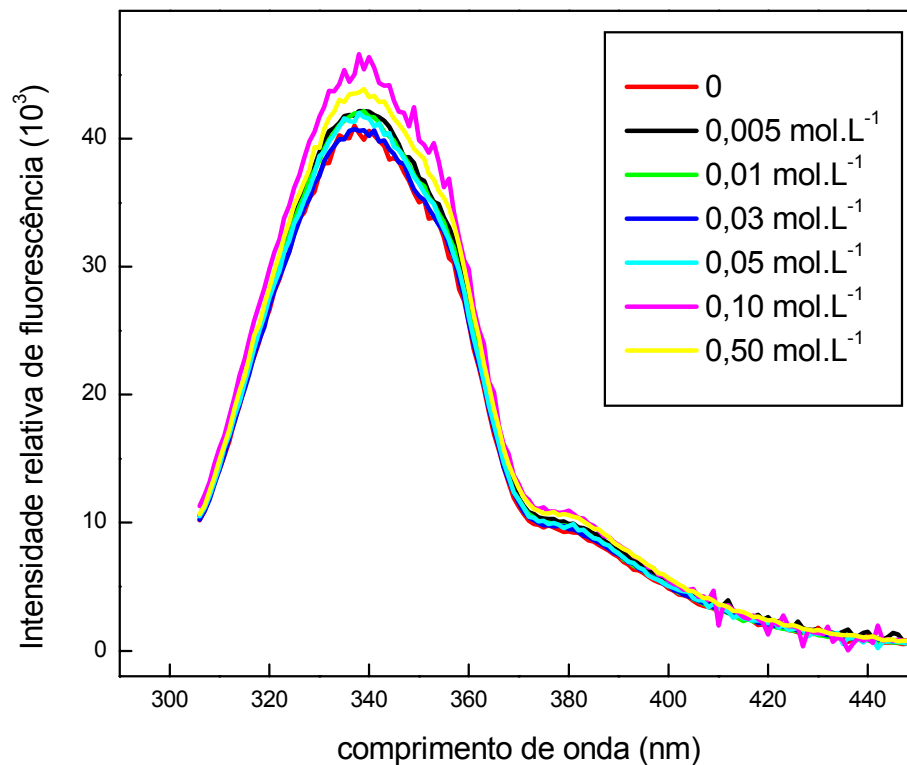
Podem ser realizados dois tipos de ajustes a partir dos valores obtidos nos espectros da Na,K-ATPase solubilizada na presença de concentrações crescentes de cloreto de guanidina. O primeiro destes é o gráfico da intensidade de fluorescência em função do aumento da concentração de cloreto de guanidina para o comprimento de onda fixo de  $337 \text{ nm}$ , sendo este escolhido por ser o pico máximo de emissão dos resíduos de triptofano da enzima na ausência do agente desnaturante (resultados não mostrados). Neste caso, existe uma diminuição nos valores de intensidade de fluorescência. Isto ocorre devido ao deslocamento dos picos para a região de maiores comprimentos de onda. Assim, foi construído um gráfico da intensidade de fluorescência em função da concentração de cloreto de guanidina, considerando-se o

deslocamento do pico de emissão máxima. Conforme se emprega maiores concentrações de cloreto de guanidina, ocorre um aumento na intensidade de fluorescência (Figura 23). Para uma concentração de guanidina de 3 mol.L<sup>-1</sup>, este aumento é de quase 20% quando comparado com a intensidade na ausência de agente desnaturante, sendo ainda que o pico de emissão máxima foi deslocado para 353 nm na presença desta mesma concentração, representando uma mudança de 16 nm. O deslocamento do pico de emissão máxima para maiores comprimentos de onda é um indicativo de que os resíduos de triptofano apresentam uma maior exposição ao ambiente do solvente conforme se tem um aumento da concentração do agente desnaturante, o que é consistente com o completo desenovelamento da proteína (Lakowicz, 1983; Deva e Behere, 1999). Porém, o aumento nos valores de intensidade de fluorescência representa uma menor exposição do triptofano ao solvente (Lakowicz, 1983; Deva e Behere, 1999). Isto pode estar ocorrendo por uma supressão inicial dos resíduos de triptofano da Na,K-ATPase na ausência de agente desnaturante e, conforme se tem um aumento da concentração do cloreto de guanidina no meio, expõe-se os triptofanos ao meio aquoso, ao mesmo tempo em que este efeito supressor é reduzido por esta maior exposição.

Vários estudos já foram publicados em relação a mudanças na fluorescência de proteínas na presença do agente desnaturante cloreto de guanidina. Estes resultados podem estar tanto na forma de ajustes sigmóides, indicando processos de dois estados, quanto em outras formas, indicando a presença de intermediários (Popot e Engelman, 1990; Jaenicke, 1991; Deva e Behere, 1999; Gillespie e Plaxco, 2004). Como já

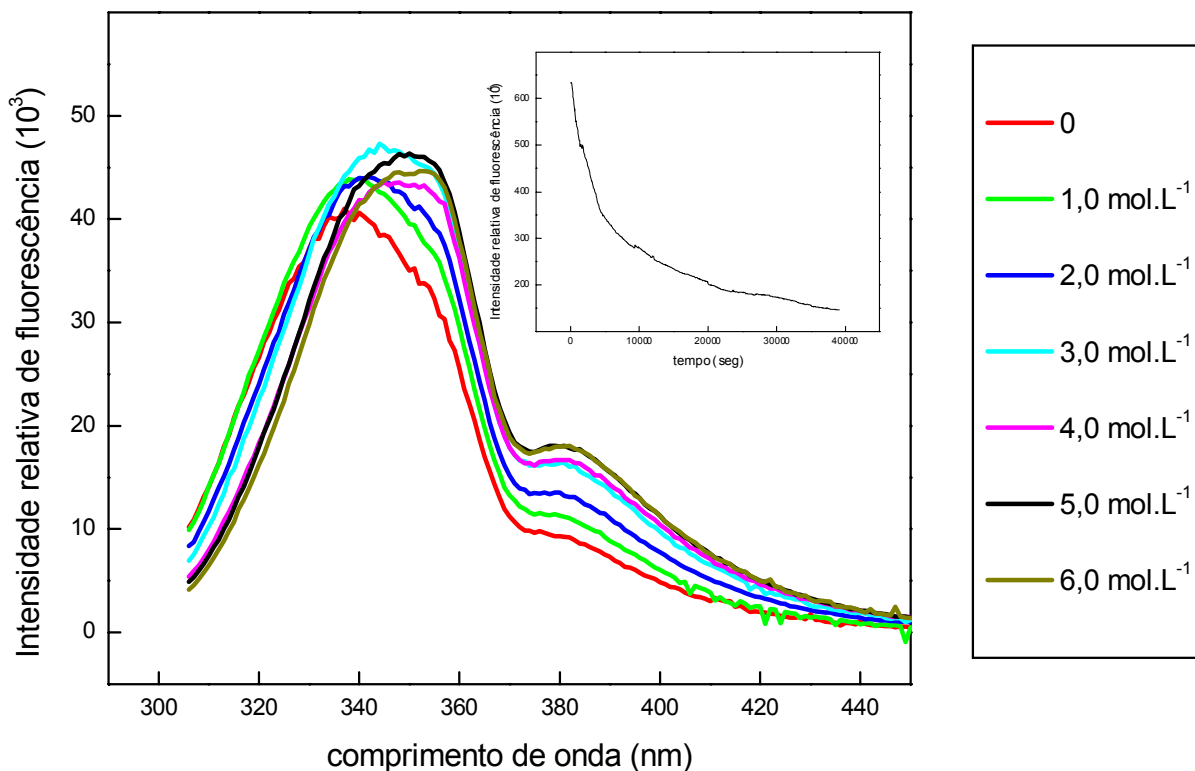
discutido, com a adição de 3 mol.L<sup>-1</sup> de cloreto de guanidina, a enzima apresenta uma redução de 90% de sua atividade, mostrando também um pico máximo de intensidade de fluorescência (Figura 23). Concentrações crescentes de cloreto de guanidina (6 mol.L<sup>-1</sup>) levam à total redução da atividade ATPase (Rigos et al., 2003), mostrando variações não lineares na intensidade de fluorescência, com o aparecimento de outro pico em 5 mol.L<sup>-1</sup> do agente desnaturante. Este é um indicativo da presença de dois intermediários durante a desnaturação da Na,K-ATPase em 3 mol.L<sup>-1</sup> e 5 mol.L<sup>-1</sup> de cloreto de guanidina.

Outros estudos também mostraram a ocorrência de intermediários nos processos de desnaturação na presença deste agente desnaturante. Por exemplo, Zhang et al. (2003) estudaram o efeito de cloreto de guanidina na fosfatase alcalina de intestino de bezerro através de estudos de fluorescência e ultravioleta e localizaram um intermediário na faixa de 1,6 e 2,6 mol.L<sup>-1</sup> de cloreto de guanidina. Abdalla e Hamed (2006) encontraram três estados de transição entre o dímero nativo e o monômero desnaturado de uma glutathion transferase em 0,7, 1,75 e 3,0 mol.L<sup>-1</sup> de cloreto de guanidina. Já um exemplo de ajuste sigmóide é descrito por Chiaraluce et al. (2002). Neste trabalho foi mostrado que enzimas que possuem estrutura secundária predominantemente em  $\beta$ -folha apresentam resistência maior à desnaturação por cloreto de guanidina, porém o tratamento realizado incluiu toda a faixa de comprimento de onda na qual se obtém o pico de emissão máxima, ao invés da utilização do comprimento de onda de emissão máxima para cada concentração de agente desnaturante.

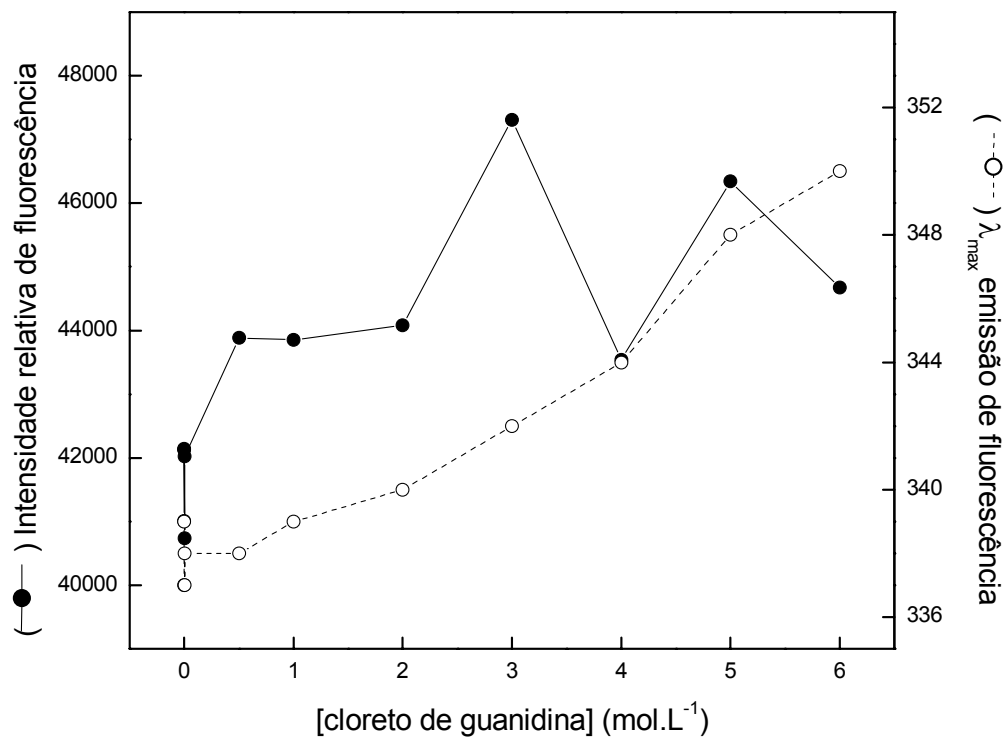


**Figura 21.** Espectros de fluorescência da Na,K-ATPase solubilizada em função da variação da concentração de cloreto de guanidina (0,005 a 0,5 M). Os espectros foram obtidos em tampão Tris.HCl 5 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,0, contendo EDTA 1 mmol.L<sup>-1</sup>, KCl 150 mmol.L<sup>-1</sup> e C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> 0,005 mg.mL<sup>-1</sup>, empregando-se uma cubeta de 1 cm de passo óptico a 25°C, conforme descrito no item 3.12.3 de Material e Métodos.





**Figura 22.** Espectros de fluorescência da Na,K-ATPase solubilizada em função da variação da concentração de cloreto de guanidina (1,0 a 6,0 mol.L<sup>-1</sup>). Os espectros foram obtidos em tampão Tris.HCl 5 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,0, contendo EDTA 1 mmol.L<sup>-1</sup>, KCl 150 mmol.L<sup>-1</sup> e C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> 0,005 mg.mL<sup>-1</sup>, empregando-se uma cubeta de 1 cm de passo óptico a 25°C, conforme descrito no item 3.12.3 de Material e Métodos. **Inserção.** Efeito do tempo na fluorescência da Na,K-ATPase (50 µg.mL<sup>-1</sup>) em 347 nm na presença de 3 mmol.L<sup>-1</sup> de cloreto de guanidina. A curva foi obtida em tampão Tris.HCl 5 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,0, contendo EDTA 1 mmol.L<sup>-1</sup>, KCl 150 mmol.L<sup>-1</sup> e C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> 0,005 mg.mL<sup>-1</sup>, empregando-se uma cubeta de 1 cm de passo óptico a 25°C.



**Figura 23.** Valores de emissão máxima de fluorescência para a Na,K-ATPase em função da variação da concentração de cloreto de guanidina, relacionando o comprimento de onda do pico máximo. Os valores foram obtidos dos espectros de fluorescência mostrados nas figuras 21 e 22.

Para ilustrar o comportamento na estrutura secundária da Na,K-ATPase solubilizada quando se adiciona cloreto de guanidina, foram realizados estudos de dicroísmo circular (Rigos, 2003), sendo que os espectros obtidos passaram por um processo de desconvolução, conforme descrito no item 3.11 de Material e Métodos. Os resultados estão apresentados na Tabela III. Apesar de terem sido realizados experimentos de dicroísmo circular da enzima na presença de até 7 mol.L<sup>-1</sup> do agente desnaturante (Rigos, 2003), a desconvolução dos espectros mostrou medidas de erro muito altas para concentrações de guanidina superiores a 1 mol.L<sup>-1</sup> (erros maiores de 5%), os quais foram descartados do gráfico. Na ausência do agente desnaturante, tem-se uma concentração de  $\alpha$ -hélice de cerca de 18%. Esta concentração aumenta levemente para 21% para 0,1 mol.L<sup>-1</sup> de guanidina e, quando a concentração de guanidina empregada é de 1 mol.L<sup>-1</sup>, a porcentagem da  $\alpha$ -hélice é reduzida para cerca de 11%. No caso da estrutura  $\beta$ -folha, observou-se que até a concentração do agente de 0,5 mol.L<sup>-1</sup> tem-se uma porcentagem desta estrutura secundária em torno de 26%. Com o aumento do cloreto de guanidina para 1 mol.L<sup>-1</sup>, ocorre uma redução da estrutura para 0%. Para as alças também se observou uma redução de sua estrutura apenas quando a concentração de guanidina atinge 1 mol.L<sup>-1</sup>, reduzindo sua porcentagem de 21% para cerca de 13%. Finalmente, as estruturas “ao acaso” também se mantêm constantes para concentrações de guanidina de até 0,5 mol.L<sup>-1</sup>, ocorrendo um considerável aumento desta estrutura quando a concentração do agente desnaturante é de 1 mol.L<sup>-1</sup>, passando a representar 56% da estrutura total da proteína.

**Tabela III.** Valores de estrutura secundária da Na,K-ATPase solubilizada e analisada por dicroísmo circular na presença de concentrações crescentes de cloreto de guanidina. Os espectros obtidos (resultados não mostrados) foram desconvolvidos conforme descrito no item 3.11 de Material e Métodos

[guanidina] (mol.L <sup>-1</sup> )	$\alpha$ -hélice	$\beta$ -folha	alças	Não ordenadas
0	18,0	27,6	21,3	33,3
0,0	20,9	26,7	21,2	31,2
0,5	22,4	25,2	20,0	32,3
1,0	11,3	0	13,2	56,4

Assim, com estes resultados pode ser definida uma seqüência de etapas que expliquem o mecanismo de desnaturação da enzima na presença de cloreto de guanidina. Primeiramente, através da análise de fluorescência a enzima apresenta duas transições de estrutura terciária, sendo a primeira provavelmente referente à separação dos protômeros, uma vez que a enzima solubilizada se apresenta na forma  $(\alpha\beta)_2$ , enquanto que a segunda etapa pode ser devido à separação das subunidades. Comparando-se estes resultados com aqueles obtidos para a desnaturação térmica, percebe-se que o efeito na estrutura secundária é maior para a desnaturação por cloreto de guanidina, e ainda esta última é representada por dois estados de transição na sua estrutura terciária. Isto está em concordância com os resultados descritos na literatura, que mostram que

para desnaturação térmica a enzima retém mais de sua estrutura secundária do que para desnaturações por processos químicos (Donnet et al., 2001).

Uma outra questão que pode ainda ser levantada é que, para algumas proteínas, no intervalo de concentração de cloreto de guanidina no qual ocorre a desnaturação da enzima a proteína não exhibe grandes mudanças conformacionais (Tsou, 1995; Gómez-Puyou et al. 2001). Isto pode ser aplicado em parte neste estudo, uma vez que em termos percentuais ocorreu um aumento máximo de 15% na intensidade de fluorescência, indicando assim que não houve uma mudança significativa em termos de estrutura terciária da Na,K-ATPase solubilizada na presença de até 6 mol.L<sup>-1</sup> de cloreto de guanidina. Já os valores de desnaturação analisados por dicroísmo circular são mais relevantes, com um aumento de cerca de 20% nas estruturas “ao acaso”, porém a redução de  $\alpha$ -hélices foi de cerca de 5%, ambos para 1 mol.L<sup>-1</sup> de guanidina, enquanto que os valores de atividade enzimática da enzima são reduzidos em 90% já para 2 mol.L<sup>-1</sup> de cloreto de guanidina, o que mostra que a enzima perde completamente sua atividade antes de perder a estrutura (tanto terciária (Figura 23) quanto secundária (Rigos, 2003) não se observam perda completa de estrutura para análises realizadas para até 6 mol.L<sup>-1</sup> deste agente desnaturante).

### **4.3 Efeito de meios tamponantes**

#### **4.3.1 Análise por dicroísmo circular**

Para avaliar o efeito do pH na estrutura secundária da Na,K-ATPase foram realizados estudos de dicroísmo circular variando o tampão utilizado para a incubação da proteína.

Soluções de pH determinam o tipo (positivo ou negativo) e a carga total de uma proteína, afetando por conseqüência as interações eletrostáticas. Existem dois diferentes processos nos quais as interações eletrostáticas podem afetar a estabilidade de uma proteína. Primeiramente, clássicos efeitos eletrostáticos são as repulsões não específicas que surgem de grupos carregados na proteína quando ela se apresenta altamente carregada, por exemplo, em um pH longe do ponto isoelétrico (pI). Como o número de grupos carregados de uma proteína aumenta devido ao aumento da acidez ou basicidade de uma solução, o aumento da repulsão de cargas com a proteína desestabiliza sua conformação nativa porque a densidade de cargas na proteína enovelada é maior que na proteína desnaturada. Então, quando o pH induz a uma desnaturação leva conseqüentemente a um estado de menor energia livre eletrostática. Além desse efeito, específicas interações de carga, como ligações de sais, podem afetar também a estabilidade conformacional de uma proteína. Ao contrário das interações eletrostáticas não específicas, onde o aumento da carga desestabiliza o estado nativo, as ligações de sais têm a propriedade de estabilizá-lo (Dill, 1990; Chi et al., 2003).

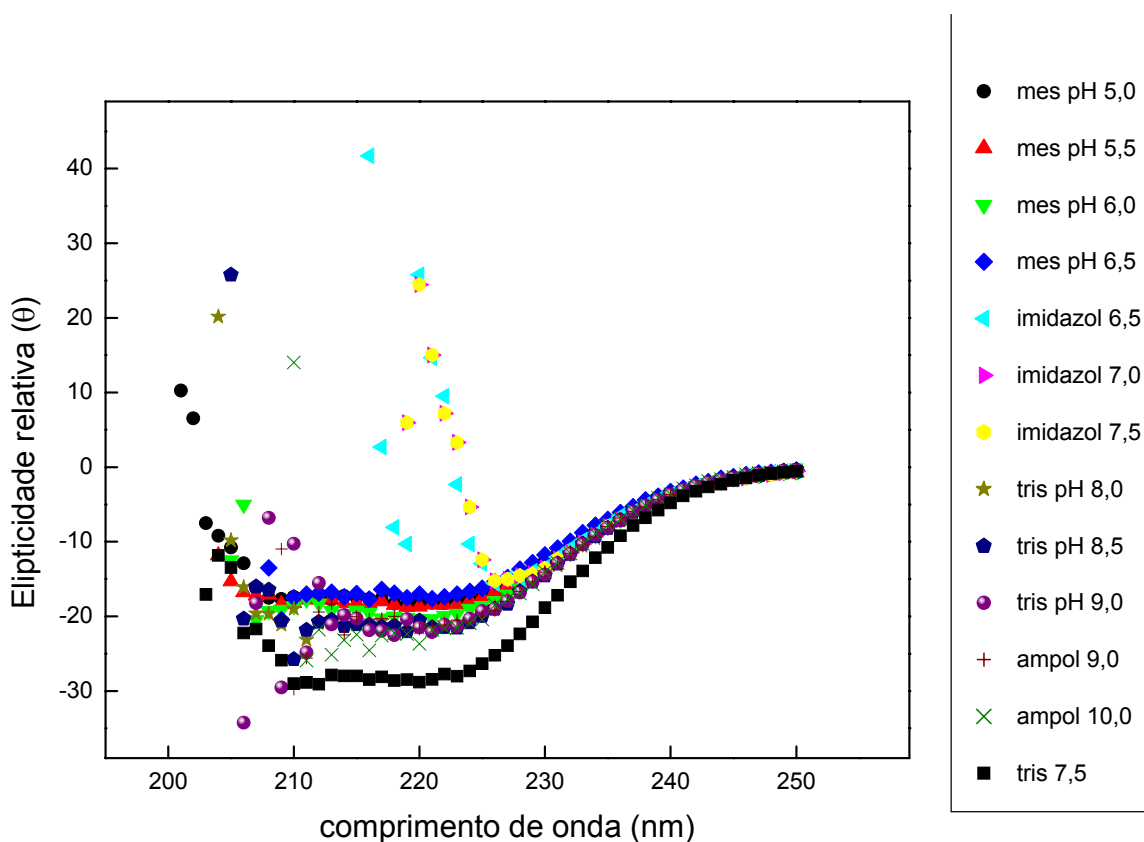
Em adição a esses efeitos na conformação, as cargas das proteínas também podem interagir com outras moléculas protéicas. Quando

proteínas estão altamente carregadas, interações repulsivas entre proteínas estabilizam a solução protéica. Quando as proteínas possuem grupos carregados positivamente e negativamente (por exemplo, em valores de pH próximos ao pI), uma distribuição de cargas anisotrópica na superfície da proteína poderia originar dipolos (Dill, 1990; Chi et al., 2003).

Os espectros de dicroísmo circular da Na,K-ATPase foram coletados na presença de diversos sais tamponantes, sendo que a variação do pH foi de 5,0 a 10,0 para uma concentração de 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de enzima, conforme descrito no item 3.9.2 de Material e Métodos (Figura 24).

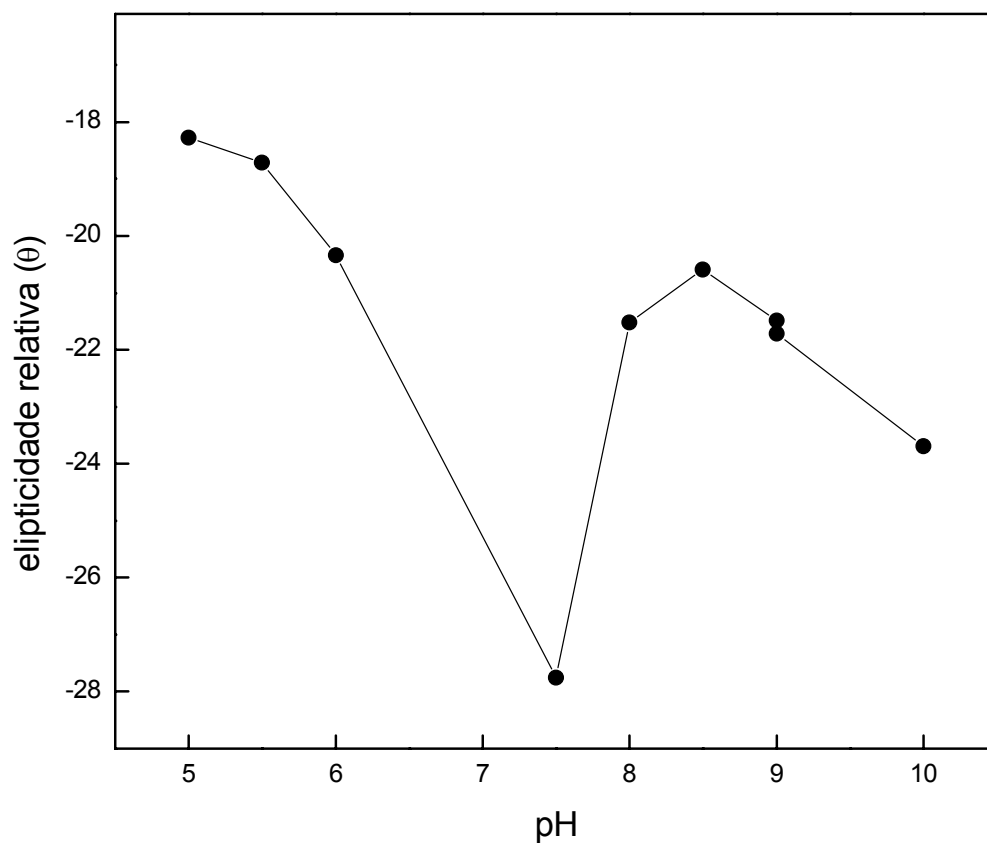
Na presença do tampão imidazol em qualquer valor de pH fica claro que ocorre uma alteração no padrão da curva de dicroísmo circular apresentado pela Na,K-ATPase (presença de dois mínimos, em 222 e 208 nm). Quando se relaciona os dados obtidos em 222 nm com os valores de pH para os diversos tampões, ocorre um grande desvio para os resultados obtidos de elipticidade da enzima na presença do imidazol. Este desvio é devido à estrutura do imidazol, que também apresenta a forma “=NH-C=O”, similar à ligação peptídica nas proteínas (valores não mostrados).

Assim, os resultados de elipticidade obtidos para o imidazol foram descartados e uma nova curva de elipticidade relativa em função do pH foi construída (Figura 25). Neste caso, o valor de elipticidade em 222 nm permite afirmar que a enzima possui maior elipticidade relativa de estrutura secundária no seu pH ótimo de hidrólise de ATP. Em valores de pH menores, o efeito na estrutura secundária é mais acentuado quando comparado aos efeitos de mudanças para maiores valores de pH, levando



**Figura 24.** Espectros de dicroísmo circular da Na,K-ATPase ( $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) em função da variação do pH (5 a 10). **A.** variação de pH 5,0 a 7,5. **B.** variação de pH de 7,5 a 10. Os espectros foram obtidos em diferentes tampões, contendo EDTA  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$  e KCl  $150 \text{ mmol.L}^{-1}$ , empregando-se uma cubeta de 1 cm de passo óptico a  $25^\circ\text{C}$ , conforme descrito no item 3.9.2 de Material e Métodos.





**Figura 25.** Valores de elipticidade em 222 nm para a Na,K-ATPase ( $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) em função da variação do pH, excluindo o tampão imidazol. Os valores de elipticidade foram obtidos dos espectros de dicroísmo circular mostrados na Figura 24.

a um aumento de 34,5% da elipticidade relativa para pH 5,0 e 22,5% para o pH 8,0. Em valores de pH alcalinos (pH 10,0) a elipticidade é reduzida em 14,7%. Os valores indicam que uma alteração mínima no pH induz a efeitos de alteração de estrutura através da alteração das interações eletrostáticas das estruturas secundárias, sendo estes efeitos mais pronunciados em valores de pH abaixo de 7,5. De acordo com a Figura 25, pode-se afirmar que a enzima apresenta uma maior quantidade de estrutura secundária em  $\alpha$ -hélice no pH 7,5. Porém, para uma completa elucidação dos efeitos de alteração de pH na presença de diversos agentes tamponantes, foram realizados estudos de fluorescência para verificar alterações na estrutura terciária da enzima.

#### **4.3.2 Análise por fluorescência intrínseca de triptofano**

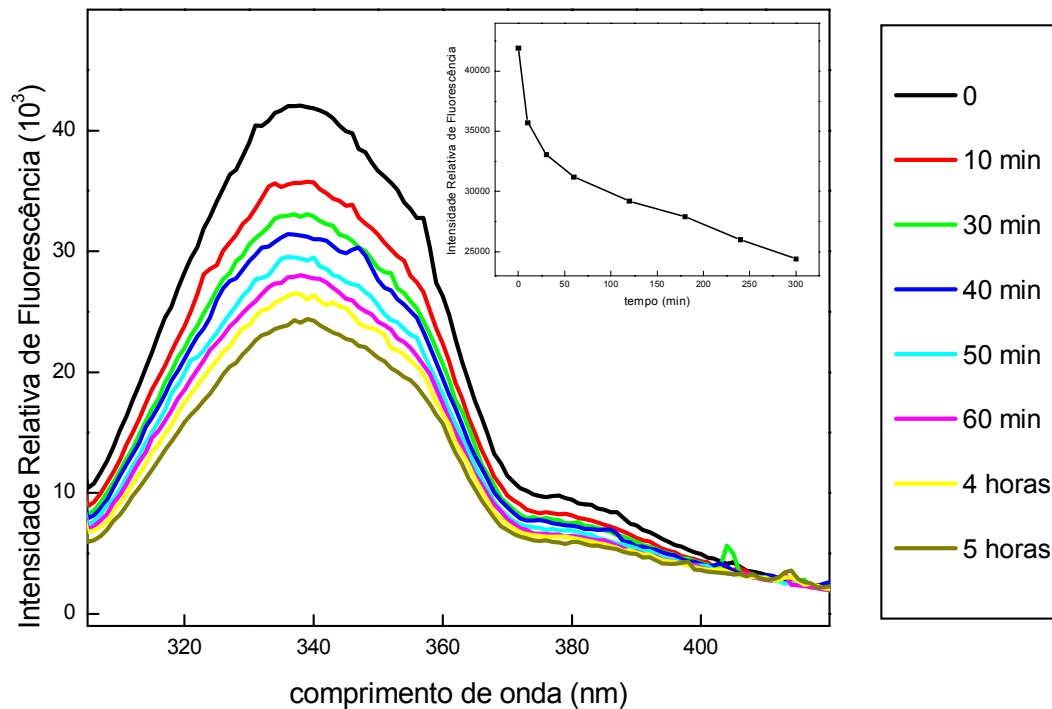
Para melhor entender os efeitos da variação do pH na Na,K-ATPase solubilizada foram realizados estudos de fluorescência da enzima variando-se os meios tamponantes. Para isso, primeiramente foram realizados alguns experimentos para determinar a estabilidade da enzima em função do tempo.

Assim, esse teste foi realizado com dois tampões: Tris pH 7,5 e Ampol pH 10,7. Na Figura 26 estão representados os espectros obtidos para a enzima solubilizada na presença do tampão Tris pH 7,5, conforme descrito no item 3.12.4 de Material e Métodos, em função do tempo de incubação. O gráfico da intensidade em função do tempo (Inserção da Figura 26) indica que depois de 200 minutos começa a ocorrer uma estabilização da intensidade de fluorescência.

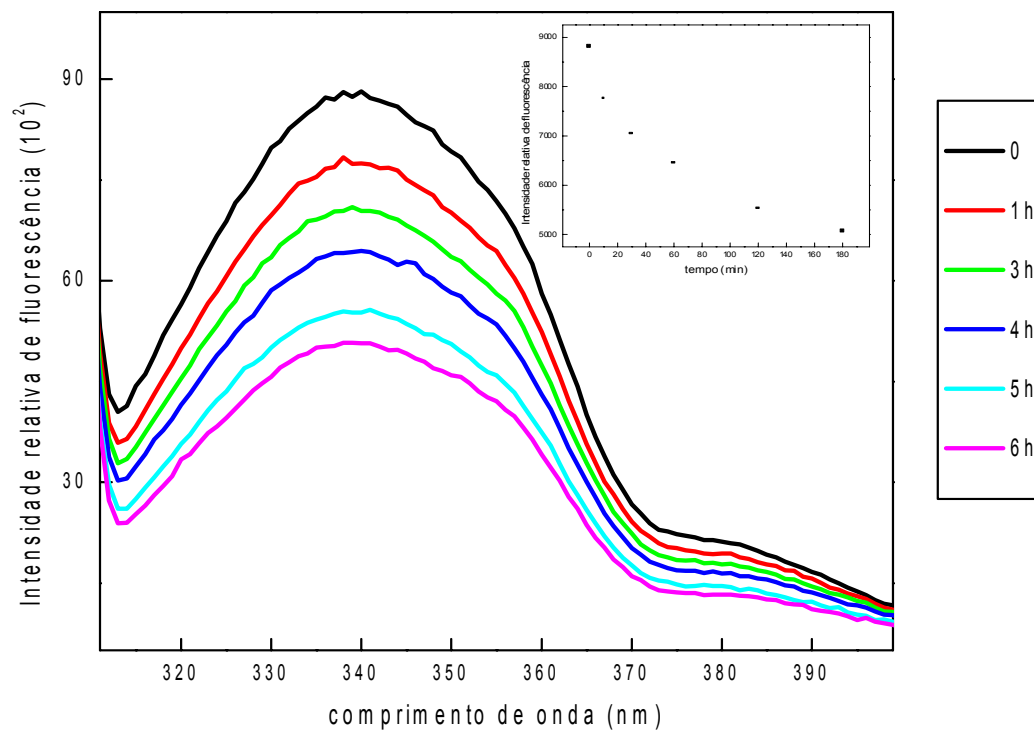
O mesmo procedimento foi realizado para a enzima na presença de Ampol pH 10,5 (Figura 27), o qual mostra que a estabilização dos valores de intensidade ocorre depois de aproximadamente 180 minutos de incubação da amostra (Inserção da Figura 27).

Assim, optou-se por manter a enzima incubada por 4 horas em cada pH analisado, e os espectros obtidos são mostrados na Figura 28, no qual se constatou que não ocorreram desvios de comprimento de onda para os picos máximos de emissão de cada amostra; apenas ocorrem alterações na intensidade máxima relativa de fluorescência para cada pico.

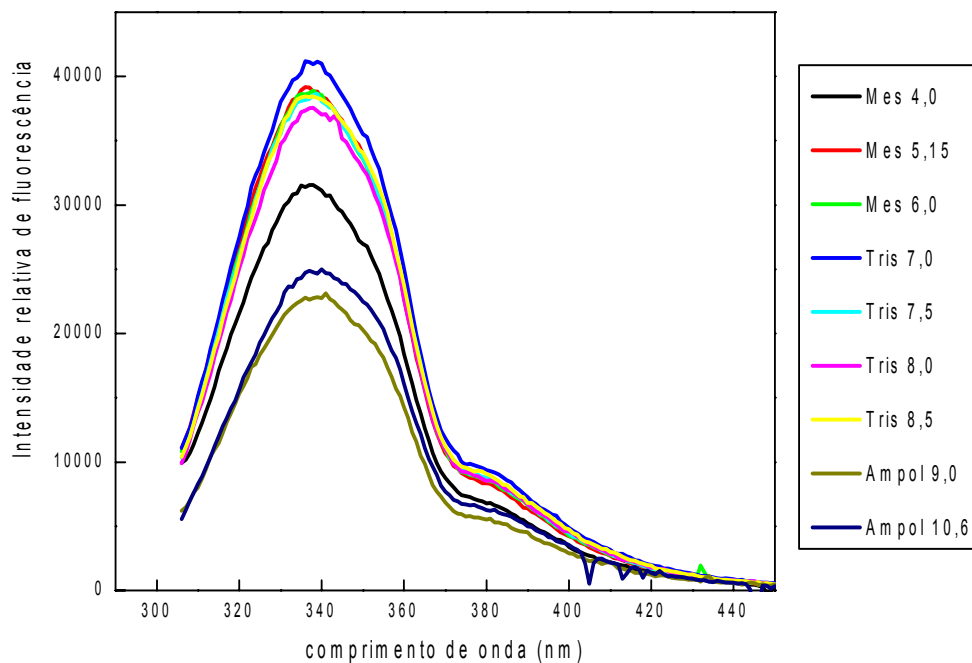
O gráfico da intensidade relativa de fluorescência em função do pH é representado por uma curva característica nesses estudos, com uma intensidade máxima em pH 7,0. Os efeitos da variação do pH na atividade ATPase da enzima já foram previamente analisados (Santos et al., 2002). Neste estudo, foi demonstrado que o pH ótimo aparente de hidrólise de ATP foi da ordem de 7,5, sendo que os resultados foram apresentados na forma de um sino, com reduções acima de 50% da atividade em valores de pH maiores que 9,0 e ainda menores que 5,5. Na faixa de 6,0 a 8,5 foram observadas poucas variações nos valores de atividade ATPase da enzima solubilizada. Salonikidis et al. (2000) descreveram que a inibição da atividade da Na,K-ATPase a altos valores de pH pode ser atribuído à desprotonação e a inibição a baixos valores de pH à protonação de sítios intracelulares da subunidade  $\alpha$  catalítica.



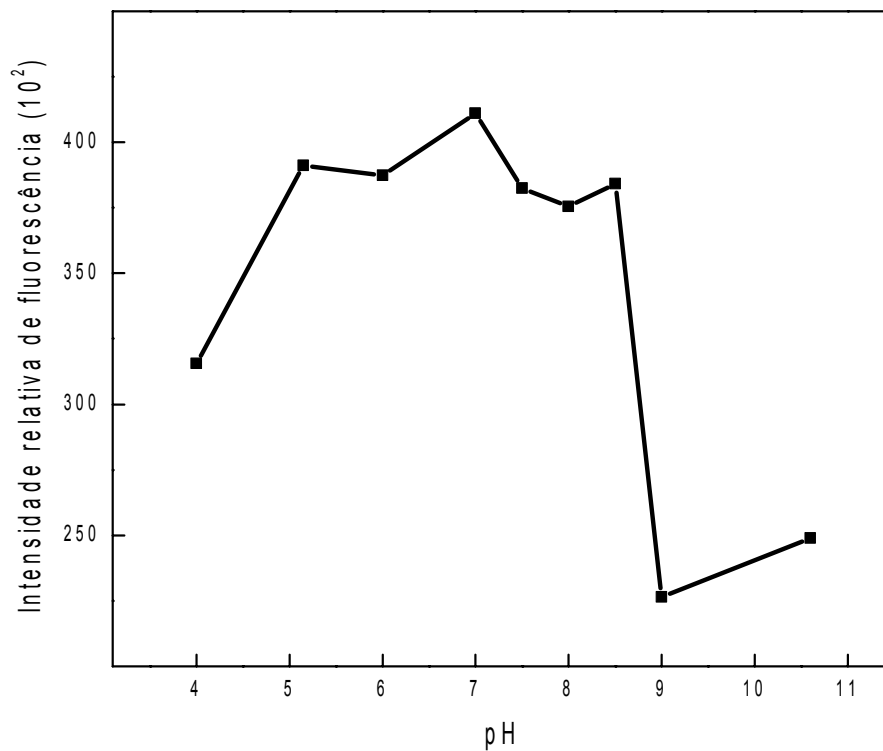
**Figura 26.** Espectros de fluorescência da Na,K-ATPase na presença de Tris 7,5 contendo EDTA 1 mmol.L<sup>-1</sup>, KCl 150 mmol.L<sup>-1</sup> e C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> 0,005 mg.mL<sup>-1</sup>, variando o tempo de incubação da amostra de 10 minutos a 5 horas. Os espectros foram coletados para a Na,K-ATPase solubilizada (20 µg.mL<sup>-1</sup>) em cubeta de 1 cm de passo óptico conforme descrito no item 3.12.4 de Material e Métodos. **Inserção.** Intensidade relativa de fluorescência em 339 nm (pico máximo de absorção) para incubação da Na,K-ATPase em tampão Tris pH 7,5 em função do tempo.



**Figura 27.** Espectros de fluorescência da Na,K-ATPase na presença de Ampol 10,5 contendo EDTA 1 mmol.L<sup>-1</sup>, KCl 150 mmol.L<sup>-1</sup> e C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> 0,005 mg.mL<sup>-1</sup>, variando o tempo de incubação da amostra de 1 a 5 horas. Os espectros foram coletados para a Na,K-ATPase solubilizada (20 µg.mL<sup>-1</sup>) em cubeta de 1 cm de passo óptico conforme descrito no item 3.12.4 de Material e Métodos. **Inserção.** Intensidade relativa de fluorescência em 339 nm (pico máximo de absorção) para incubação da Na,K-ATPase em tampão Ampol 10,5 em função do tempo.



**Figura 28.** Espectros de fluorescência em função da variação do tampão utilizado para a  $\text{Na,K-ATPase}$  solubilizada ( $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Os espectros foram obtidos diversos tampões contendo EDTA  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$ , KCl  $150 \text{ mmol.L}^{-1}$  e  $\text{C}_{12}\text{E}_8$   $0,005 \text{ mg.mL}^{-1}$ , com incubação de 4 horas, empregando-se uma cubeta de 1 cm de passo óptico a  $25^\circ\text{C}$ , conforme descrito no item 3.12.4 de Material e Métodos.



**Figura 29.** Valores de fluorescência em 337 nm ( ■ ) em função da variação do tampão utilizado para a Na,K-ATPase solubilizada. Os valores foram obtidos dos espectros de fluorescência mostrados na Figura 28.

Assim, os resultados apresentados de dicroísmo circular e fluorescência, somados à atividade catalítica da enzima, indicam que a

Na,K-ATPase apresenta uma estrutura que favorece à sua atividade ATPase na região de pH de 7,5.

#### **4.4 Análise de tensão superficial e elasticidade**

É bem descrito na literatura que detergentes não iônicos solubilizam proteínas de membrana, preservando sua estrutura nativa, resultando em um estado que preserva a atividade da enzima por um tempo considerável. Em adição a isso, existe uma clara dependência entre a relação proteína:detergente usada e o processo de agregação e desnaturação da enzima depois da remoção das regiões hidrofóbicas da membrana lipídica. (Brotherus et al., 1983; Jorgensen e Anderson, 1986; Ciancaglini et al., 1990; le Maire et al., 2000; Santos e Ciancaglini, 2003; Mimura et al., 2003).

Para o estudo da influência dessa relação proteína:detergente foram realizados experimentos de medidas de tensão superficial e elasticidade, para se observar os efeitos na superfície da amostra analisada, e esses resultados foram analisados em conjunto com os de atividade ATPase.

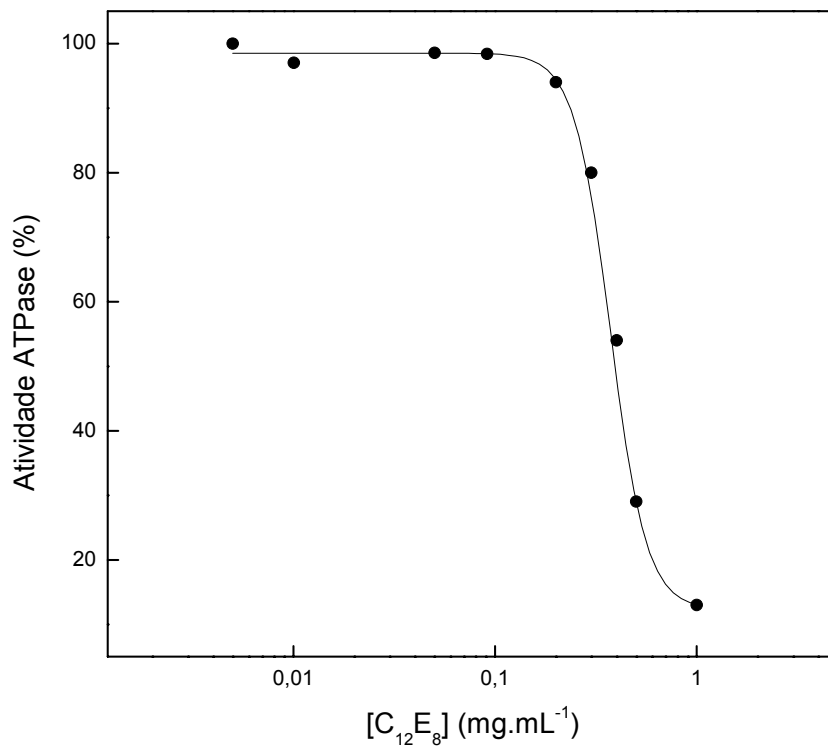
Na Figura 30 é demonstrada a dependência da atividade ATPase da Na,K-ATPase solubilizada (concentração de 0,1 mg.mL<sup>-1</sup>) em diferentes concentrações de detergente, variando este de 0,005 a 1,0 mg.mL<sup>-1</sup>. A atividade ATPase não foi afetada usando concentrações de C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> menores que 0,1 mg.mL<sup>-1</sup>. Com esse propósito, uma investigação que correlacione variações da estrutura da enzima com a atividade foi feita.

Em trabalhos realizados anteriormente, foi obtida uma curva de dicroísmo da enzima purificada em função da concentração de proteína,

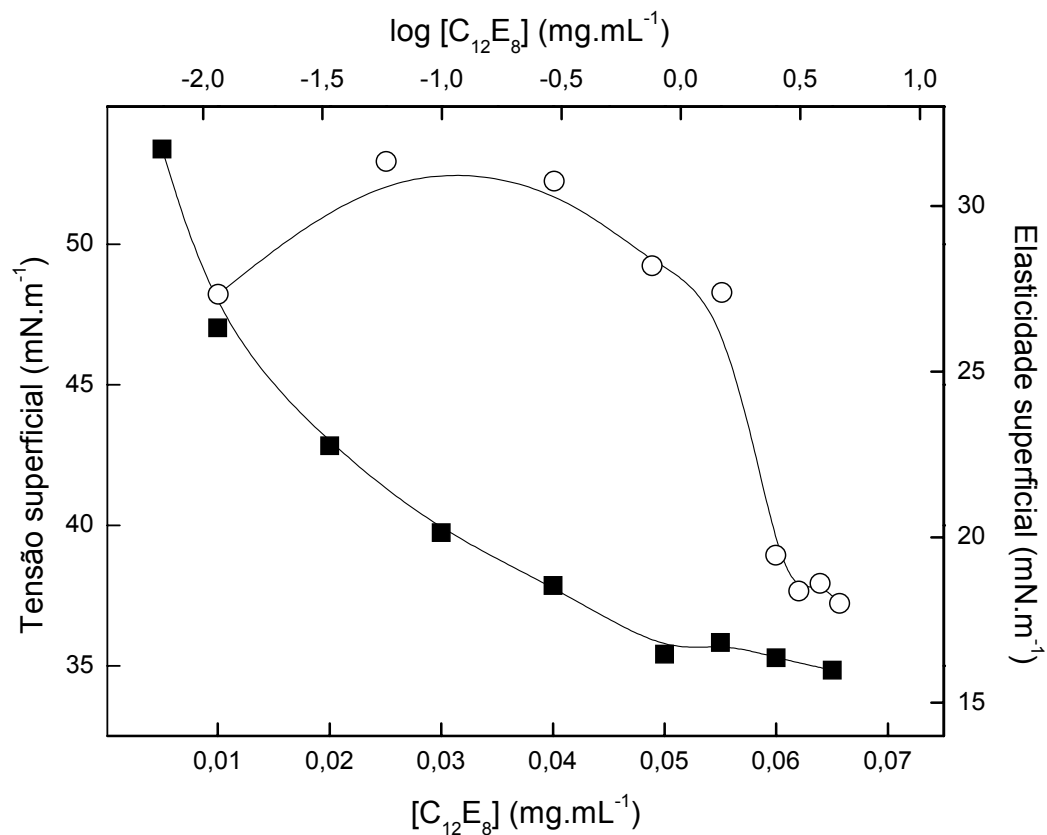


mantendo a concentração de detergente fixa em  $0,005 \text{ mg.mL}^{-1}$ , na qual foram observados dois mínimos característicos de estrutura em  $\alpha$ -hélice. Com o gráfico de elipticidade em 222 nm em função da concentração de proteína, um desvio na curva foi observado para  $0,4 \text{ mg.mL}^{-1}$  (Rigos, 2003). A respeito dessa técnica, deve ser considerado que, em um sistema simples, o aumento no sinal do espectro é diretamente proporcional à concentração da amostra. Em alguns casos, o que pode acontecer são interações entre componentes da amostra, o qual pode levar ao aparecimento de bandas adicionais, ou ainda a variações não lineares nos sinais (Fasman, 1996).

Com o objetivo de melhor entender as variações nos resultados de dicroísmo e na atividade ATPase com as diferentes relações detergente:enzima, esses comportamentos foram estudados no sistema na interface ar-líquido. Inicialmente, foi analisado o comportamento do surfactante puro no tampão de trabalho. A partir da Figura 31 foi determinada a concentração micelar crítica do detergente  $\text{C}_{12}\text{E}_8$ . Analisando a curva de elasticidade dilatacional de superfície para o  $\text{C}_{12}\text{E}_8$  no tampão de trabalho, pode ser observado que a elasticidade primeiramente aumenta com a concentração, alcançando um valor máximo e então diminui com um posterior aumento da concentração, até atingir o valor da CMC. Depois desse ponto, a elasticidade permanece constante.



**Figura 30.** Atividade ATPase residual da Na,K-ATPase (0.1 mg.mL<sup>-1</sup>) na presença de diferentes concentrações de detergente (0.005 to 1.00 mg.mL<sup>-1</sup>). A atividade ATPase foi determinada em tampão HEPES 50 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7.5, com ATP 3 mmol.L<sup>-1</sup>, KCl 10 mmol.L<sup>-1</sup>, MgCl<sub>2</sub> 5 mmol.L<sup>-1</sup> e NaCl 50 mmol.L<sup>-1</sup>, conforme descrito no item 3.3 de Material e Métodos.



**Figura 31.** Tensão superficial (■) e elasticidade superficial (○) em função da concentração de C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> em tampão 5 mmol.L<sup>-1</sup> Tris.HCl, pH 7,0, contendo 150 mmol.L<sup>-1</sup> KCl. As medidas de tensão superficial foram determinadas pelo método da gota pendente, conforme descrito no item 3.15 de Material e Métodos.

Normalmente, baixas CMC são responsáveis pelo processo de desnaturação durante a solubilização (Kalipatnapu e Chattopadhyay, 2005). Mas não pode ser esquecido que os valores de CMC dependem do meio no qual o detergente está, então variações de força iônica e pH são fatores importantes que devem ser considerados durante o processo de solubilização (le Maire et al., 2000; Seedon et al., 2004; Kalipatnapu e Chattopadhyay, 2005). Valores de CMC para o C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> podem ser encontrados na literatura, os quais variam de 0,005 a 0,1 mg.mL<sup>-1</sup> (le Maire et al., 2000). Para o sistema estudado (5 mmol.L<sup>-1</sup> de tampão Tris.HCl, pH 7,0, contendo 150 m mol.L<sup>-1</sup> de KCl) foi encontrado o valor de 0,0053 mg.mL<sup>-1</sup>, o qual concorda com os valores reportados na literatura.

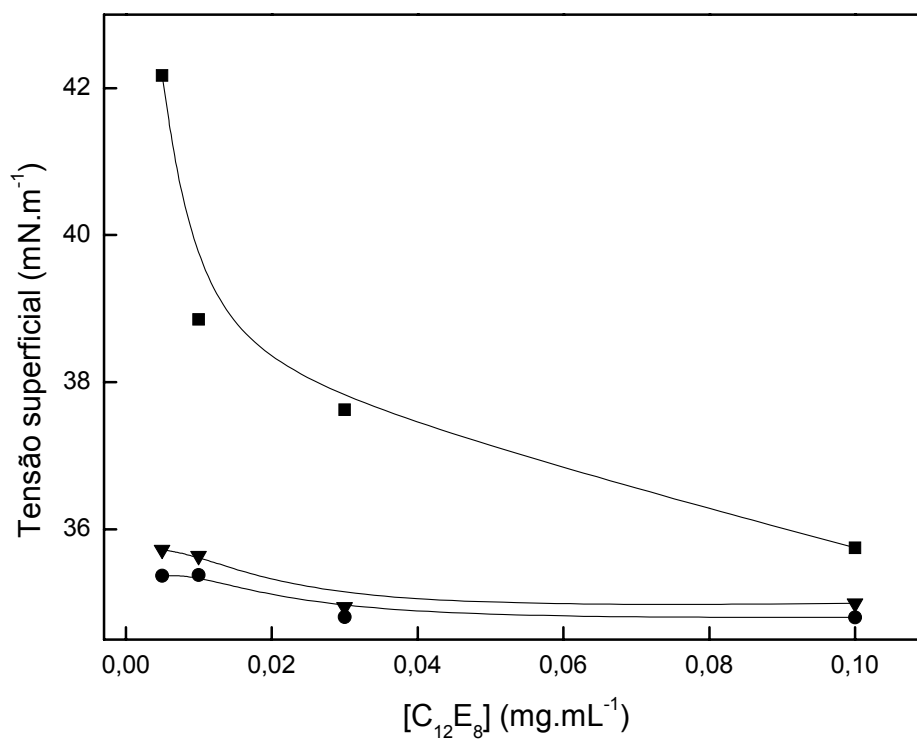
Uma vez que o detergente puro foi caracterizado, foram analisados os efeitos da enzima na tensão superficial do sistema. Na Figura 32 são observadas as curvas de tensão superficial versus variação da concentração do detergente em diferentes concentrações de enzima. Para concentrações de C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> abaixo da CMC (0,005 a 0,004 mg.mL<sup>-1</sup>), pode ser observado que a presença da enzima contribui sinergicamente para a diminuição da tensão superficial de detergente. Este é um indicativo de que ambas espécies são adsorvidas na interface ar-líquido. Além disso, as duas concentrações mais baixas de Na,K-ATPase apresentam um comportamento similar, enquanto que a maior (0,5 mg.mL<sup>-1</sup>) exibe uma menor diminuição na tensão superficial. Deve ser relatado ainda que, para concentrações de C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> entre 0,005 e 0,04 mg.mL<sup>-1</sup>, a menor concentração de enzima é representada por uma razão surfactante:enzima que varia de 58 a 4600. Entretanto, essa razão molar diminui para valores menores

que 443,4 para  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$  de Na,K-ATPase e para concentrações de  $\text{C}_{12}\text{E}_8$  acima de  $0,04 \text{ mg.mL}^{-1}$ .

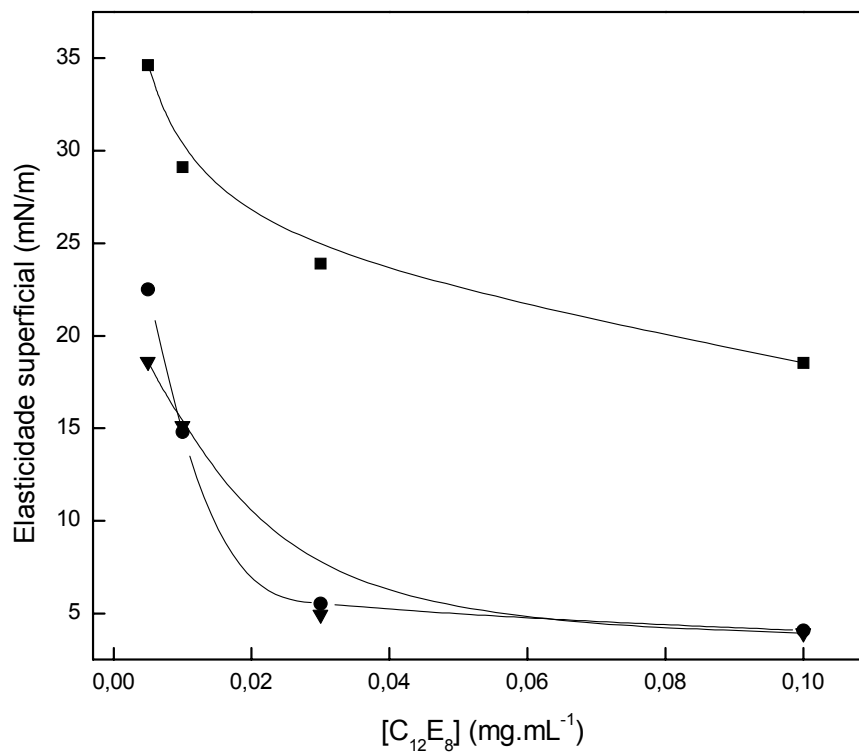
Na Figura 33 são apresentados os valores de elasticidade dilacional de superfície para o sistema, usando as mesmas concentrações de proteína previamente estudadas. As curvas obtidas nesse estudo reforçam os resultados de tensão superficial: um comportamento similar é observado para menores concentrações de enzima.

Desde que os valores de elasticidade estão associados com os processo de difusão, adsorção/dessorção, bem como o rearranjo de moléculas na interface, eles dependem do tempo de escala (ou frequência) no qual a perturbação é aplicada. Em adição, esses processos são influenciados pelo peso molecular, forma e interações moleculares de espécies presentes na interface. Pode ser observado na Figura 33 que uma diminuição nos valores de elasticidade (comparados com o observado para o surfactante puro) para menores valores de concentração da Na,K-ATPase ( $0,05$  e  $0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). Este é um indicativo de que a adsorção da enzima neste regime produz uma interface menos compactada. Além disso, a elasticidade se torna constante quando a CMC para o surfactante em tampão de trabalho é atingida.

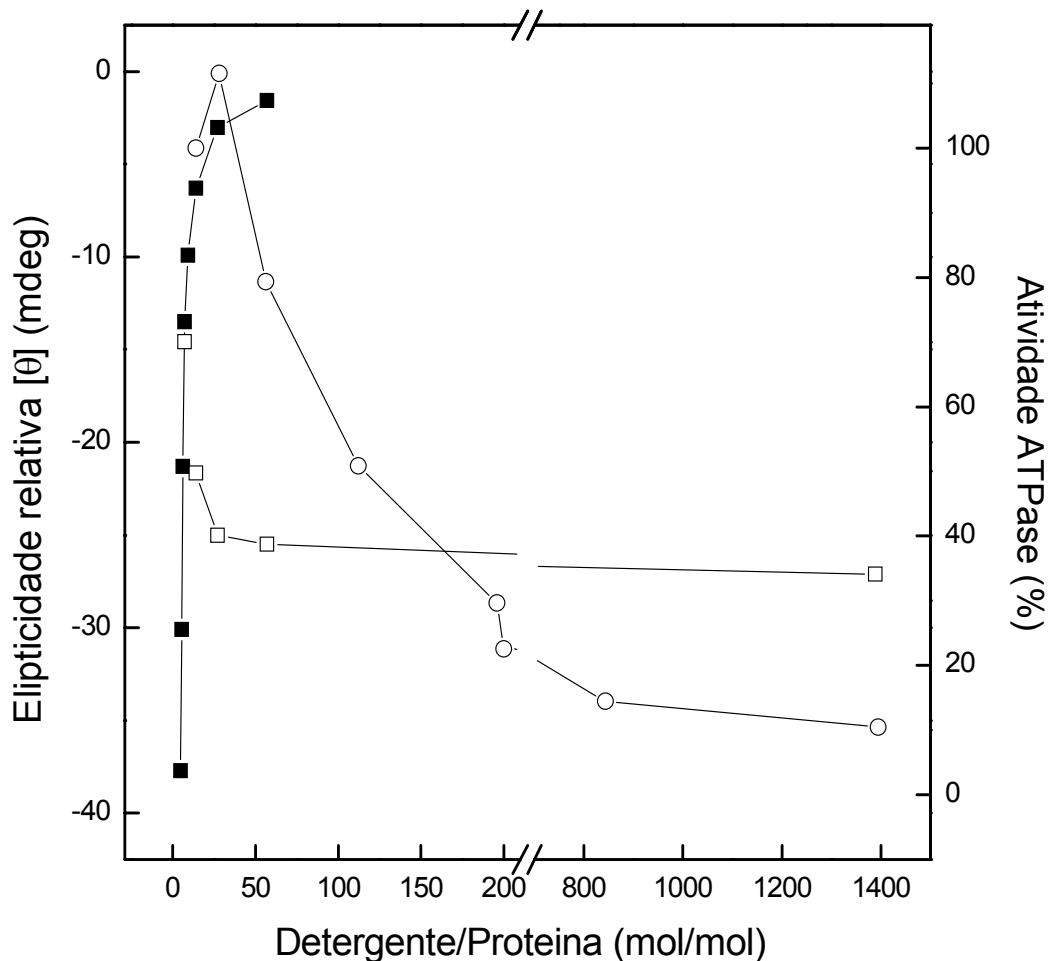
O processo que controla a estabilidade da proteína em solução e o mecanismo de agregação foi recentemente estudado por alguns autores (Treuheit et al., 2002; Ellis e Minton, 2006; Guo et al.; 2006). Nestes estudos, foram utilizadas técnicas espectroscópicas como CD, FTIR, UV e ainda calorimetria para medidas coloidais e estabilidade conformacional



**Figura 32.** Tensão superficial em função da concentração de C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> para soluções de Na,K-ATPase em diferentes concentrações: (●) 0,05 mg.mL<sup>-1</sup>, (▼) 0,2 mg.mL<sup>-1</sup> e (■) 0,5 mg.mL<sup>-1</sup>. As medidas de tensão superficial foram determinadas pelo método da gota pendente, conforme descrito no item 3.15 de Material e Métodos.



**Figura 33.** Elasticidade superficial em função da concentração de C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> para soluções de Na,K-ATPase em diferentes concentrações: (●) 0.005 mg.mL<sup>-1</sup>, (▼) 0.2 mg.mL<sup>-1</sup> e (■) 0.5 mg.mL<sup>-1</sup>. As medidas da elasticidade superficial foram determinadas pelo método da gota pendente, conforme descrito no item 3.16 de Material e Métodos.



**Figura 34.** Correlação entre a elipticidade relativa e a atividade ATPase versus a razão molar proteína:detergente (□) e (■) Elipticidade relativa; (○) Atividade ATPase. As concentrações de C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> usadas foram: símbolos fechados abaixo da CMC e símbolos abertos acima da CMC



de proteínas em soluções altamente concentradas. Entretanto, esses estudos usam proteínas solúveis como modelo. Assim, trabalhos que utilizem proteínas de membrana são mais difíceis de serem realizados, uma vez que é necessário inicialmente remover a proteína da membrana lipídica, e então trabalhar com ela na presença de um detergente que previna a agregação espontânea mediada pelos domínios hidrofóbicos presentes nessa classe de proteína.

Diferentes modos de oligomerização entre as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  da Na,K-ATPase podem ser formados, dependendo do método empregado para solubilizar e purificar a enzima, o qual resulta em um comportamento cinético alterado levando a discrepâncias nos valores reportados na literatura (Lopina, 2001; Santos e Ciancaglini, 2003). Além disso, não é bem conhecido se esta instabilidade é devido à perda de associações proteína-proteína (separação ou rearranjo das subunidades  $\beta$  do complexo) ou se isso reflete o rearranjo de fosfolipídios essenciais pelas moléculas de detergente (Donnet et al., 2001).

Le Maire et al. (1978), usando uma combinação entre dois detergentes ( $C_{12}E_8$  e Tween 80), durante uma cromatografia de eluição com Sepharose 6B, mostraram que a elipticidade da Ca-ATPase enzimaticamente ativa apresenta características estruturais muito similares à Na,K-ATPase: dois mínimos em 208 e 222 nm de igual magnitude, indicativo de um alto conteúdo de  $\alpha$ -hélice. Em adição, quando a Ca-ATPase foi estocada por 1 semana, as características de elipticidade se alteraram para o mínimo em 222 nm, que passou a ser

menos pronunciado. Esta mudança é coincidente à quase completa perda da atividade ATPase da enzima.

Nesse mesmo caminho, para a Na,K-ATPase, em um estudo mais detalhado, o mesmo tipo de variações no espectro de CD para o aumento da concentração de proteína em uma concentração fixa de detergente pode ser verificado. Para o nosso sistema, um ponto de desvio foi observado para uma concentração de proteína de  $0,4 \text{ mg.mL}^{-1}$  e detergente de  $0,005 \text{ mg.mL}^{-1}$  (Rigos, 2003), correspondendo a uma razão de proteína:detergente de cerca de 7, sugerindo uma alteração na estrutura secundária.

A diminuição dos valores de elipticidade relativa com o aumento da concentração de detergente (Rigos, 2003) demonstra que, para altos valores de concentração de  $\text{C}_{12}\text{E}_8$ , altas quantidades de estrutura em  $\alpha$ -hélice são obtidas.

Os mecanismos aos quais levam a variações de estrutura secundária na formação/separação de subunidades quando as concentrações de enzima e detergente são alteradas é diferente. Para o primeiro caso está claro que essa alteração existe, uma vez que uma variação na curva de linearidade de dicroísmo é observada, até mesmo se não forem observadas significantes variações de atividade ATPase. No caso do aumento da concentração de detergente mantendo a de proteína fixa, uma concomitante redução na atividade da enzima foi obtida (Figura 34). Desde que os valores de elipticidade em 222 nm são menos pronunciados que no mínimo em 208 nm em função do aumento da concentração de

detergente, uma drástica variação na estrutura secundária (e ainda terciária e quaternária) deve ocorrer.

O que pode ser sugerido a partir das curvas de dicroísmo e atividade ATPase, e baseado em outros estudos disponíveis na literatura (Kalipatnapu e Chattopadhyay, 2005) é que existe uma variação do comportamento em função da CMC do detergente, independente de ocorrerem alterações na estrutura da Na,K-ATPase. Então, analisando o comportamento das curvas de CD e correlacionando essas curvas com a atividade da enzima versus a concentração de detergente em diferentes concentrações de enzima (Figura 34), duas diferentes situações são possíveis: uma abaixo e outra acima da CMC. Então, um esquema de associação das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  formando diferentes protômeros de Na,K-ATPase podem ser proposto (Esquema III).

A mesma interpretação é possível quando é analisado o comportamento das curvas de tensão superficial versus concentração de detergente em diferentes concentrações de enzima (0,05; 0,2 e 0,5 mg.mL<sup>-1</sup>) nos dois diferentes regimes: acima e abaixo da CMC do detergente.

Então a hipótese é a de que se tem duas diferentes espécies: uma que é originada a altas razões de detergente:enzima e outra que, provavelmente como produto da agregação da enzima, onde a razão molar de detergente:enzima é menor que 100. Em qualquer caso, a agregação resulta em uma diminuição do número de moléculas de enzima disponíveis, o que justifica uma menor diminuição na tensão superficial quando a concentração da enzima aumenta (Figura 31). A hipótese de agregação também explica a menor diminuição na elasticidade comparada

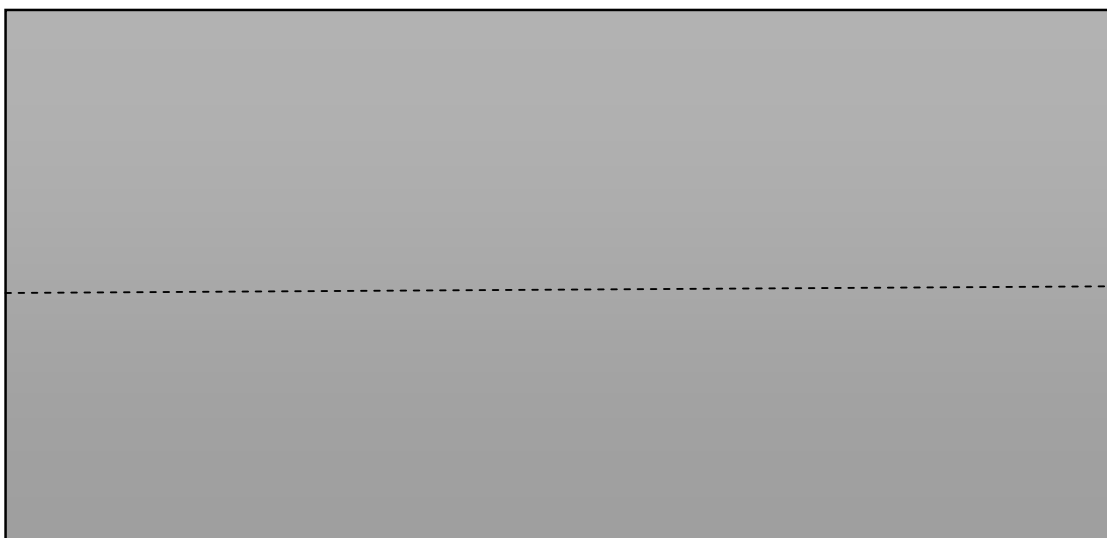
a menor concentração da enzima, porque nesse caso as duas condições não necessariamente devem ser conectadas, com diferentes pesos moleculares e onde devem estar presentes também diferentes hidrofobicidades.

Proteínas e detergentes (abaixo da CMC) são adsorvidos na interface ar/líquido desde que a presença da enzima contribui sinergisticamente para a diminuição na tensão superficial do surfactante puro, em todas as três concentrações de enzima. Além disso, as duas menores concentrações de enzima estudadas (0,05 e 0,2 mg.mL<sup>-1</sup>) apresentam um comportamento similar, enquanto que a maior concentração (0,5 mg.mL<sup>-1</sup>) exibe uma menor diminuição na tensão superficial. Acima da CMC do detergente, foi observado que o sistema converge no mesmo valor de tensão superficial, indicando a formação de micela em todos os casos.

Aa curvas de tensão superficial e elasticidade concordam com o desvio de linearidade apresentado pela enzima a diferentes concentrações estudadas para dicroísmo circular, e indicam a adsorção na interface ar-água de diferentes espécies procedendo das alterações de estrutura observadas, o qual resulta nestes diferentes comportamentos superficiais. Entretanto, acima da CMC os valores de tensão superficial convergem a um mesmo valor, e isso indica que a partir dessa concentração de detergente o sistema tende a um mesmo comportamento, independente das propriedades iniciais desse sistema.

Finalmente, a metodologia de obtenção da enzima descrita em Santos et al. (2002) resulta em uma forma da enzima ( $\alpha\beta$ )<sub>2</sub> que, quando diluído deve formar associações  $\alpha\beta$ , e quando concentrada deve formar

$(\alpha\beta)_4$ . Estas associações têm atividade ATPase similares e permanecem em equilíbrio desde que a concentração de  $C_{12}E_8$  seja menor que a sua CMC. Se a concentração de detergente for aumentada para valores maiores que a CMC, qualquer uma das associações produz as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  separadas (Esquema III). Essa condição resulta em uma perda de atividade ATPase e variações no espectro de CD, tensão superficial e elasticidade.



**Esquema III.** Relação entre o mecanismo de separação das subunidades da Na,K-ATPase em função da relação proteína:detergente e o efeito na atividade ATPase (fundo claro enzima ativa e cinza inativa).

## 5. Conclusão

Proteínas de membrana têm sido designadas existirem parcialmente em um ambiente no qual água está excluída. Desde que muitas das forças que governam o enovelamento de proteínas estão acopladas com as propriedades do solvente (ex. “efeitos hidrofóbicos”, ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas), não é surpreendente que estas forças diferem significativamente daquelas das proteínas solúveis. Conseqüentemente, o impacto de desenovelamento de uma cadeia polipeptídica dentro da bicamada lipídica ainda não está completamente entendido. O número crescente de sistemas em que foram caracterizados os valores termodinâmicos de desnaturação revelam que o número de variáveis com respeito à interações proteína-solvente, proteína-proteína e proteína-lipídio devem ser consideradas quando se avaliam as origens moleculares dos parâmetros de energética e a termodinâmica de enovelamento/desenovelamento. A contribuição relativa de cada uma destas variáveis à estabilidade global de uma proteína providencia uma completa caracterização de um sistema de proteína de membrana em termos de sua energética e parâmetros estruturais. Os valores resultantes também são influenciados por uma série de condições experimentais incluindo a escolha do surfactante (lipídios ou detergentes), a presença de ligantes e condições da solução, como força iônica e pH (Minetti e Remeta, 2006).

O resultado do exame de valores termodinâmicos revela uma diferença fundamental entre proteínas solúveis e de membrana: os elementos da estrutura secundária intrabicamada das proteínas de membrana são altamente estáveis e resistem à desnaturação térmica, enquanto que suas regiões extramembrana têm um comportamento similar ao de proteínas solúveis. Vários autores postularam que a menor entalpia de desnaturação medida para proteínas de membrana em comparação a proteínas solúveis é um indicativo de um incompleto desenovelamento (Minetti e Remeta, 2006).

No estudo de desnaturação de proteínas oligoméricas de membrana podem ser encontrados diversos tipos de mecanismo de desnaturação, sendo os mais comuns os de “dois estados”, no qual um processo cooperativo sem intermediários é o responsável pela desnaturação da enzima (Popot e Engelman, 1990), ou ainda um de “três estados”, no qual existe um intermediário no processo, que pode tanto ser um monômero enovelado ou ainda um oligômero parcialmente desenovelado (Blackburn e Noltmann, 1981; Neet e Timm, 1994). Porém, considerando-se a complexidade do sistema no qual são estudadas proteínas de membrana devido às mais diversas interações entre as subunidades protéicas e ainda as interações entre a proteína e os lipídios da bicamada, outros mecanismos podem ser aplicados, com a presença de dois ou até mesmo de três intermediários no processo (Abdalla e Hamed, 2006).

No caso da Na,K-ATPase, as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  podem formar estruturas oligoméricas na forma  $(\alpha\beta)_2$  e fica evidente que, durante os diversos processos (físicos e químicos) avaliados por métodos bioquímicos e biofísicos (tais como: dicroísmo circular, fluorescência, infravermelho, calorimetria e atividades ATPase e pNFFase), a enzima apresenta intermediários no seu mecanismo de desenovelamento/desnaturação. Esses intermediários por sua vez justificam a complexidade do sistema estudado, e ajudam a entender como ocorre a perda de atividade da Na,K-ATPase tanto na sua forma solubilizada quanto na reconstituída em lipossomos de DPPC:DPPE.

Portanto, a análise de intermediários em processos de desnaturação fornece informações valiosas para o entendimento do mecanismo de enovelamento de uma proteína, a relação entre os processos de enovelamento e oligomerização, e ainda a determinação da significância da interação entre subunidades.



## 6. Referências Bibliográficas

- Abdalla, A.M. and Hamed, R.R. (2006) Multiple unfolding states of glutathione transferase from *Physa acuta* (Gastropoda: Physidae). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 340(2):625-32.
- Adler, A.J.; Greenfield, N.J. and Fasman, G.D. (1973) In *methods in Enzimology*. Hirs, C.H.W. (ed.) Academic Press, London and New York, Vol. 27, p.675.
- Askhtar, M.S.; Ahmad, A. and Bhakini, V. (2002) Guanidinium chloride and urea induced unfolding of the dimeric enzyme glucose oxidase. *Biochemistry* 41: 3819-3827.
- Albers, R.W. (1967) Biochemical aspects of active transport. *Ann. Biochem.* 36: 727-756.
- Almansa, E.; Sanchez, J.J.; Cozzi, S.; Rodriguez, C. and Diaz, M. (2003) Temperature-activity relationship for the intestinal Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase of *Sparus aurata*. A role for the phospholipid microenvironment? *J. Comp Physiol. [B]*. 173(3):231-7.
- Antolovic, R.; Hamer, E.; Serpersu, E.H.; Kost, H.; Linnertz, H.; Kovarik, Z. and Schoner, W. (1999) Affinity labelling with MgATP analogues reveals coexisting Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> forms of the alpha-subunits of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *Eur. J. Biochem.* 261:181-189.
- Aperia, A. (2007) New roles for an old enzyme: Na,K-ATPase emerges as an interesting drug target. *J Intern Med.* 261: 44-52.
- Arrondo, J.L., and Goni, F.M. (1999) Structure and dynamics of membrane proteins as studied by infrared spectroscopy. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 72(4):367-405. Review.
- Arrondo, J.L., Castresana, J., Valpuesta, J.M., Goni, F.M. (1994) Structure and thermal denaturation of crystalline and noncrystalline cytochrome oxidase as studied by infrared spectroscopy. *Biochemistry.* 33(38):11650-5.
- Askari, A. (2000) *Na,K-ATPase and related ATPases* Elsevier Science.
- Askari, A. (1987) Na,K-ATPase: on the number of the ATPsites of the functional unit. *J. Bioenergetics Biomembranes* 19: 359-374.
- Askari, A.; Kakar, S.S. and Huang, W. (1988) Ligand binding sites of the ouabain-complexed Na,K-ATPase. *J. Biol. Chem.* 263: 235-242.
- Axelsen, K.B. and Palmgren, M.G. (1998) Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. *J. Mol. Evol.* 46: 84-101.
- Bamberg, E.; Butt, H.J.; Eisenrauch, A. and Fendler, K. (1993) Charge transport of ion pumps on lipid bilayer membranes. *Q. Ver. Biophys.* 26:1-25.
- Bayley, P.M. (1980) In *An Introduction to Spectroscopy for Biochemistries*. Brown, S.B (ed.), Academic Press, London, p.148.
- Beggah, A.T.; Beguin, P.; Jaunin, P.; Peitsch, M.C. and Geering, K. (1993) Hydrophobic C-terminal amino acids in the beta-subunit are involved in assembly with the alpha-subunit of Na,K-ATPase. *Biochemistry.* 32:14117-14124.
- Beggah, A.T.; Jaunin, P. and Geering, K. (1997) Role of glycosilation and disulfide bond formation in the  $\beta$  subunit in the folding and functional expression of

- Na,K-ATPase. *J. Biol. Chem.* 272: 10318-10326.
- Béguin, P.; Hasler, U.; Beggah, A.; Horisberger, J.D. and Geering, K. (1998) Membrane integration of Na,K-ATPase  $\alpha$ -subunits and  $\beta$ -subunit assembly. *J. Biol. Chem.* 273: 24921-24931.
- Béguin, P.; Hasler, U.; Staub, O. and Geering, K. (2000) Endoplasmic reticulum quality control of oligomeric membrane proteins: topogenic determinants involved in the degradation of the unassembled Na,K-ATPase alpha subunit and in its stabilization by beta subunit assembly. *Mol. Biol. Cell.* 11: 1657-1672.
- Béguin, P.; Wang, X.; Firsov, D.; Puoti, A.; Claeys, D.; Horisberger, J.D. and Geering, K. (1997) The  $\gamma$  subunit is a specific component of the Na,K-ATPase and modulates its transport function. *EMBOJ* 16: 4250-4260.
- Blanco, G.; Koster, J.C.; Sanchez, G.; Mercer, R.W.; Kinetic Properties of the alpha2.beta1 and alpha2.beta2 isoenzymes of the Na,K-ATPase (1995) *Biochemistry* 34: 319-325.
- Blanco, G.; Koster, J.C. and Mercer, R.W. (1994) The  $\alpha$  subunits of the Na,K-ATPase specifically and stably associates into oligomers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 8542-8546.
- Blackburn, M.N., Noltmann, E.A. (1981) Evidence for an intermediate in the denaturation and assembly of phosphoglucose isomerase. *Arch. Biochem. Biophys.* 212(1):162-9.
- Bohm, G. and Jaenicke, R. (1992) Correlation functions as a tool for protein modeling and structure analysis. *Protein Sci.* 1: 1269-1278.
- Boldyrev, A.A. (2001) Na/K-ATPase as an oligomeric ensemble. *Biochemistry* 66: 821-831.
- Brahms, S. and Brahms, J. (1980) Determination of protein secondary structure in solution by vacuum ultraviolet circular dichroism. *J. Mol. Biol.* 38:149-178.
- Brotherus, J.R.; Jacobsen, L. and Jorgensen, P.L. (1983) Soluble and enzymatically stable Na,K-ATPase from mammalian kidney consisting predominantly of protomer  $\alpha\beta$ -units. Preparation, assay and reconstitution of active Na,K transport. *Biochem. Biophys.* 731: 290-303.
- Brouillette, C.G., Muccio, D.D., Finney, T.K. (1987) pH dependence of bacteriorhodopsin thermal unfolding. *Biochemistry* 26, 7431-7438.
- Bulheller, B.M.; Rodger, A. and Hirst, J.D. (2007) Circular and linear dichroism of proteins. *Phys Chem Phys* 9: 2020-2035.
- Cantor, C. and Timasheff, S.N. (1982) In the proteins. 3<sup>rd</sup> ed., Neurath, H. (ed.) Academic Press, N.Y. Vol V, p.145.
- Cavieses, J.D. (1987) The molecular size required varies according to the reaction step round the sodium pump cycle. *FEBS Lett.* 225: 145-50.
- Cevc, G. and Marsh, D. (1987) Phospholipid bilayers physical principles and models. John Wiley and Sons Ltd., Vol V, p. 442.
- Chen, Y-H.; Yang, J.T. and Chau, K.H. (1974) Determination of the Helix and  $\beta$  Form of Proteins in Aqueous Solution by Circular Dichroism. *Biochemistry* 13: 3350-3359.
- Chen, Y-H.; Yang, J.T. and Martinez, H.M. (1972) Determination of the Secondary of Proteins by Circular Dichroism and Optical Rotatory Dispersion. *Biochemistry* 11: 4120-4131.

- Chi, E.Y.; Krishnan, S.; Randolph, T.W. and Carpenter, J.F. (2003). Physical stability of proteins in aqueous solution: mechanism and driving forces in nonnative protein aggregation. *Pharmaceutical Research*. 20(9): 1325-1336.
- Chiaraluce, R.; Oost, J.; Lebbink, J.G.; Kaper T. and Consalvi, V. (2002) Persistence of tertiary structure in 7.9 M guanidinium chloride: the case of endo- $\beta$ -1,3-glucanase from *Pyrococcus furiosus*. *Biochemistry* 41: 14624-14632.
- Ciancaglini, P., Pizauro, J.M., Rezende, A.A., Rezende, L.A. and Leone, F.A. (1990) Solubilization of membrane-bound matrix-induced alkaline phosphatase with polyoxyethylene 9-lauryl ether (polidocanol): purification and metalloenzyme properties. *Int. J. Biochem.* 22(4):385-92.
- Colonna, T.; Kostich, M.; Hamrick, M.; Hwang, B.; Rawn, J.D. and Fambrough, D.M. (1997) Subunit interactions in the sodium pump. *Ann. N.Y Acad. Sci. (USA)* 834: 498-513.
- Costa, C.J.; Gatto, C. and Kaplan, J.H. (2003) Interactions between Na,K-ATPase alpha-subunit ATP-binding domains. *J Biol Chem.* 278: 9176-84.
- Dafnis, E. and Sabatini, S. (1994) *Biochemistry and pathophysiology of vanadium*. *Nephron* 67: 133-143.
- Davies, J.T. and Rideal, E.K., *Interfacial Phenomena*, Academic Press, New York, 1963.
- DeGrado, W.F.; Gratkowski, H. and Lear, J.D. (2003) How do helix-helix interactions help determine the folds of membrane proteins? Perspectives from the study of homo-oligomeric helical bundles. *Protein Sci.*12(4): 647-65.
- Deguchi, N.; Jorgensen, P.L. and Maunsbach, A.B. (1977) Ultrastructure of the sodium pump. Comparison of thin sectioning, negative staining, and freeze-fracture of purified, membrane-bound (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase. *J. Cell. Biol.* 75: 619-634.
- Deva, M.S.Z. and Behere, D.D. (1999). Fluorescence and circular dichroism spectroscopic studies on bovine lactoperoxidase. *Biometals*. 12: 219-225.
- Dill, K.A (1990). Dominant forces in protein folding. *Biochemistry*. 29: 7133-7155.
- Donnet, C.; Aristarkhova, E. and Sweadner, K.J. (2001) Thermal denaturation of the Na,K-ATPase provides evidence for alpha-alpha oligomeric interaction and gamma subunit association with the C-terminal domain. *J. Biol. Chem.* 276: 7357-7365.
- Eakle, K.A.; Kabalin, M.A.; Wang, S.G. and Farley, R.A. (1994) The influence of beta subunit structure on the stability of Na,K-ATPase complexes and interaction with K<sup>+</sup>. *J. Biol. Chem.* 269: 6550-6557.
- Ellis, R.J. and Minton, A.P. (2006) Protein aggregation in crowded environments. *Biol. Chem.* 387(5):485-97.
- Fainerman, V.B., Möbius, D. and Miller, R., *Surfactants: Chemistry, Interfacial Properties, Applications*, Elsevier: The Netherlands, 2001.
- Fambrough, D.M.; Lemas, M.V.; Hamrick, M.; Emerick, M.; Renaud, K.J.; Inman, E.M.; Hwang, B. and Takeyasu, K. (1994) Analysis of subunit assembly of Na,K-ATPase. *Am. J. Physiol.* 266: C579-C589.
- Farman, N. (1996) Na,K-pump expression and distribution in the nephron. *Miner. Electrolyte Metab.* 22: 272-278.
- Fedosova, N.U.; Cornelius, F. and Klodos, I. (1998) E2P phosphoforms of Na,K-ATPase. I. Comparison of phosphointermediates formed from ATP and Pi by

- their reactivity toward hydroxylamine and vanadate. *Biochemistry* 37: 13634-13642.
- Forbush, B.; Kaplan, J.H. and Hoffman, J.F. (1978) Characterization of a new photoaffinity derivative of ouabain: labeling of the large polypeptide and of a proteolipid component of the Na, K-ATPase. *Biochemistry* 17: 3667-3676.
- Franzoni, L.; Nicastro, G.; Pertinhez, T.A.; Tatò, M. Nakaie, C.R.; Paiva, A.C.M.; Shreier, S. and Spisni A. (1997) Structure of the C-terminal Fragment 300-320 of the Rat Angiotensin II AT<sub>1A</sub> Receptor and Its Relevance with Respect to G-Protein Coupling. *J. Biol. Chem.* 272: 9734-9741.
- Garty, H. and Karlish, S.J. (2005) FXYD proteins: tissue-specific regulators of the Na,K-ATPase. *Semin. Nephrol.* 25: 304-11.
- Gasset, M., Laynez, J., Menendez, M., Raussens, V. and Goormaghtigh, E. (1997) Structural domain organization of gastric H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and its rearrangement during the catalytic cycle. *J. Biol. Chem.* 272, 1608-1614.
- Geering, K. (2006) FXYD proteins: new regulators of Na-K-ATPase. *Semin. Nephrol.* 25: 304-311.
- Geering, K.T. (2001) The functional role of beta subunits in oligomeric P-type ATPases. *J. Bioenerg. Biomembr.* 33(5):425-38. Review.
- Geering, K. (2000) Topogenic motifs in P-type ATPases. *J. Membr. Biol.* 174: 191-190.
- Geering, K.; Beggah, A.; Good, P.; Girardet, S.; Roy, S.; Schaer, D. and Jaunin, P. (1996) Oligomerization and maturation of Na,K-ATPase: functional interaction of the cytoplasmic NH<sub>2</sub> terminus of the β subunit with the α subunit. *J. Cell. Biol.* 133: 1193-1204.
- Gennis, R.B. (1989) In: "Biomembranes: molecular structure and function". Springer-Verlag, Ed. Cantor C.R., p. 533.
- Gillespie, B. and Plaxco, K.W. (2004). Using protein folding gates to test protein folding theories. *Annu. Rev. Biochem.* 73: 837-859.
- Gloor, S.; Antonicek, H.; Sweadner, K.J.; Pagliusi, S.; Frank, R; Moos, M. and Schachner, M. (1990) The adhesion molecule on glia (AMOG) is a homologue of the β subunit of the Na,K-ATPase. *J. Cell Biol.* 110: 165-174.
- Glynn, I.M. (1985) The Na,K-transporting adenosine triphosphatase. In: A. N. Martonosi (Ed.), *The enzymes of biological membranes*. Vol 3, pp 35-114, Plenum Press, New York.
- Glynn, I.M. and Karlish, S.J.D. (1990) Occluded cations in active transport. *Annu. Rev. Biochem.* 59: 171-205.
- Gomez-Puyou, M.T.; Dominguez-Ramirez, L.; Reyes-Vivas, H.; Gomez-Puyou, A. (2001) Structural alterations and inhibition of unisite and multisite ATP hydrolysis in soluble mitochondrial F1 by guanidinium chloride. *Biochemistry* 40(11): 3396-402.
- Greenfield, N. and Fasman, G.D. (1969) Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry* 8: 4108-4116.
- Gresalfi, T.J. and Wallace, B.A. (1984) Secondary structural composition of the Na/K-ATPase E<sub>1</sub> and E<sub>2</sub> conformers. *J. Biol. Chem.* 259: 2622-2628.
- Grinberg, A.V.; Gevondyan, N.M.; Grinberg, N.V. and Grinberg, V.Y. (2001) The thermal unfolding and domain structure of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> - exchanging ATPase. A

- scanning calorimetry study. (2001) *Eur. J. Biochem.* 268: 5027-5036.
- Guo, J., Harn, N., Robbins, A., Dougherty, R. and Middaugh, C.R. (2006) Stability of Helix-Rich Proteins at High Concentrations. *Biochemistry* 45 : 8686-8696.
- Haltia, T. and Freire, E. (1995) Forces and factors that contribute to the structural stability of membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1241(2):295-322.
- Haltia, T., Semo, N., Arrondo, J.L., Goni, F.M. and Freire, E. (1994) Thermodynamic and structural stability of cytochrome *c* oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Biochemistry* 33, 9731-9740.
- Hartree, E.F. (1972) Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analyt. Biochem.* 48: 422-427.
- Hasler, U.; Crambert, G.; Horisberger, J.D. and Geering, K. (2001) Structural and functional features of the transmembrane domain of the Na,K-ATPase beta subunit revealed by tryptophan scanning. *J. Biol. Chem.* 276:16356-13364.
- Hasler, U.; Greasley, P.J.; von Heijne, G. and Geering, K. (2000) Determinants of topogenesis and glycosylation of type II membrane proteins. Analysis of Na,K-ATPase beta1 and beta3 subunits by glycosylation mapping. *J. Biol. Chem.* 275: 29011-29022.
- Hasler, U.; Wang, X.Y.; Crambert, G.; Beguin, P.; Jaisser, F.; Horisberger, J.D. and Geering, K. (1998) Hole of the beta-subunit domains in the assembly, stable expression, intracellular routing, and functional properties of Na,K-ATPase. *J. Biol. Chem.* 273: 30826-30835.
- Hayashi, Y.; Kobayashi, T.; Shinji, N.; Hagiwara, E.; Tahara, Y. and Takenaka (2000) In *Na/K-ATPase and related ATPases* (Taniguchi, K. and Kaya, S. eds) Elsevier Science, Amsterdam, pp. 357-364.
- Hayashi, Y.; Kameyama, K.; Kobayashi, T.; Hagiwara, E.; Shinji, N. and Takagi, T. (1997) Oligomeric structure of solubilized Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase linked to E1/E2 conformation *Ann. N.Y. Acad. Sci. USA* 834: 19-29.
- Hayashi, Y.; Mimura, K.; Matsui, H. and Takagi, T. (1989) Minimum enzyme unit for Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase is the alpha beta-protomer. Determination by low-angle laser light scattering photometry coupled with high-performance gel chromatography for substantially simultaneous measurement of ATPase activity and molecular weight. *Biochim. Biophys. Acta* 983: 217-229.
- Heimburg, T.; Esmann, M. and Marsh, D. (1997) Characterization of the Secondary Structure and Assembly of the Transmembrane Domains of Trypsinized Na,K-ATPase by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *J. Biol. Chem.* 272: 25685-25692.
- Heinonen, S.K. and Lathi, R.J (1981) A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. *Analyt. Biochem.* 113: 313-317.
- Hennerssey Jr., J.P. and Johnson Jr., W.C. (1981) Information Content in the Circular Dichroism of Proteins. *Biochemistry* 20: 1085-1094.
- Hiramatsu, H. and Kitagawa, T. (2005) FT-IR approaches on amyloid fibril structure. *Biochim. Biophys. Acta* 1753: 100-107.
- Horisberger, J.D. (2004) Recent insights into the structure and mechanism of the sodium pump. *Physiology (Bethesda)* 19:377-87.
- Ivanov, A.; Modyanov, N.N. and Askari, A. (2002) Role of the self-association of beta subunits in the oligomeric structure of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *Biochem. J.* 364:

- 293-299.
- Ivanov, A.; Zhao, H. and Modyanov, N.N. (2000) Packing of the transmembrane helices of Na,K-ATPase: direct contact between beta-subunit and H8 segment of alpha-subunit revealed by oxidative cross-linking. *Biochemistry* **39**: 9778-9785.
- Jaenicke, R. (1991). Protein folding: local structures, domains, subunits and assemblies. *Biochemistry* **30**: 3148-3161.
- Jaenicke, R. (1999) Stability and folding of domain proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **71**(2):155-241.
- Jaisser, F.; Horisberger, J.D. and Rossier, B.C. (1992) The beta subunit modulates potassium activation of the Na-K pump. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **671**:113-9.
- Johnson, A.E. (2005) Fluorescence approaches for determining protein conformations, interactions and mechanisms at membranes. *Traffic.* **6**(12):1078-92.
- Jorgensen, P.L. and Pedersen, P.A. (2001) Structure-function relationships of Na(+), K(+), ATP, or Mg(2+) binding and energy transduction in Na,K-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* **1505**: 57-74.
- Jorgensen, P.L., Hakansson, K.O. and Karlsh, S.J.D. (2003) Structure and Mechanism of Na, K-ATPase: Functional Sites and Their Interactions. *Annu. Rev. Physiol.* **65**: 817-849.
- Jorgensen, P.L. and Andersen, J.P. (1985) Thermoinactivation and Aggregation of  $\alpha\beta$  Units in Soluble and Membrane-Bound (Na,K)-ATPase. *Biochemistry* **25**: 2889-2897.
- Jorgensen, P.L.; Karlsh, S.J.D. and Gilter, C. (1982) Evidence for the organization of the transmembrane segments of (Na,K)-ATPase based on labeling lipid-embedded and surface domains of the alpha-subunit. *J. Biol. Chem.* **257**: 7435-7442.
- Kahn, T.W.; Sturtevant, J.M. and Engelman, D.M. (1992) Thermodynamic measurements of the contributions of helix-connecting loops and of retinal to the stability of bacteriorhodopsin. *Biochemistry* **31**, 8829-8839.
- Kalipatnapu, S. and Chattopadhyay, A. (2005) Membrane protein solubilization: recent advances and challenges in solubilization of serotonin1A receptors. *IUBMB Life.* **57**(7):505-12.
- Kaplan, J.H. (2002) Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annu. Rev. Biochem.* **71**: 511-535.
- Kelly, S.M.; Jess, T.J.; Price, N.C. (2005) How to study proteins by circular dichroism. *Biochim. Biophys. Acta* **1751**: 119-139.
- Kobayashi, T.; Hagiwara, E.; Shinji, N. and Hayashi, Y. (1997) pH-dependence change in the oligomeric structure of the solubilized Na,K-ATPase. *Ann. N. Y. Acad. Sci. USA* **834**: 132-134.
- Krumscheid, R.; Ettrich, R.; Sovova, Z.; Susankova, K.; Lansky, Z.; Hofbauerova, K.; Linnertz, H.; Teisinger, J.; Amler, E. and Schoner, W. (2004) The phosphatase activity of the isolated H4-H5 loop of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase resides outside its ATP binding site. *Eur. J. Biochem.* **271**(19):3923-36.
- Lakowicz, J.R. Principles of fluorescence Spectroscopy (1983). Plenum Press. p. 495.

- Le Maire, M., Champeil, P. and Moller, J.V. (2000) Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. *Biochim. Biophys. Acta* 1508(1-2) : 86-111.
- Le Maire, M., Lind, K.E., Jorgensen, K.E., Roigaard, H. and Moller, J.V. (1978) Enzymatically Active  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase from Sarcoplasmic Reticulum Membranes, Solubilized by Nonionic Detergents. *The J. of Biological Chemistry*, 253(19) : 7051-7060.
- Lepock, J.R., Rodahl, A.M., Zhang, C., Heynen, M.L., Waters, B., Cheng, K.H. (1990) Thermal denaturation of the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase of sarcoplasmic reticulum reveals two thermodynamically independent domains. *Biochemistry* 29, 681-689.
- Lingrel, J.B. and Kuntzweiler, T. (1994) Na,K-ATPase. *J. Biol. Chem.* 269: 19659-19662.
- Lingrel, J.B.; Van Huysse, J.; O' Brien, W.; Jewell-Motz, E. and Schultheis, P. (1994) Na,K-ATPase: structure-function studies. *Ren. Physiol. Biochem.* 17: 198-200.
- Linnertz, H.; Lastres Becker, I.; Krumscheid, R.; Amler, E.; Thoengs, D. and Schoner, W. (1997) , 2'(3')-O-[N-[2-[3-[5-fluoresceinyl]thioureido]ethyl]carbamoyl] adenosine 5'-triphosphate and its  $\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_4$  and  $\text{Co}(\text{NH}_3)_4$  complex derivatives are new fluorescent tools for labelling ATP binding sites of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. *Physiol. Res.* 46: 345-349.
- Linnertz, H.; Urbanova, P.; Obsil, T.; Herman, P.; Amler, E. and Schoner, W. (1998) Molecular distance measurements reveal an  $(\alpha\beta)_2$  dimeric structure of Na,K-ATPase – high affinity ATP binding site and  $\text{K}^+$ -activated phosphatase reside on different alpha-subunits. *J. Biol. Chem.* 273: 28813-28821.
- Lopina, O.D. (2001) Interaction of Na,K-ATPase catalytic subunit with cellular proteins and other endogenous regulators. *Biochemistry (Mosc)*. 66: 1122-31.
- Lutsenko, S. and Kaplan, J.H. (1993) An essential role for the extracellular domain of the Na,K-ATPase beta-subunit in cation occlusion. *Biochem.* 32: 6737-6743.
- MacGregor, S.E. and Walker, J.M. (1993) Inhibitors of the Na,K-ATPase. *Comp. Biochem. Physiol.*, 105C: 1-9.
- Madan, P.; Rose, K. and Watson, A.J. (2007) Na/K-ATPase beta1 subunit expression is required for blastocyst formation and normal assembly of trophectoderm tight junction-associated proteins. *J. Biol. Chem.* 282: 12127-12134.
- Mahaney, J.E.; Girard, J.P. and Grisham, C.M. (1990) Saturation transfer EPR measurements of the rotational motion of a strongly immobilized ouabain spin label on renal Na,K-ATPase. *FEBS Lett.* 260: 160-164.
- Malik, N.; Canfield, V.A.; Beckers, M.C.; Gros, P. and Levenson, R. (1996) Identification of the mammalian Na,K-ATPase  $\beta_3$  subunit. *J. Biol. Chem.* 271: 22754-22758.
- Manavalan, P. and Johnson Jr., W.C. (1987) Variable selection method improves the prediction of protein secondary structure from circular dichroism. *Anal. Biochem.* 167: 76-85.
- Manning, M.C. (2005) Use of infrared spectroscopy to monitor protein structure and stability. *Expert. Rev. Proteomics.* 2(5):731-43.
- Martin, D.W.; Marecek, J.; Scarlata, S. and Sachs, J.R. (2000)  $\alpha\beta$  protomers of

- Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase from microsomes of duck salt gland are mostly monomeric: Formation of higher oligomers does not modify molecular activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 97: 3195-3200.
- Martin, D.W. (2005) Structure-function relationships in the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-pump. *Semin. Nephrol.* 25: 282-91.
- Martin-Vasallo, P.; Dackowski,W.; Emanuel, J.R. and Levenson, R. (1989) Identification of a putative isoforma of the Na,K-ATPase beta subunit. Primary structure and tissue-specific expression. *J. Biol. Chem.* 264: 4613-4618.
- Maunsbach, A.B; Skriver, E. and Hebert, H. (1991) Two-dimensional crystals and three-dimensional structure of Na,K-ATPase analyzed by electron microscopy. *Soc. Gen. Physiol. Ser.* 46: 159-172.
- Mayr, L.M. and Schmid J. (1993) Stabilization of a protein by guanidinium chloride. *Biochemistry* 32: 7994-7998.
- Mierlo, C.P.M.; Jongh, H.H.J and Visser, J.W.G. (2000). Circular dichroism of protein in solution and at interfaces. *Applied spectroscopy reviews.* 35(4): 277-313.
- Mimura, K.; Matsui, H.; Takagi, T. and Hayashi, Y. (1993) Change in oligomeric structure of solubilized Na,K-ATPase induced by octaethylene glycol dodecyl ether, phosphatidylserine and ATP. *Biochim. Biophys. Acta* 1145: 63-74.
- Minetti, C.A., Remeta, D.P. (2006) Energetics of membrane protein folding and stability. *Arch Biochem Biophys.* *In Press*
- Miyazawa, T. and Blout E.R. (1961) The infrared spectra of polypeptides in various conformations: amide I and II bands. *J. Am. Chem. Soc.* 83: 712-719.
- Neet, K.E. and Timm, D.E (1994) Conformational stability of dimeric proteins: quantitative studies by equilibrium denaturation. *Protein Sci.* 3(12):2167-74.
- Nelson, D.L. and Cox, M.M. (2002). *Lehninger Princípios de Bioquímica*. Sarvier, São Paulo, S.P. 3<sup>a</sup> edição.
- Noguchi, S.; Mutoh, Y. and Kawamura, M. (1994) The functional roles of the disulfide bonds in the β-subunit of Na,K-ATPase as studied by site directed mutagenesis. *FEBS Lett.* 341: 233-238.
- Norby, J.G. and Jensen, J. (1971) Binding of ATP to brain microsomal ATPase. Determination of the ATP-binding capacity and the dissociation constant of the enzyme-ATP complex as a function of K<sup>+</sup> concentration. *Biochim. Biophys. Acta* 233:104-16.
- Norby, J.G. and Jensen, J. (1989) A model for the stepwise radiation inactivation of the alpha 2-dimer of Na,K-ATPase. *J. Biol. Chem.* 264:19458-19558.
- O'Brien, W.J.; Lingrel, J.B. and Wallick, E.T. (1994) Ouabain binding kinetics of the rat alpha two and alpha three isoforms of the sodium-potassium adenosine triphosphate. *Arch. Biochem. Biophys.* 310: 32-39.
- Panayiotidis, M.I.; Bortner, C.D. and Cidlowski, J.A. (2006) On the mechanism of ionic regulation of apoptosis: would the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase please stand up? *Acta Physiol (Oxf)*. 187(1-2):205-15.
- Pancoska, P.; Yasui, S.C. and Keiderling, T.A. (1991) Statistical analyses of the vibrational circular dichroism of selected proteins and relationship to secondary structures. *Biochemistry* 30: 5089-5103.
- Pedemonte, C.H. and Kaplan, J.H. (1990) Chemical modification as an approach



- to elucidation of sodium pump structure-function relations. *Am. J. Physiol.* 258: C1-C23.
- Perczel, A.; Hollosi, M.; Tusnady, G. and Fasman, G.D. (1991) Convex constraint analysis: a natural deconvolution of circular dichroism curves of proteins. *Protein Eng.* 4: 669-79.
- Periyasama, S.M.; Huang, W.Y. and Askari, A. (1983) Subunit associations of (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-dependent adenosine triphosphatase. Chemical cross-linking studies. *J. Biol. Chem.* 258(16):9878-85.
- Pestov, N.B.; Adams, G.; Shakhparonov, M.I. and Modyanov, N.N. (1999) Identification of a novel gene of the X,K-ATPase beta-subunit family that is predominantly expressed in skeletal and heart muscles. *FEBS Lett.* 456: 243-248.
- Popot, J.L. and Engelman, D.M. (1990) Membrane protein folding and oligomerization: the two-stage model. *Biochemistry* 29: 4031-4037.
- Post, R.L.; Kume, S.; Tobim, T.; Orcutt, B. and Sem, A.K. (1969). Flexibility of an active center in sodium-plus-potassium adenosine triphosphatase. *J. Gen. Physiol.* 54: 306-326.
- Pressley, T.A. (1996) Structure and function of the Na,K pump: ten years of molecular biology. *Miner. Electrolyte Metab.* 22: 264-271.
- Privalov, P.L. and Dragan, A.I. (2007) Microcalorimetry of biological macromolecules. *Biophys. Chem.* 126: 16-24.
- Privé, G.G. (2007) Detergents for the stabilization and crystallization of membrane proteins. *Methods* 41: 388-397.
- Provencher, S.W. and Glockner, J. (1981) Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry* 20: 33-37.
- Pyrpassopoulos, S.; Vlassi, M.; Tsortos, A.; Papanikolaou, Y.; Petratos, K.; Vorgias, C.E. and Nounesis, G. (2006) Equilibrium heat-induced denaturation of chitinase 40 from *Streptomyces thermoviolaceus*. *Proteins* 64(2):513-23.
- Rajasekaran, S.A.; Barwe, S.P. and Rajasekaran, A.K. (2005) Multiple functions of Na,K-ATPase in epithelial cells. *Semin. Nephrol.* 25: 328-34.
- Rice, W.J.; Young, H.S.; Martin, D.W.; Sachs, J.R. and Stokes, D.L. (2001) Structure of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase at 11-Å resolution: comparison with Ca<sup>2+</sup>-ATPase in E1 and E2 states. *Biophys. J.* 80: 2187-2197.
- Rigos, C.F.; Santos, H.L.; Ward, R.J. and Ciancaglini, P. (2006) Lipid bilayer stabilization of the Na,K-ATPase reconstituted in DPPC:DPPE-liposomes. *Cell Biochem. and Biophys.* 44: 438-445.
- Rigos, C.F.; Santos, H.L.; Thedei, G.J.; Ward, R.J. and Ciancaglini, P. (2003) Influence of enzyme conformational changes on catalytic activity investigated by circular dichroism spectroscopy. *Biochemistry and molecular biology education.* 31(5): 329-332.
- Rigos, C.F. (2003) Padronização da técnica de dicróismo circular para o estudo da estrutura da Na,K-ATPase: binômio estrutura-função. Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto. (p. 83)
- Rodger, A. and Ismail, M.A. (2000) In: Spectrophotometry and Spectrofluorimetry a practical approach. Edited by Michael G. Gore, Oxford University Press, New York.

- Shamraj, O.I. and Lingrel J.B. (1994) A putative fourth Na(+),K(+)-ATPase alpha-subunit gene is expressed in testis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 12952-12956.
- Santos, H.L., Rigos, C.F. and Ciancaglini, P. (2006) Kinetics behaviors of Na,K-ATPase: comparison of solubilized and DPPC:DPPE-liposome reconstituted enzyme. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 142(3-4) : 309-16.
- Santos, H.L.; Lopes, M.L.; Maggio, B. and Ciancaglini, P. (2005) Na,K-ATPase reconstituted in liposomes: effects of lipid composition on hydrolytic activity and enzyme orientation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 41: 239-248.
- Santos, H.L. and Ciancaglini, P. (2003) A kinetic characterization of the Na,K-ATPase from the rabbit outer renal medulla: properties of the  $(\alpha\beta)_2$  dimer. *Comp. Biochem. Physiol.* 135: 539-549.
- Santos, H.L.; Lamas, R.P. and Ciancaglini, P. (2002) Solubilization of Na,K-ATPase from rabbit kidney outer medulla using only C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 35: 277-288.
- Santos, H.L. and Ciancaglini, P. (2000) A practical approach to the choice of a suitable detergent and optimal conditions to solubilize a membrane protein. *Biochem. Educ.* 28: 178-182.
- Salonikidis, P.S., Kirichenko, S.N., Tatjanenko, L.V., Schwarz, W. and Vasilets, L.A. (2000) Extracellular pH modulates kinetics of the Na(+),K(+)-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1509(1-2):496-504.
- Sarvazyan, N.A.; Modyanov, N.N. and Askari, A. (1995) Intersubunit and intrasubunit contact regions of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase revealed by controlled proteolysis and chemical cross-linking. *J. Biol. Chem.* 270: 26528-26532.
- Schmid, F.X. (1990) *Protein Structure: A Practical Approach*. Creighton, T. E. (ed.), Irl Press at Oxford University Press, (England).
- Schoner, W.; Thöges, D.; Hamer, E.; Antolovic, R.; Buxbaum, E.; Willeke, M.; Serpersu, E.H. and Scheiner-Bobis, G. (1994) In *The Sodium Pump* (Bamberg, E. and Schoner, W. eds.) Springer, New York 332-341.
- Seddon, A.M, Curnow, P. and Booth, P.J. (2004) Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochim. Biophys. Acta.* 1666(1-2):105-17.
- Sehgal, P. and Otzen, D.E. (2006) Thermodynamics of unfolding of an integral membrane protein in mixed micelles. *Protein Sci.* 15(4):890-9.
- Shukla, N.; Bhatt, A.N.; Aliverti, A.; Zanetti, G.; Bhakuni, V. (2005). Guanidinium chloride- and urea-induced unfolding of FprA, a mycobacterium NADPH-ferredoxin reductase: stabilization of an apo-protein by GdmCl. *FEBS J.* 272(9): 2216-24.
- Shull, G.E.; Lane, L.K. and Lingrel, J.B. (1986) Amino-acid sequence of the beta-subunit of the (Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>) ATPase deduced from a cDNA. *Nature.* 321:429-431.
- Skou, J.C. (1998) The identification of the sodium-potassium pump (Nobel Lecture). *Angewandt Chemie* 37: 2320-2328.
- Skou, J.C. and Esmann, M. (1992) The (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase. *J. Bioenergetics Biomembranes* 24: 249-261.
- Sreerama, N. and Woody, R.W. (2004) On the analysis of membrane protein circular dichroism spectra. *Protein Sci* 13: 100-112.

- Sreerama, N. and Woody, R.W. (2000) Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal. Biochem.* 287(2): 252-60.
- Sreerama, N. and Woody, W. (1994) Protein secondary structure from circular dichroism spectroscopy. *J. Mol. Biol.* 242: 497-507.
- Sreerama, N. and Woody, R.W. (1993) A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism. *Anal. Biochem.* 209: 32-44.
- Srinivas, V.R.; Reddy, G.B.; Ahmad, N.; Swaminathan, C.P.; Mitra, N. and Surolia, A. (2001) Legume lectin family, the 'natural mutants of the quaternary state', provide insights into the relationship between protein stability and oligomerization. *Biochim. Biophys. Acta.* 1527(3): 102-11.
- Surewicz, W.K.; Leddy, J.J. and Mantsch, H.H. (1990) Structure, stability, and receptor interaction of cholera toxin as studied by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Biochemistry* 29 : 8106-8111.
- Sweadner, K.J. (1989) Isozymes of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta.* 988(2):185-220.
- Takeda, K. and Kawamura, M. (2001) The functional unit of Na,K-ATPase is a monomeric alphabeta protomer. *Biochem. Biophys Res. Commun.* 280: 1364-1366.
- Taniguchi, K.; Kaya, S.; Abe, K. and Mardh, S. (2001) The oligomeric nature of Na/K-transport ATPase. *J. Biochem.* 129(3): 335-342.
- Tanoue, K., Kaya, S., Hayashi, Y., Abe, K., Imagawa, T., Taniguchi, K. and Sakaguchi, K. (2006) New evidence for ATP binding induced catalytic subunit interactions in pig kidney Na/K-ATPase. *J. Biochem. (Tokyo)*. 140(4):599-607.
- Therien, A.G. and Blostein, R. (2000) Mechanisms of sodium pump regulation. *Am. J. Physiol.* 279: C541-C566.
- Therien, A.G.; Karlsh, S.J.D. and Blostein, R. (1999) Expression and functional role of the gamma subunit of the Na, K-ATPase in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 274: 12252-12256.
- Thoenges, D. and Schoner, W. (1997) 2'-O-Dansyl analogs of ATP bind with high affinity to the low affinity ATP site of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and reveal the interaction of two ATP sites during catalysis. *J. Biol. Chem.* 272: 16315-16321.
- Toumadje, A.; Alcorn, S.W. and Johnson, W.C.Jr. (1992) Extending CD spectra of proteins to 168 nm improves the analysis for secondary structures. *Anal. Biochem.* 200: 321-331.
- Toyoshima, C.; Nakasako, M.; Nomura, H. and Ogawa, H. (2000) Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature* 405: 647-655.
- Treuheit, M.J., Kosky, A.A. and Brems, D.N. (2002) Inverse Relationship of Protein Concentration and Aggregation. *Pharmaceutical Research*, 19(4) : 511-516.
- Tsou, C.L. (1995) Inactivation precedes overall molecular conformation changes during enzyme denaturation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1253(2):151-62.
- Tsuda, T.; Kaya, S.; Yokoyama, T.; Hayashi, Y. and Taniguchi, K. (1998) ATP and acetyl phosphate induces molecular events near the ATP binding site and the membrane domain of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. The tetrameric nature of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 273: 24334-24338.
- van Stokkum, I.H.; Spoelder, H.J.; Bloemendal, M.; van Grondelle, R. and Groen,

- F.C. (1990) Estimation of protein secondary structure and error analysis from circular dichroism spectra. *Anal. Biochem.* 191:110-118.
- Vasilets, L.A. and Schwarz, W. (1993) Structure-function relationships of cation binding in the Na,K-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 1154: 201-222.
- Vilsen, B.; Andersen, J.P.; Petersen, J. and Jorgensen, P.L. (1987) Occlusion of  $^{22}\text{Na}^+$  and  $^{86}\text{Rb}^+$  in membrane-bound and soluble protomeric alpha beta-units of Na,K-ATPase. *J. Biol. Chem.* 262: 10511-10517.
- Ward, D.G. and Cavieres, J.D. (1993) Solubilized  $\alpha\beta$  Na,K-ATPase remains protomeric during turnover yet shows apparent negative cooperativity toward ATP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 5332-5336.
- Ward, D.G. and Cavieres, J.D. (1996) Binding of 2'(3')-O-(2,4,6-trinitrophenyl)ADP to soluble alpha beta protomers of Na,K-ATPase modified with fluorescein isothiocyanate. Evidence for two distinct sites. *J. Biol. Chem.* 271: 12317-12321.
- Woo, A.L.; James, P.F. and Lingrel, J.B. (2000) Sperm motility is dependent on unique isoform of the Na,K-ATPase. *J. Biol. Chem.* 275: 20693-20699.
- Wu, L.N.; Genge, B.R.; Kang, M.W.; Arsenault, A.L. and Wuthier, R.E. (2002) Changes in phospholipid extractability and composition accompany mineralization of chicken growth plate cartilage matrix vesicles. *J. Biol. Chem.* 277: 5126-5133.
- Xie, Z. and Cai, T. (2003) Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase-mediated signal transduction: from protein interaction to cellular function. *Mol Interv.* 3(3):157-68.
- Yang, J.T.; Wu, C.S. and Martinez, H.M. (1986) Calculation of protein conformation from circular dichroism. *Methods Enzymol.* 130: 208-269.
- Yeagle, P.L. (1993) Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance in membrane fusion studies. *Methods Enzymol.* 220: 68-79.
- Yokoyama, T.; Kaya, S.; Abe, K.; Taniguchi, K.; Katoh, T.; Yazawa, M.; Hayashi, Y. and Mardh, S. (1999) Acid-labile ATP and/or ADP/P(i) binding to the tetraprotomeric form of Na/K-ATPase accompanying catalytic phosphorylation-dephosphorylation cycle. *J. Biol. Chem.* 274: 31792-31796.
- Zhang, Y.X.; Song, X.H.; Yan, S.L. and Zhou, H.M. (2003) The unfolding intermediate state of calf intestinal alkaline phosphatase during denaturation in guanidine solutions. *J. Protein. Chem.* 22(5):405-9.
- Zhao, H.; Pestov, N.B.; Korneenko, T.V.; Shakhparonov, M.I. and Modyanov, N.N. (2004) Accumulation of beta (m), a structural member of X,K-ATPase beta-subunit family, in nuclear envelopes of perinatal myocytes. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 286(4): C757-C767.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)