

08/00

Marco Antonio Flores Rivera

**ENDOR de Prótons e Nitrogênios de Nitrosil
Hemoproteínas**

Tese de Doutorado

Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas

Rio de Janeiro

Fevereiro de 2000

Dedicatória

A María e Francisco

Agradecimentos

Aos orientadores George Bemski e Eliane Wajnberg por todas as orientações, ensinamentos e apoio durante a realização deste trabalho.

A Delson Schramm pelas discussões sobre a metodologia de seleção de orientações de ENDOR e uso do programa GENDOR.

Ao professor Pedro Pascutti e Alan da Silva pela ajuda na realização das otimizações das estruturas e discussão dos resultados.

A minha família inteira, que a distância me apoiou incondicionalmente. A todos meus grandes amigos.

A CAPES, pelo apoio financeiro.

RESUMO

Ressonância dupla eletrônica e nuclear (ENDOR) foi usada para estudar prótons e nitrogênios em nitrosil mioglobina (MbNO) e nitrosil hemoglobina (HbNO). Espectros de ENDOR de prótons e nitrogênios foram obtidos para diferentes valores de campo magnético a 10 K. A análise destes espectros foi feita usando simulação, baseada no princípio de seleção de orientações. Esta metodologia foi aplicada com o objetivo de separar, nas suas componentes, a complicada superposição dos espectros.

Considerando a superposição das simetrias rômica e axial, presentes em sistemas Fe^{2+} -NO em nitrosil hemoproteínas, as direções de campo que contribuem em determinado valor de campo do espectro de EPR são obtidas. Como as frequências de ressonância nuclear dos espectros de ENDOR dependem da orientação das moléculas em relação ao campo magnético aplicado, espectros de ENDOR foram obtidos para diferentes valores de campo magnético do espectro de EPR, para analisar a dependência angular da interação hiperfina e assim determinar a localização do respectivo núcleo.

Espectros de ENDOR de ^{14}N de MbNO e HbNO foram obtidos entre 5 K e 40 K para estudar a interação hiperfina entre o complexo $\text{N}(\text{HisF8})\text{-Fe}^{2+}\text{-N}(\text{NO})$ e o N_ϵ da histidina próxima. Os espectros não mudam nesta faixa de temperatura. A dependência com campo magnético destes espectros foi simulada a 10 K, considerando as duas simetrias do complexo paramagnético (rômica e axial). Os tensores hiperfino e quadrupolar foram obtidos das simulações para ambas simetrias em cada nitrosil hemoproteína. Os valores principais dos tensores são próximos aos previamente reportados por EPR e ENDOR considerando somente a simetria rômica. No entanto em nosso trabalho, a superposição das simetrias rômica e axial leva a uma melhor reconstrução dos espectros experimentais.

Nos espectros de prótons as simulações nos permitem observar diferenças entre as simetrias rômica e axial de nitrosil hemoproteínas, diferenças entre cadeias α e β de HbNO, e diferenças entre prótons dum mesmo amino ácido. Prótons da His-E7 e Val-E11 são identificados em ambas simetrias da MbNO e HbNO. Nossos resultados

indicam que estes resíduos estão no interior do bolso da heme e ajudam a estabilizar as duas conformações.

Os espectros de ENDOR de prótons de HbNO entre 5 K e 45 K foram parcialmente simulados. Estas simulações indicam mudanças nas interações hiperfinas de alguns prótons que podem ser associadas com mudanças conformacionais da proteína. Duas possibilidades são propostas, a primeira envolve uma mudança na orientação do ligante, e a outra envolve variações nas posições dos amino ácidos na região distal do bolso da heme.

ABSTRACT

Electron nuclear double resonance (ENDOR) spectroscopy has been used to study protons and nitrogens in nitrosyl myoglobin (MbNO) and nitrosyl hemoglobin (HbNO). ^1H and ^{14}N ENDOR spectra were recorded for different settings of the magnetic field at 10 K. The analysis of the ENDOR powder spectra was performed using computer simulation, based on the "orientation-selection" principle. This methodology was applied in order to separate the complicated overlapping spectra into their components.

First, an analysis of the heme iron-NO system EPR spectrum of nitrosyl heme proteins was performed considering the superposition of rhombic and axial symmetries, to determine the field directions that contribute to the EPR spectrum at any given field magnitude. The nuclear resonant frequencies of ENDOR spectra depend on the relative orientation of molecules with respect to the applied field. ENDOR data were collected at a series of EPR magnetic field values; the angular dependence of the hyperfine energy was measured and analyzed to determine the location of the ligand nuclei.

^{14}N ENDOR spectra of MbNO and HbNO were recorded between 5 K and 40 K to study the hyperfine interaction between the $\text{N}(\text{HisF8})\text{-Fe}^{2+}\text{-N}(\text{NO})$ complex and N_e of the proximal histidine. The spectra are temperature independent for both proteins. The magnetic field dependence of ENDOR spectra at 10 K is reproduced by simulations which involve the two different symmetries of the $\text{N}(\text{HisF8})\text{-Fe}^{2+}\text{-N}(\text{NO})$ complex (rhombic and axial). The ^{14}N hyperfine and quadrupolar tensors are obtained from simulations for both symmetries in each nitrosyl heme protein, the principal values of these tensors are close to those previously reported by EPR and ENDOR spectroscopies considering only a rhombic symmetry. However in our work, the superposition of rhombic and axial symmetries allows for a better reconstruction of experimental spectra. The ^{14}N hyperfine and quadrupolar tensors were not considered coincident.

In the case of protons, it is possible to observe differences between the rhombic and axial symmetries of MbNO and HbNO, differences between α and β chains of HbNO, and differences between protons from a given amino acid. Protons from His-E7

and Val-E11 residues are identified in the two symmetries. Our results indicate that both residues are present inside the heme pocket and help to stabilize one particular conformation.

The temperature dependence of ^1H ENDOR spectra of HbNO between 5 K and 45 K was partially reproduced by simulations, which indicate changes in the hyperfine interactions of several protons due to conformational changes in the protein. Two possibilities are proposed, one involves a change in the ligand orientation and the other one involves changes in the position of the amino acid residues in the heme pocket.

Sumário

Resumo.....	IV
Abstract.....	VI
Lista de Figuras.....	X
Lista de Tabelas.....	XIV
Introdução.....	XV

Capítulo 1.- Óxido Nítrico e as Hemoproteínas

1.1.- <u>Introdução</u>	1
1.2.- <u>Óxido Nítrico em Sistemas Biológicos</u>	1
1.3.- <u>Hemoproteínas</u>	2
1.3.1.- <u>Mioglobina</u>	4
1.3.2.- <u>Hemoglobina</u>	5
1.4.- <u>Nitrosil Hemoproteínas</u>	8
1.4.1.- <u>Ligação com NO</u>	9
1.5.- <u>Referências</u>	15

Capítulo 2.- Ressonância Magnética Dupla Eletrônica e Nuclear (ENDOR)

2.1.- <u>Conceitos e objetivos da espectroscopia ENDOR</u>	18
2.2.- <u>O Hamiltoniano de um sistema de spins eletrônico e nuclear</u>	18
2.3.- <u>O experimento de Feher e o princípio da técnica de ENDOR</u>	22
2.4.- <u>Descrição simplificada do experimento de ENDOR transiente</u>	23
2.5.- <u>ENDOR de estado estacionário</u>	25
2.6.- <u>ENDOR em amostras policristalinas: Princípio da seleção de orientações moleculares</u>	27
2.7.- <u>Referências</u>	31

Capítulo 3.- Materiais e Métodos

3.1.- <u>Preparação de Amostras</u>	32
3.2.- <u>Medidas de EPR e ENDOR</u>	32
3.3.- <u>Simulações dos espectro de ENDOR</u>	33
3.3.1.- <u>Simulações para ^1H (prótons)</u>	34

3.3.2.- Simulações para ^{14}N	38
3.4.- <u>Metodologia usada pelo programa THOR</u>	40
3.4.1.- O Campo de Força.....	40
3.4.2.- Otimização da Geometria Molecular.....	41
a) O algoritmo “ <i>steepest-descent</i> ” para minimização de energia.....	42
b) Métodos dos gradientes conjugados.....	43
3.5.- <u>Referências</u>	43

Capítulo 4.- Resultados

4.1.- <u>Introdução</u>	45
4.2.- <u>Medidas de ENDOR de ^{14}N da histidina próxima</u>	47
4.3.- <u>Medidas de ENDOR de ^1H</u>	54
4.3.1.- Nitrosil Mioglobina.....	54
4.3.2.- Nitrosil Hemoglobina.....	61
4.3.3.- Variação do espectro de ENDOR de prótons de HbNO com a temperatura...70	
4.4.- <u>Referências</u>	71

Capítulo 5.- Discussão e Conclusões

5.1.- <u>Otimização das estruturas de MbNO e HbNO</u>	72
5.2.- <u>Papel da His-E7 e Val-E11 em nitrosil hemoproteínas</u>	77
5.4.- <u>Conclusões</u>	80
5.3.- <u>Referências</u>	81

Lista de Figuras

Figura 1.1.- Grupo Heme; o grupo heme se liga à porção proteica da Hb e Mb através dos grupos carboxilatos, das posições 6 e 7.....	3
Figura 1.2.- Molécula de mioglobina.....	4
Figura 1.3.- Estrutura quaternária da Hb mostrando o arranjo das quatro subunidades...6	
Figura 1.4.- Estrutura do grupo heme, mostrando as histidinas próxima F8 e distal E7; o círculo achurado representa a posição do 6º ligante.....	7
Figura 1.5.- Espectro de EPR em banda Q de MbNO a 300 K (acima) junto com a simulação (abaixo) usando 2.040, 2.035 e 1.999 para os valores principais de g	10
Figura 1.6.- Superposição dos grupos prostéticos de Mb obtidos por raios-X em 300 K (*) e 100 K.....	11
Figura 1.7.- Geometria da ligação do grupo NO-heme em MbNO reconstruído por ENDOR, a 5 K.....	12
Figura 1.8.- Espectros de EPR, da diferença entre HbNO(R) e HbNO(T) (acima adireita), α -NO(t) (acima a esquerda), α -NO(r) (embaixo a esquerda), e β -NO (embaixo a direita).....	14
Figura 2.1.- Transições permitidas de EPR e NMR em um sistema de spins com $S = I = \frac{1}{2}$	20
Figura 2.2.- Diagrama de populações dos níveis de energia para ENDOR transiente com $S = I = \frac{1}{2}$, $A > 0$, $g_n > 0$, $A/2 > \nu_n$. (a) EPR não saturado; (b) EPR saturado; (c) aplicação da RF; (d) segundo sinal de ENDOR.....	24
Figura 2.3.- Diagrama de níveis de energia, na aproximação de campo magnético alto, para a interação magnética de um elétron desemparelhado ($S = \frac{1}{2}$) com um núcleo de $I = \frac{1}{2}$ e para $\nu_n > A/2$. As seta sólidas representam transições de EPR e NMR induzidas, as setas tracejadas representam as taxas de relaxação.....	26
Figura 2.4.- Ângulos polares que descrevem a direção do vetor campo magnético aplicado, H , e a direção do vetor r que conecta o centro paramagnético com o núcleo no sistema de coordenadas do tensor g	27
Figura 3.1.- Localização do centro de spin reduzido na simetria axial.....	35
Figura 3.2.- Espectro de ENDOR de prótons no caso de interação hiperfina isotrópica	36

Figura 3.3.- Espectros de ENDOR simulados: (a) Comportamento dos espectros com a orientação para o próton HNE2 da His-E7 para simetria rômbrica nas direções correspondentes aos valores g indicados, (b) Espectros de três diferentes prótons na vizinhança do complexo paramagnético para um campo magnético correspondente a uma direção intermediária ($g = 2.0065$) para simetria axial e (c) para simetria rômbrica.....	37
Figura 3.4.- Espectro de ENDOR de ^{14}N no caso de interações hiperfina e quadrupolar isotrópicas e coincidentes com o tensor g	38
Figura 3.5.- Espectros de ENDOR de ^{14}N , (a) para freqüências maiores, (b) para freqüências menores e (c) composição considerando diferentes intensidades causadas por relaxação cruzada.....	39
Figura 4.1.- Espectros de EPR em banda X de MbNO e HbNO a 10 K.....	45
Figura 4.2.- Componentes do espectro de EPR em banda Q de MbNO a 40 K. (a) espectro experimental, (b) componente rômbrica e (c) componente axial.....	46
Figura 4.3.- Espectros de ENDOR de ^{14}N de MbNO em 3245 G e 3345G a 10 K.....	47
Figura 4.4.- Espectros experimental a 10 K e simulado de ENDOR de ^{14}N de MbNO em 3238 G.....	48
Figura 4.5.- Espectros experimental a 10 K e simulado de ENDOR de ^{14}N de MbNO em 3345 G, mostrando as suas respectivas componentes.....	48
Figura 4.6.- Espectros de ENDOR de ^{14}N de HbNO a 10 K, em função do campo magnético.....	49
Figura 4.7.- Espectros experimental a 10 K e simulado de ENDOR de ^{14}N de HbNO em 3252 G.....	50
Figura 4.8.- Espectros experimental a 10 K e simulado de ENDOR de ^{14}N de HbNO em 3349 G, e suas respectivas componentes.....	50
Figura 4.9.- Ilustração das direções máximas e mínimas dos tensores A e P em relação a configuração geométrica da His-F8 e o complexo paramagnético no caso axial.....	52
Figura 4.10.- Espectros de ENDOR de ^{14}N de MbNO em 3238 G a 10 K e 40 K.....	53
Figura 4.11.- Espectros de ENDOR de prótons de MbNO a 10 K em campos magnéticos correspondentes aos fatores g indicados.....	54
Figura 4.12.- Espectros de ENDOR de prótons de MbNO em $g = 2.0065$ a 4 K e 40K.....	55

Figura 4.13.- Espectros experimentais de ENDOR de prótons de MbNO a 10 K para diferentes valores de campo magnético.....	56
Figura 4.14.- Composição típica dos espectros de ENDOR de prótons de MbNO simulados para um campo magnético de 3345 G. As cinco superiores correspondem à estrutura axial e as oito seguintes à estrutura rômbrica.....	57
Figura 4.15.- Espectros de ENDOR de prótons de MbNO, experimentais e simulados para diferentes valores de campo magnético a 10 K. A seta indica a posição da linha dos prótons matriciais.....	58
Figura 4.16.- Espectros experimentais de ENDOR de prótons de HbNO a 10 K para diferentes valores de campo magnético.....	61
Figura 4.17.- Espectros de ENDOR de prótons de HbNO em $g = 2.0065$ a 10 K e 45 K. As linhas tracejadas indicam uma variação no valor da interação hiperfina nessa direção.....	62
Figura 4.18.- Espectros de ENDOR de prótons de HbNO, experimentais e simulados para 3225 G, 3242 G e 3249 G a 10 K.....	63
Figura 4.19.- Composição dos espectros de ENDOR de prótons de HbNO simulados, para um campo magnético de 3242 G (somente simetria rômbrica). As cinco componentes superiores correspondem às cadeias α , as seis seguintes às cadeias β e as duas últimas a os prótons da heme considerados equivalentes para as duas cadeias.....	64
Figura 4.20.- Composição dos espectros de ENDOR de prótons de HbNO simulados, para um campo magnético de 3366 G (superposição de simetrias rômbrica e axial). De cima para baixo, a primeira componente corresponde a soma das simetrias rômbrica de cadeias α e β , as quatro seguintes à simetria axial de cadeias α , as três seguintes às cadeias β e a última a os prótons da heme considerados equivalentes para as duas cadeias.....	65
Figura 4.21.- Espectros de ENDOR de prótons de HbNO, experimentais e simulados em 3276 G, 3297 G, 3324 G, 3352 G e 3363 G a 10 K.....	67
Figura 4.22.- Espectro de ENDOR de prótons de HbNO a 45 K na região que apresenta variação com a temperatura. Ajuste com os novos parâmetros (linha contínua grossa), ajuste com os parâmetros de 10 K (linha contínua fina) e componentes (linhas tracejadas).....	70

- Figura 5.1.- Estruturas finais de MbNO tanto para a simetria (a) axial quanto para a simetria (b) rômica mostrando os prótons identificados por ENDOR (verde). Ferro (laranja), nitrogênio (azul), carbono (cinza) e oxigênio (vermelho).....74
- Figura 5.2.- Estruturas finais da simetria rômica para (a) α -NO, (b) para β -NO mostrando os prótons identificados por ENDOR (verde). Ferro (laranja), nitrogênio (azul), carbono (cinza) e oxigênio (vermelho).....75
- Figura 5.3.- Estruturas finais da simetria axial para (a) α -NO, (b) para β -NO mostrando os prótons identificados por ENDOR (verde). Ferro (laranja), nitrogênio (azul), carbono (cinza) e oxigênio (vermelho).....76
- Figura 5.4.- Estrutura da conformação A_0 de MbCO a baixa temperatura, obtida por raios-X.....78

Lista de Tabelas

Tabela 4.1.- Parâmetros de ajuste das simulações dos espectros de ENDOR de ^{14}N a 10 K para MbNO e HbNO.....	51
Tabela 4.2.- Parâmetros de ajuste das simulações dos espectros de ENDOR de prótons, considerando os prótons identificados em nitrosil mioglobina.....	59
Tabela 4.3.- Coordenadas dos prótons identificados em MbNO em relação ao sistema de eixos de g com origem no centro de spin reduzido, obtidos dos parâmetros da Tabela 4.2.....	60
Tabela 4.4.- Parâmetros de ajuste das simulações dos espectros de ENDOR de prótons de nitrosil hemoglobina.....	68
Tabela 4.5.- Coordenadas dos prótons identificados em HbNO em relação ao sistema de eixos de g com origem no centro de spin reduzido, obtidos dos parâmetros da Tabela 4.4.....	69

Introdução

Desde as primeiras determinações de susceptibilidade magnética de hemoproteínas por Pauling na década dos 30^{as}, muito esforço foi gasto para obter uma descrição completa da estrutura eletrônica e detalhes do funcionamento da ligação de O₂ ao Fe das hemoproteínas. Este objetivo não foi ainda alcançado.

Esta tese é um passo na direção da melhor compreensão deste problema. O uso do óxido nítrico (NO) no lugar de O₂ é estimulado pelo caráter paramagnético de HbNO em contraste com o diamagnético de HbO₂, o que permite a utilização de EPR e ENDOR, técnicas físicas sofisticadas que levam à determinação das posições e mudanças nestas posições dos amino ácidos vizinhos do Fe e do papel que estes jogam no processo da ligação reversível do ligante — seja NO ou O₂ — ao Fe. Neste trabalho foram usadas estas técnicas experimentais e métodos teóricos (programa THOR), para a determinação das estruturas.

No capítulo 1 é apresentada uma breve descrição da Mb e da Hb e as características do sítio ativo. Também é apresentada uma pequena revisão dos estudos em nitrosil hemoproteínas usando EPR e ENDOR.

No capítulo 2 apresentamos uma breve revisão da teoria geral de ENDOR e uma descrição da metodologia de seleção de orientações.

Materiais e métodos são apresentados no capítulo 3, onde descrevemos a metodologia de simulação dos espectros de ENDOR e a metodologia usada pelo programa THOR na otimização das estruturas.

No capítulo 4 são apresentados os nossos resultados, divididos em três partes, a primeira sobre as medidas de ENDOR de ¹⁴N, a seguinte sobre as medidas de ENDOR de ¹H (prótons) e a última sobre a dependência com a temperatura dos espectros de ENDOR de prótons de HbNO.

O capítulo 5 é de discussão e conclusões.

Capítulo 1

Óxido Nítrico e as Hemoproteínas

1.1.- Introdução

O óxido nítrico (NO) nas condições normais de pressão e temperatura, é um gás inorgânico, incolor, radical livre diatômico, bastante instável quimicamente e por isso bastante reativo, o que gera dificuldades de manutenção em laboratório, pois reage com oxigênio formando óxido nítrico (NO₂). Entretanto, o NO não reage com a água nem com alcalinos, o que permite sua armazenagem e separação em relação ao óxido nítrico.

Até 1987 o NO era considerado somente pelas suas características como poluente (estando associado a chuvas ácidas) e por sua potencial toxicidade. Nas pesquisas, era utilizado como sonda paramagnética em estudos estruturais de hemoproteínas, ligando-se fortemente ao ferro, em substituição ao oxigênio. Depois de ter sido identificado como o fator regulador da pressão sanguínea, inúmeras funções biológicas têm sido atribuídas a este radical livre. Incontáveis trabalhos e pesquisas têm sido apresentados à comunidade científica. O estudo do óxido nítrico tem atraído muitos pesquisadores das mais diversas áreas, evidenciando sua característica interdisciplinar, especialmente pela possibilidade de aplicação de diversas espectroscopias físicas, em nosso caso particular Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR) e Dupla Ressonância Eletrônica e Nuclear (ENDOR).

1.2.- Óxido Nítrico em Sistemas Biológicos

Embora o óxido nítrico (NO) tenha começado a ser estudado em sistemas biológicos no início dos anos 80, foi no início da década de 90 que apareceram diversas pesquisas e trabalhos envolvendo o NO endógeno, sendo eleito “A molécula do ano 1992” pela Sociedade Americana para o Avanço da Ciência,^[1] e culminou com o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina de 1998 para R. Furchgott, L. Ignarro e F. Murad.

O NO é biossintetizado a partir do amino ácido L-arginina* por uma família de enzimas conhecidas como óxido nítrico sintetases cujas três mais estudadas são a neuronal (nNOS), a

indutiva (*i*NOS) e a endotelial (*e*NOS).^[2] Sua síntese aparece não só em seres humanos como também em diversos animais tais como moscas da fruta, caranguejos, galinhas, trutas,^[3] e insetos hematófagos.^[4] Sua mais freqüente função associada a processos biológicos é a de mensageiro neurológico,^[5] neurotransmissão, modulando níveis de cGMP no cérebro, como por exemplo no aprendizado olfativo.^[6] Porém atividades associadas ao NO já foram relatadas na regulação da proliferação celular;^[7] na modulação de inflamações e condições patológicas,^[8] pela sua ação quando sintetizado por macrófagos,^[9] e por meio de oxidação.^[10] Efeitos negativos do NO liberado como resposta do sistema imunológico também foram divulgados.^[11]

Na vasodilatação e relaxação muscular foi identificado como sendo o Fator de Relaxamento Derivado do Endotélio (EDRF).^[12] Experimentos genéticos, envolvendo mutação no código genético da *e*NOS em ratos, mostram que a ausência da atividade do EDRF produz espécimens hipertensos.^[13] O NO também está relacionado a processos de broncodilatação,^[14] e exerce funções fisiológicas no músculo esquelético.^[15] Atua também como inibidor de atividades enzimáticas por meio de *S*-nitrosilação e oxidação.^[16]

Além das aplicações já efetivadas e as de decorrência direta das linhas de pesquisa anteriormente citadas, outras conseqüências são esperadas da pesquisa com o NO. As principais seriam novos procedimentos terapêuticos para problemas circulatórios e processos inflamatórios,^[17] bem como a produção de fluidos sanguíneos artificiais.^[18] Anormalidades na produção endotelial de NO ocorrem na arteriosclerose, diabetes e hipertensão,^[19] abrindo-se assim, a possibilidade de novas formas de diagnóstico.

1.3.- Hemoproteínas

As hemoproteínas representam um grupo de proteínas de grande importância para os biólogos, bioquímicos e biofísicos. As hemoproteínas (hemoglobina, mioglobina, etc.) equivalem ao átomo de hidrogênio em física atômica, ou do silício nas décadas 1950-1960 em física do estado sólido; transformando-se em moléculas modelo da biofísica.

O centro ativo dessas moléculas é o grupo heme: um íon de ferro circundado por um anel porfirínico ligado a globina (cadeia polipeptídica) através de ligações iônicas com os

grupos carboxilatos dos amino ácidos nas posições 6 e 7 (Fig. 1.1).^[20] A presença do íon é essencial para o papel biológico desempenhado pelas hemoproteínas.

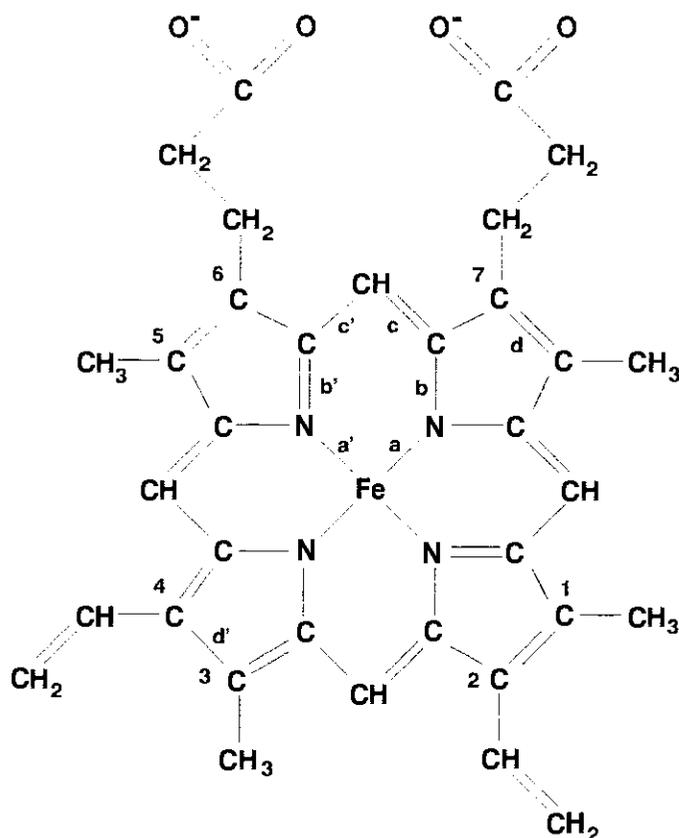


Figura 1.1.- Grupo Heme; o grupo heme se liga à porção proteica da Hb e Mb através dos grupos carboxilatos, das posições 6 e 7.

O ferro é um metal com propriedades magnéticas bem conhecidas. Permite o uso de várias técnicas físicas, tais como: susceptibilidade magnética, absorção ótica, espectroscopia Mössbauer, efeito Raman, ressonância magnética nuclear, ressonância paramagnética eletrônica, dupla ressonância eletrônica e nuclear, etc. Conseqüentemente, tem-se conseguido uma descrição bastante razoável da estrutura eletrônica do ferro em situações próximas às fisiológicas.

Em condições fisiológicas as hemoproteínas estão em estado oxigenado, com moléculas de O₂ ligadas ao ferro ou em estado desoxigenado, com a mesma posição desocupada. O ferro pode ligar-se a uma variedade de pequenas moléculas como: CO, H₂O, NO, CN, etc. A carga e o estado de spin do ferro (Fe^{2+} ou Fe^{3+}) dependem do ligante.

1.3.1.- Mioglobina

A mioglobina (Mb) é constituída de um grupo heme e de uma cadeia polipeptídica de 153 amino ácidos (peso molecular 17815 daltons, mioglobina de cachalote), arranjados em oito extensões de hélices α (denominadas de A até H) que formam um bolso com o grupo heme (Fig. 1.2). Todas as hélices são destrógeras e variam em comprimento de 7 a 26 resíduos. Dos 153 resíduos, 121 estão em região helicoidal. A molécula é um esferóide achatado nos polos, de aproximadamente 44 x 44 x 25 Å (Mb cachalote). É extremamente compacta, existe pouco espaço vazio em seu interior.

O papel da Mb é ligar e armazenar oxigênio. As fontes mais ricas de mioglobina são os músculos de mamíferos aquáticos tais como focas, baleias e leões marinhos que devem estocar O_2 por períodos relativamente longos. Foi do cachalote que John Kendrew, em 1962 obteve a Mb para a determinação da primeira estrutura por difração de raios-X da proteína.^[20]

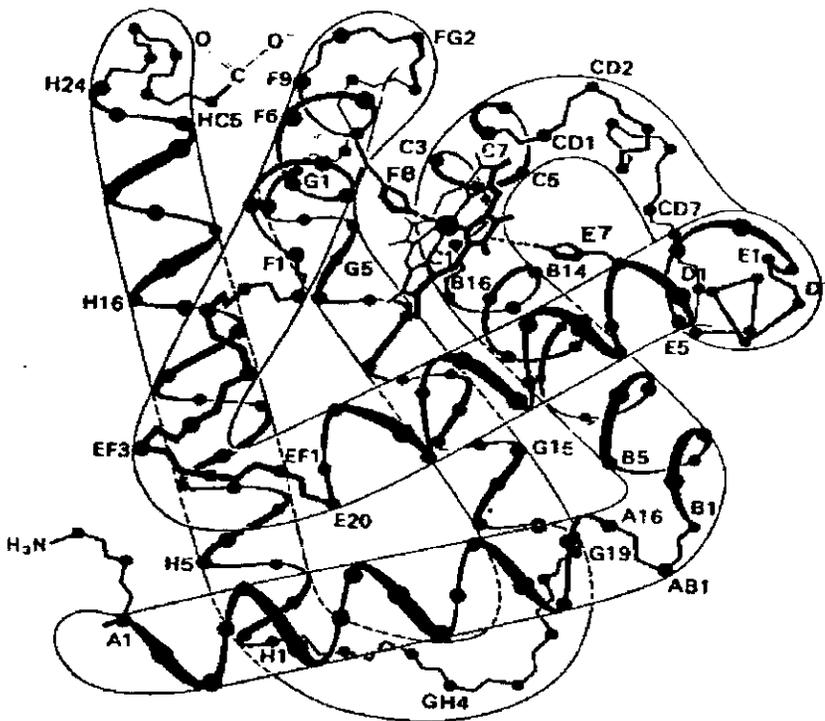


Figura 1.2.- Molécula de mioglobina.^[20]

As cadeias laterais dos vinte amino ácidos têm uma grande variedade de propriedades. Alguns são muito polares e outros são hidrofóbicos, influenciando assim as regiões da cadeia em que ocorrem para formar dobras assumindo aspecto de uma proteína globular. Os grupos laterais não polares dispõem-se no interior da molécula. Os resíduos que possuem tanto uma parte apolar quanto outra polar são orientados de modo que suas porções não polares dirijam-se para dentro. Os únicos resíduos polares dentro da Mb (e da Hb) são duas histidinas (oito na Hb), que têm funções importante no centro ativo. O exterior da molécula contém resíduos polares quanto não polares. Essa disposição deve, certamente, ter uma forte influência na solubilidade da Mb (e Hb). O grupo heme está localizado numa região apolar, que protege o estado ferroso do heme, da oxidação.

A estrutura tridimensional da mioglobina é a mesma para as diferentes espécies estudadas até o presente. Isso confirma que apesar da microheterogeneidade (mutações) na composição dos amino ácidos alguns devem ter suas posições conservadas na estrutura primária (seqüência) de modo a determinar a estrutura terciária da proteína.

1.3.2.- Hemoglobina

Dentre as mais abundantes proteínas de vertebrados, está a hemoglobina (Hb). Na corrente sangüínea existem em torno de cinco bilhões de células vermelhas (eritrócitos) por mililitro (ml), e cada uma contem 280 milhões de moléculas de hemoglobina, de peso molecular 64500 daltons (hemoglobina humana).^[20]

A molécula de Hb tem quatro cadeias proteicas, iguais duas a duas, chamadas α e β ; na Hb humana as cadeias α contêm 141 resíduos (amino ácidos) e as cadeias β contêm 146, num total de 574 amino ácidos. Associados a cada cadeia existe um grupo heme, o centro ativo da proteína. A Hb é uma molécula aproximadamente esférica, com uma cavidade central, e dimensões 64 x 50 x 50 Å (oxi-Hb de cavalo). Os grupos heme de cadeias α_2 e β_1 são particularmente próximos (60 Å), como são aqueles de α_1 e β_2 (Fig. 1.3).

O empacotamento de cadeias na molécula de Hb é tal que o contato entre as cadeias laterais existe entre subunidades diferentes (α e β), mas é pequeno o contato entre as cadeias iguais. Segundo Perutz os pontos de contato entre as cadeias diferentes são por interações

hidrofóbicas,^[21] enquanto entre as cadeias semelhantes são polares. Os contatos α e β são de dois tipos, os $\alpha_1 \beta_1$ e $\alpha_2 \beta_2$ são chamados contatos de empacotamento por representarem o empacotamento das subunidades que não mudam quando a molécula Hb vai da configuração desoxi para oxi; os contatos $\alpha_1 \beta_2$ e $\alpha_2 \beta_1$ são chamados contatos de deslizamento, uma vez que sofrem as principais mudanças quando há alteração no estado de ligação do ferro da heme. Ligações de hidrogênio e pontes salinas também são importantes para manter as subunidades juntas.^[20]

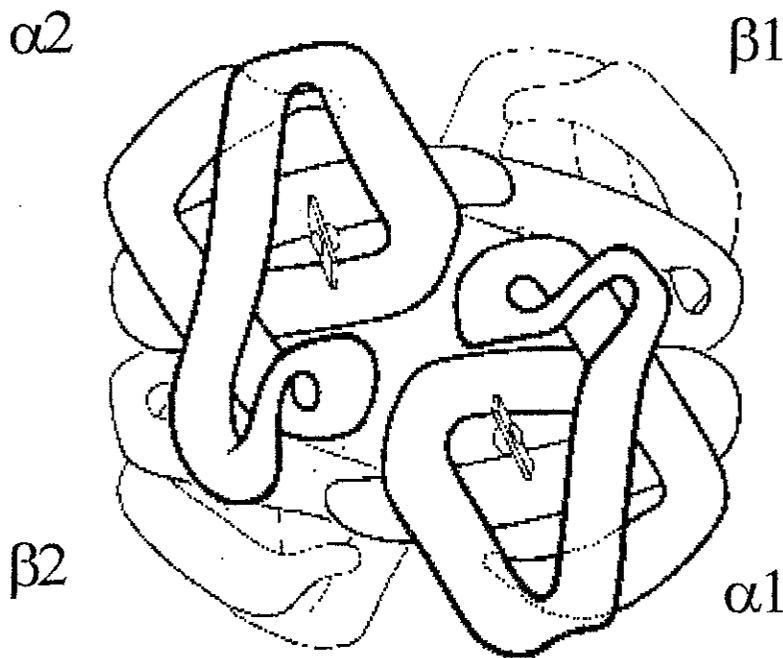


Figura 1.3.- Estrutura quaternária da Hb mostrando o arranjo das quatro subunidades.^[20]

Em geral o átomo de ferro tem seis ligantes em uma simetria octaedral. Nas hemoproteínas quatro ligantes são os átomos de N da própria heme, o 5º é o N do grupo imidazol da histidina próxima (His-F8) e a 6ª posição corresponde ao sítio de ligação do oxigênio, no caso fisiológico; e que pode também ser ocupado por outras moléculas tais como H_2O , CO , NO , etc. Ao lado do 6º ligante existe a histidina distal (His-E7) e a valina E11 (Val-E11) que estão muito distante do ferro para se ligar diretamente a ele, mas pode interagir fracamente com o 6º ligante (Fig. 1.4).

O papel da Hb é ligar o oxigênio (O_2) no ferro da heme, nos pulmões onde a pressão parcial de oxigênio é alta, transportá-lo através das artérias e liberá-lo nos tecidos onde a

pressão parcial de oxigênio é baixa, para a ação metabólica. A Hb também desempenha papel importante ao trazer o dióxido de carbono (CO_2) dos tecidos para os pulmões, através das veias. Este gás não é trazido através de ligação com os átomos de ferro, neste caso é transportado pelo nitrogênio das aminas terminais das cadeias e principalmente como íon bicarbonato (HCO_3^-) em solução.^[20] O transporte do íon bicarbonato é facilitado pelo aparecimento de um grupo ácido na Hb para cada molécula de O_2 liberada. O desaparecimento nos pulmões do grupo ácido, quando o oxigênio é novamente ligado à Hb da início a uma série de reações que leva ao desligamento do íon bicarbonato. Reciprocamente a presença de bicarbonato e ácido láctico nos tecidos acelera a liberação de oxigênio.^[21]

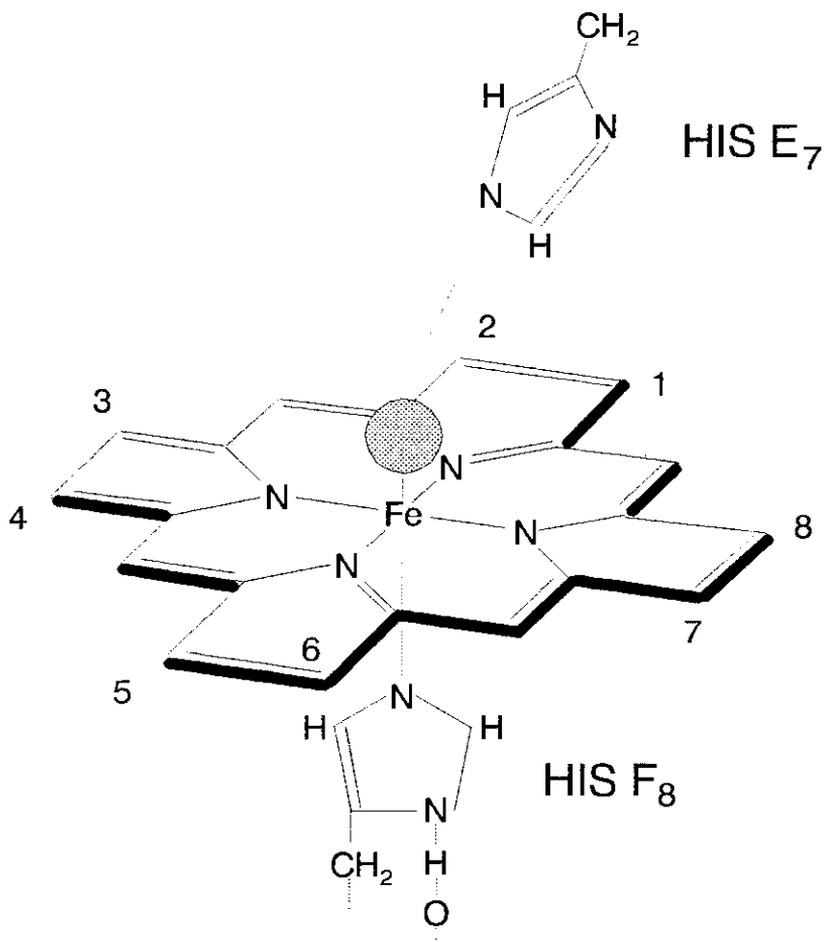


Figura 1.4.- Estrutura do grupo heme, mostrando as histidinas próxima F8 e distal E7; o círculo achurado representa a posição do 6º ligante.

Estudos recentes sugerem que a hemoglobina humana, além da sua função de transportar oxigênio, também participa ativamente na regulação do fluxo sanguíneo transportando o vasodilatador NO até tecidos hipóxicos e recolhendo NO dos tecidos onde o oxigênio é abundante. Mostrou-se que a hemoglobina sofre a *S*-nitrosilação *in vitro* e *in vivo*, e que o sítio de *S*-nitrosilação é, provavelmente, o grupo tiol reativo da Cys β 93.^[18]

Estudos recentes sugerem o seguinte mecanismo de regulação do fluxo sanguíneo pela hemoglobina humana *S*-nitrosilada. Nos pulmões, onde a pressão parcial de oxigênio é alta, a Hb encontra-se predominantemente oxigenada, rapidamente se ligando ao NO e formando SNO-oxiHb. *In vivo*, imagina-se que a SNO-oxiHb seja formada via reação de transnitrosilação com *S*-nitrosoglutationa (GSNO),^[18] assim como pela troca do grupo NO entre as subunidades do grupo heme- β e a Cys β 93.^[22] Depois de deixar os pulmões, a SNO-oxiHb circulante é exposta a níveis de O₂ que refletem o consumo local. Nos tecidos com baixa pressão de oxigênio, onde O₂ é altamente requisitado, SNO-oxiHb libera oxigênio. A desoxigenação da Hb reduz a afinidade da Cys β 93 por NO e leva à liberação de NO, quer seja como NO livre (ânion nitroxila) ou como GSNO.^[22] O NO reativo pode ser imediatamente religado a um sítio heme desocupado,^[22] enquanto a GSNO, mais estável, pode promover o influxo de O₂ nos tecidos hipóxicos, difundindo-se nos tecidos dos músculos lisos, dilatando vasos sanguíneos aumentando o fluxo de sangue.

Por outro lado, em tecidos sem atividade onde tanto a pressão parcial de oxigênio como o grau de saturação da Hb com O₂ são altos, a oxi-Hb coletaria o NO gerado pelo endotélio e inibiria a vasodilatação. Sugere-se que grupos com sulfidril, especialmente L-cisteína, desempenham um papel regulador no direcionamento do NO para as células vermelhas no plasma, portanto, equilibrando a concentração de NO.^[23]

1.4.- Nitrosil Hemoproteínas

A relação estrutura-função na hemoglobina (Hb) tem sido um tópico de extensiva pesquisa durante os últimos 30 anos ou mais.^[24] Porém, a contribuição da EPR no estudo do controle exercido pela globina na afinidade do oxigênio pelo grupo heme em proteínas tetraméricas, tem sido limitada, principalmente porque a molécula nativa é inacessível por EPR em ambas condições de oxigenação (deoxi-Hb, S =2; oxi-Hb, S = 0). Por isso muitos estudos

foram feitos com Fe^{3+} (met-heme), mas estes não dão informação do fenômeno associado com as alterações conformacionais induzidas na proteína nativa pela oxigenação (transição T-R).

Este problema pode ser tratado de duas maneiras: utilizando ligantes paramagnéticos, que não impedem mudanças estruturais; ou trocando o Fe por algum outro metal de transição que seja paramagnético em ambos estados de oxigenação. Nesta direção, duas ferramentas de relevante potencial apareceram: radical nitróxido (NO) que pode agir como ligante paramagnético ao Fe^{2+} , e Co^{2+} como substituto do ferro na associação com oxigênio, num caminho comparável ao fisiológico. Vamos a considerar somente a primeira.

1.4.1.- *Ligação com NO*

A maior parte da informação estrutural de sistemas heme foi obtida da ligação com NO, esta foi aplicada a hemoglobina (HbNO), mioglobina (MbNO), cadeias α e β isoladas (α NO, β NO), e modelos compostos tais como NO ligado ao Fe-tetrafenilporfirina-imidazol (Im-FeTPP-NO).^[25] O objetivo destes estudos é a caracterização das propriedades hiperfinas dos núcleos de nitrogênio e dos prótons nas vizinhanças da heme e entender os efeitos destes átomos sobre a transição de conformação induzida pela variação de pH e efeitos alostéricos em HbNO.^[26] Mas a reconstrução da estrutura destes complexos a partir dos dados obtidos por EPR e ENDOR encontrou dois obstáculos, descritos a seguir.

Dois espectros de EPR diferentes aparecem em complexos NO-heme hexa-coordenados. Eles estão associados a duas geometrias diferentes. As amplitudes relativas destes espectros variam com a temperatura. Para mioglobina, esta situação foi estudada primeiro em solução congelada em banda-X (9.5 GHz) por Morse e Chan (1980),^[27] que também estudaram outros complexos de NO-heme. Estes autores consideram que os dois espectros se devem a duas posições do ferro em relação ao plano da heme, abaixo e acima, levando a diferenças na distância de ligação para N_ϵ da His-F8. Hori, Ikeda-Saito e Yonetani (1981)^[28] trabalhando com monocristais consideram que os espectros observados se devem a dois ângulos de ligação Fe-N-O. A configuração dominante em 300 K mostra uma ligação Fe-N-O quase linear (ângulo de ligação de 153°), com um pequeno desvio ($\approx 20^\circ$) entre a normal da heme e a ligação Fe-N. Este ângulo aumenta (Fe-N $\approx 35^\circ$) e a ligação Fe-N-O se dobra a 77 K ($\approx 110^\circ$), sendo a componente dominante nos espectros a esta temperatura.

A configuração dominante a 77 K nestes compostos foi bem caracterizada, no entanto não aquela dominante nos espectros a 300 K. Existe a questão, se esta é a configuração indicada por Morse e Chan (1980),^[27] no seu modelo de equilíbrio. Nesse estudo de solução, encontrou-se que a espécie a 300 K tem simetria axial e esta contribui em forma minoritária em baixas temperaturas. Porém, o tensor g dado por Hori *et al.* (1981)^[28] e por Nitschke (1982)^[29] para a configuração de MbNO a temperatura ambiente é rômbo.

Medidas de EPR em banda Q (35 GHz) de MbNO em solução mostram uma forte evidência de que o espectro a 300 K possui simetria axial com uma leve distorção rômboica, como é mostrado na Fig. 1.5 junto com uma simulação.^[29] O sinal em $g = 2.04$, que é freqüentemente tomado como indicador da presença da configuração a temperatura ambiente, coincide com os dados propostos por Morse e Chan (1980) para esta espécie.^[27] Talvez as forças de empacotamento nos monocristais induzam uma geometria levemente diferente da solução, embora os resultados obtidos por Hori *et al.* (1981) não favoreçam a proposta dum equilíbrio com duas componentes.^[28]

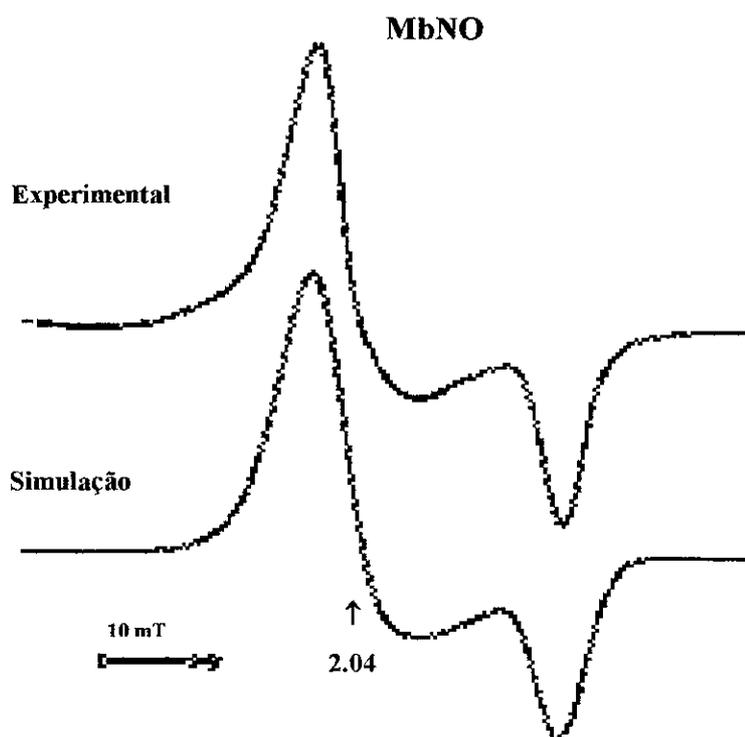


Figura 1.5.- Espectro de EPR em banda Q de MbNO a 300 K (acima) junto com a simulação (abaixo) usando 2.040, 2.035 e 1.999 para os valores principais de g .^[29]

A situação ficou mais complexa ainda desde que se observou que os espectros de EPR em banda Q de HbNO e MbNO apresentam dois tipos de mudanças em função da temperatura, na faixa entre 19 K e 200 K. A primeira pode ser associada a existência de duas espécies paramagnéticas, uma com simetria rômbrica e outra com simetria axial. E a segunda, é observada pelas variações nos valores dos fatores g e das larguras de linhas; para a espécie rômbrica associadas à variação de orientação do ligante Fe-NO e para a axial com à variação na distância entre Fe e N da histidina próxima.^[30]

Outro problema deriva da flexibilidade do esqueleto da proteína com a temperatura. A Fig. 1.6 mostra uma superposição das estruturas de Mb obtidas por raios-X em 300 K e 100 K,^[31] indicando um grande deslocamento dos resíduos de amino ácidos na vizinhança da heme. ENDOR é mais preciso na determinação das posições dos prótons e as suas variações com a temperatura.

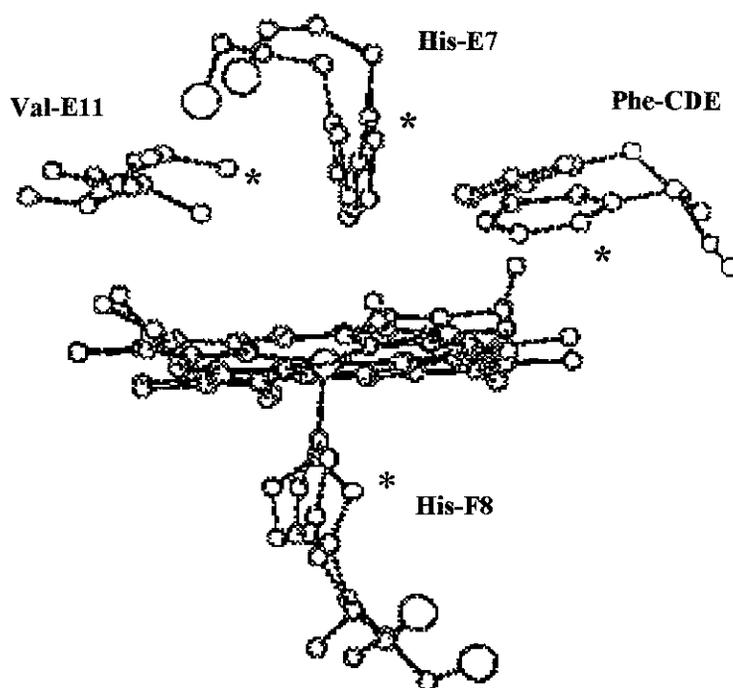


Figura 1.6.- Superposição dos grupos prostéticos de Mb obtidos por raios-X em 300 K (*) e 100 K.^[29]

Para se obter uma estrutura coerente, é necessária a aplicação de outras técnicas além de EPR e ENDOR. Estas duas técnicas foram primeiramente aplicadas a MbNO e combinadas com raios-X levam para a geometria representada na Fig. 1.7. A configuração do NO ligado e da

histidina próxima mostrada nesta figura são resultados da análise de EPR em monocristais de $^{15}\text{N}(\text{NO})$,^[29] e dos dados obtidos por ENDOR a 5 K usando os tensores de interação de ^{14}N (N_ϵ -HisF8),^[32] respectivamente. A geometria resultante é introduzida na estrutura de met-Mb, obtida por raios-X com H_2O como ligante, em baixas temperaturas.^[31] Tudo isto é normalizado em relação ao plano da heme, que é considerado invariante na sua posição sobre efeito de resfriamento, esta hipótese é baseada no resultado anterior em met-Mb.^[33] No entanto, é provável que a temperaturas muito baixas, esta estrutura dos 5° e 6° ligantes derivada por ENDOR esteja refletindo transições estruturais provenientes do resfriamento do cristal.

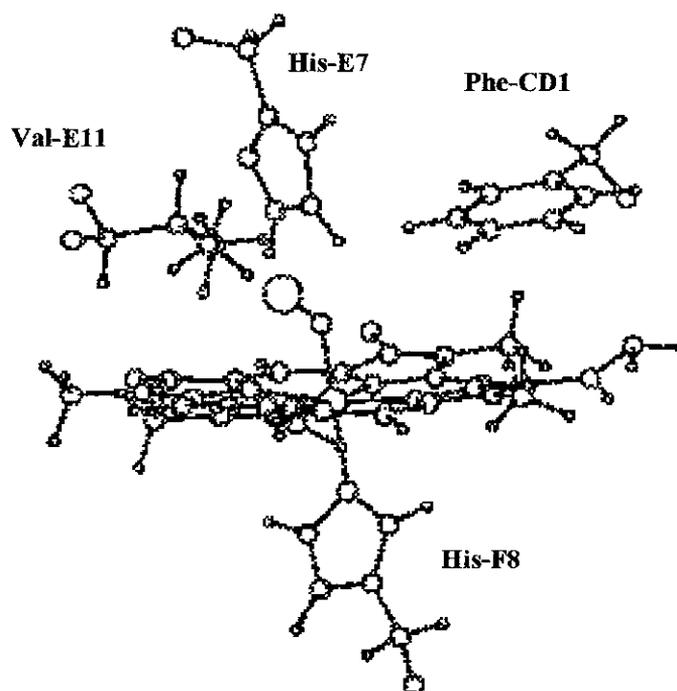


Figura 1.7.-Geometria da ligação do grupo NO-heme em MbNO reconstruído por ENDOR, a 5 K.^[29]

Os dados proporcionados por Hori *et al.*,^[28] para os tensores g e A [$\text{N}(\text{NO})$] de cristal de MbNO foram confirmados numa pesquisa independente no laboratório de Hüttermann usando EPR em monocristais, no entanto, um erro nos sinais dos cosenos diretores do tensor A foi detectado.^[29] A determinação do tensor A por EPR é limitada, porem uma estimativa para o valor mínimo e direção pode ser estimada da variação da largura de linha.^[29] Uma análise posterior por ENDOR, onde a resolução é melhor, permitiu obter os dados necessários para determinar a direção do $\text{O}(\text{NO})$ como mostrada na Fig. 1.7. Outro alcance da resolução de ENDOR é a determinação da posição do átomo de N_ϵ da histidina próxima (F8).

MbNO assim como α NO tanto em cadeias isoladas como em HbNO (molécula tetramérica), sofrem uma transformação entre as duas simetrias com variação da temperatura. As cadeias β (β NO), por outro lado, mostram pequena variação dos espectros com a temperatura. Já que compostos do modelo hexa-coordenado como Im-Fe(TPP)-NO também tomam a forma rômica em baixas temperaturas,^[34] a tensão da proteína não deve ser responsável ou influenciar esta configuração na MbNO e α NO, mas deve impedir a ocupação da configuração rômica mais favorável energeticamente nas cadeias β .^[29] Esta proposta está de acordo com os dados de raios-X que indicaram que o bolso é usualmente muito menor na cadeia β do que na cadeia α e, de fato, que na Mb. Diferenças nas conformações de cadeias α e β foram também observadas num estudo de EPR em monocristais de HbNO.^[35]

Outro aspecto interessante em sistemas NO-heme é a transição R-T da estrutura quaternária da Hb. Hille *et al.* (1979) obtiveram pela primeira vez um espectro de EPR caracterizado por um triplete associado a um grupo NO-heme penta-coordenado.^[36] Com o objetivo de esclarecer as diferenças entre os espectros dos complexos hexa-coordenados mostra-se a Fig. 1.8. Observamos nela que os espectros das cadeias α -NO no estado r, e das β -NO correspondem a uma estrutura sem interação hiperfina, atribuídas a sistemas hexacoordenados. Por outro lado α -NO(t), pentacoordenada, exhibe estrutura hiperfina. A diferença HbNO(R)-HbNO(T) confirma que a variação entre α NO(t) e α NO(r) é responsável pelas mudanças dos espectros de HbNO.

A diferença nas distribuições de densidade de spin entre α NO(r) e α NO(t) explicam as três linhas hiperfinas intensas do ^{14}N do NO, que caracterizam a última conformação, interpretada como consequência da perda do imidazol como sexto ligante. Esta hipótese está de acordo com os resultados de EPR para o modelo de compostos penta-coordenados,^[37] e com os resultados de ENDOR de α NO no estado t.^[38] Pode-se mostrar claramente que a ligação do imidazol proximal se rompe com a diminuição do pH e/ou adição de efeitos alostéricos.^[29]

Os dados de ENDOR de prótons de monocristais de MbNO também dão informação limitada. Somente os prótons muito fracamente acoplados (≤ 1 MHz) na vizinhança da frequência livre (ν_n), a anisotropia e o número de linhas permitem uma identificação inequívoca das linhas ressonantes através dos três planos de medida; para os acoplamentos maiores, somente algumas orientações do cristal permitem uma análise dos dados. Em consequência, o

estudo em monocristais tem que ser feito usando simulações considerando os tensores adotados e a identificação dos prótons.^[32] Mesmo assim, não é possível a transferência destes dados para as conformações R e T de HbNO, já que não estão disponíveis as estruturas por raios-X das cadeias α , nos estados r e t, e cadeias β a baixa temperatura, uma vez que estudos de EPR mostram que a soma dos espectros destas três estruturas reconstrói os espectros de HbNO(R) e HbNO(T).^[39]

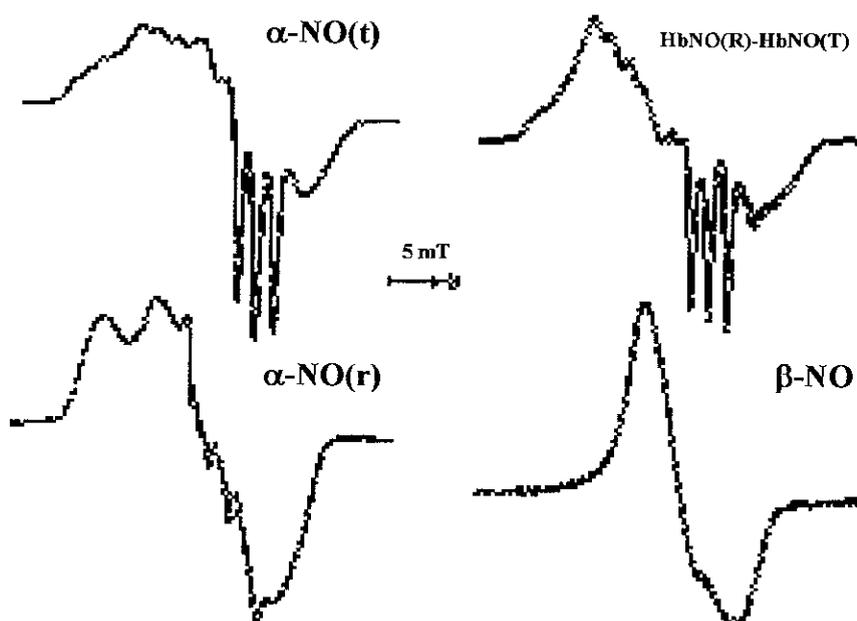


Figura 1.8.- Espectros de EPR, da diferença entre HbNO(R) e HbNO(T) (acima adireita), α -NO(t) (acima a esquerda), α -NO(r) (embaixo a esquerda), e β -NO (embaixo a direita).^[29]

Para prótons isto é particularmente importante já que os espectros de ENDOR de ambos estados de HbNO não são significativamente diferentes.^[40] Isto indica que cada uma das contribuições das duas cadeias em ambos estados diferem levemente ou que algumas orientações do tetrâmero apresentam predominantemente contribuições de uma subunidade que não muda. Estudos posteriores usando EPR em banda X e Q combinados com ENDOR em cadeias α e β isoladas e na proteína tetramérica usando ligantes híbridos: $(\alpha\text{-NO})_2(\beta\text{-CO})_2$ e $(\alpha\text{-CO})_2(\beta\text{-NO})_2$, ratificaram que a transição R-T envolve somente mudanças conformacionais na cadeia α , que inclui um distanciamento parcial da histidina F8.^[34]

1.5.- Referências

- [1] Y. Henry, M. Lepoivre, J. Drapier, C. Ducroco, J. Broucher e A. Guissani. 1993. *FASEB J.* **7**, 1124.
- [2] S. Moncada e A. Higgs. 1993. *New Engl. J. Med.* **329**, 2002. H. Cho, E. Martin, Q. Xie, S. Sassa e C. Nathan. 1995. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 11514. S. Snyder. 1994. *Nature.* **372**, 504. C. Galli, R. MacArthur, H. Abu-Soud, P. Clark, D. Stuehr e G. Brudvig. 1996. *Biochemistry.* **35**, 2804.
- [3] P. Feldman, O. Griffith e D. Stuehr. 1993. *C & EN.* **26**.
- [4] J. Ribeiro, J. Hazzard, R. Nussenzveig, D. Champagne e F. Walker. 1993. *Science.* **260**, 539.
- [5] Y. Zhao e M. Marletta. 1997. *Biochemistry.* **36**, 15959.
- [6] K. Kendrick, R. Guevara-Guzman, J. Zorrilla, M. Hinton, K. Broad, M. Mimmack e S. Ohkura. 1997. *Nature.* **388**, 670.
- [7] J. Clark, C. Green e R. Motterlini. 1997. *Biochem. Bioph. Res. Co.* **241**, 215.
- [8] D. Reif e R. Simmons. 1990. *Arch. Biochem. Biophys.* **283**, 537.
- [9] J. Lancaster Jr. e J. Hibbs Jr. 1990. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **87**, 1223.
- [10] V. O'donnell, P. Chumley, N. Hogg, A. Bloodsworth, V. Darley-USmar e B. Freeman. 1997. *Biochemistry.* **36**, 15216.
- [11] M. Palacios, J. Padron, L. Glaria, A. Rojas, R. Delgado, R. Knowles e S. Moncada. 1993. *Biochem. Bioph. Res. Co.* **196**, 280.
- [12] J. Davis, X. Vo, P. Sulakhe. 1997. *Biochem. Bioph. Res. Co.* **238**, 351.
- [13] P. Huang, Z. Huang, H. Mashimo, K. Bloch, M. Moskowitz, J. Bevan e M. Fishman. 1995. *Nature.* **377**, 239.
- [14] B. Gaston, J. Reilly, J. Drazen, J. Fackler, P. Ramdev, D. Arnelle, M. Mullins, D. Sugarbaker, C. Chee, D. Singel, J. Loscalzo e J. Stamler. 1993. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **90**, 10957.
- [15] L. Kobzik, M. Reid, D. Bredt e J. Stamler. 1994. *Nature.* **372**, 546.
- [16] S. Mohr, B. Zech, E. Lapetina e B. Brüne. 1997. *Biochem. Bioph. Res. Co.* **238**, 387.
- [17] J. Ochoa, A. Uderwu, T. Billiar, R. Curran, F. Cerra, R. Simmons e A. Peitzman. 1991. *Ann. Surg.* **214**, 621. C. Nathan. 1992. *FASEB J.* **6**, 3051.
- [18] L. Jia, C. Bonaventura, J. Bonaventura e J. Stamler. 1996. *Nature.* **380**, 221.
- [19] S. Moncada e A. Higgs. 1993. *New Engl. J. Med.* **329**, 2002.

-
- [20] R. Dickerson e I. Geis. "Hemoglobin". *The Benjamin Cumming Publishing Company*. 1983.
- [21] M. Perutz. 1964. *Sci. Ame.* **211**, 64.
- [22] A. Gow e J. Stamler. 1998. *Nature*. **391**, 169.
- [23] D. Pietraforte, M. Cinzia, G. Scorza e M. Minetti. 1995. *Biochemistry*. **34**, 7177.
- [24] M. Perutz, G. Fermi, B. Luisi, B. Shaanan e R. Liddington. 1987. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. **52**, 555.
- [25] Y. Henry e R. Banerjee. 1973. *J. Mol. Bio.* **73**, 469. M. Perutz, J. Kilmartin, K. Nagai, A. Szabo e S. Symon. 1976. *Biochemistry*. **15**, 378. M. Chevion, J. Salhany, J. Peisach, W. Blumberg e S. Simon. 1978. *Biochemistry*. **17**, 1745. H. Morse e S. Chan. 1980. *J. Biol. Chem.* **225**, 7876. H. Hori, M. Ikeda-Saito e T. Yonetani. 1981. *J. Biol. Chem.* **256**, 7849. I. Caracelli, N. Meirelles, M. Tabak, O. Filho e O. Nascimento. 1988. *Biochim. Biophys. Acta*. **955**, 315. E. Wajenberg, M. Linhares, L. El-Jaick e G. Bemski. 1992. *Eur. Biophys. J.* **21**, 57. J. Hüttermann, C. Burgard e R. Kappl. 1994. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **90**, 3077. E. Wajenberg, G. Bemski, L. El-Jaick e O. Alves. 1996. *Int. J. Biol. Macromol.* **18**, 231. M. Flores, E. Wajenberg e G. Bemski. 1997. *Biophys. J.* **73**, 3225.
- [26] M. Höhn, J. Hüttermann, J. Chien e L. Dickinson. 1983. *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 109. J. Hüttermann e R. Kappl. "Metal Ions in Biological Systems". *H. Sigel, ed., New York*. 1987. R. Kappl e J. Hüttermann. 1989. *Israel J. Chem.* **29**, 73. R. Kappl e J. Hüttermann. "Advanced EPR: Applications in Biology and Biochemistry". *Elsevier, Amsterdam*. 1989. J. Hüttermann, C. Burgard e R. Kappl. 1994. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **90**, 3077.
- [27] H. Morse e S. Chan. 1980. *J. Biol. Chem.* **225**, 7876.
- [28] H. Hori, M. Ikeda-Saito e T. Yonetani. 1981. *J. Biol. Chem.* **256**, 7849.
- [29] J. Hüttermann. "Biological Magnetic Resonance: EMR of Paramagnetic Molecules". *Plenum Press, New York and London*. 1993.
- [30] M. Flores, E. Wajenberg e G. Bemski. 1997. *Biophys. J.* **73**, 3225.
- [31] H. Hartmann, F. Parak, W. Steigemann, G. Petsko, D. Ringe-Ponzi e H. Frauenfelder. 1982. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **79**, 4967.
- [32] R. Kappl e J. Hüttermann. 1989. *Israel J. Chem.* **29**, 73.
- [33] J. Bennett, J. Gibson e D. Ingram. 1957. *Proc. R. Soc., Ser. A.* **240**, 67.
- [34] J. Hüttermann, C. Burgard e R. Kappl. 1994. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **90**, 3077.
- [35] D. Doetschman e S. Utterback. 1981. *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 2847.
- [36] R. Hille, J. Olson e G. Palmer. 1979. *J. Biol. Chem.* **254**, 12110.

-
- [37] W. Scheidt e M. Frisse. 1975. *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 17.
- [38] M. Höhn, J. Hüttermann, J. Chien e L. Dickinson. 1983. *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 109.
- [39] Y. Henry e R. Banerjee. 1973. *J. Mol. Biol.* **73**, 469. S. Louro. P. Ribeiro e G. Bemski. 1981. *Biochim. Biophys. Acta.* **670**, 56.
- [40] R. Kappl e J. Hüttermann. "Advanced EPR: Applications in Biology and Biochemistry". Elsevier, Amsterdam. 1989.

Capítulo 2

Ressonância Magnética Dupla Eletrônica e Nuclear

(ENDOR)

2.1.- Conceitos e objetivos da espectroscopia ENDOR

Um dos importantes avanços nas técnicas de ressonância magnética foi o desenvolvimento da ressonância magnética dupla. Como o nome sugere, nesta técnica excita-se uma transição ressonante de um sistema de spins enquanto monitora-se simultaneamente uma outra transição.^[1] No caso da Ressonância Dupla Eletrônica e Nuclear (ENDOR), a ressonância do spin nuclear (NMR) é detectada através do seu efeito sobre as transições do spin eletrônico (EPR), observadas a partir da mudança de intensidade de uma linha EPR saturada pelo campo de microondas.^[2] Este método foi originalmente concebido e aplicado por George Feher (1956).^[3] Os objetivos da ressonância Dupla são vários e incluem a polarização nuclear, aumento de sensibilidade, simplificação e aumento da resolução de espectros complexos e principalmente a determinação de constante de acoplamento hiperfino.^[2]

2.2.- O Hamiltoniano de um sistema de spins eletrônico e nuclear

Considera-se um sistema composto de um núcleo com spin I acoplado a um elétron com spin S , sobre o qual aplica-se um campo magnético externo H_0 . O hamiltoniano para este sistema pode ser escrito como:

$$\tilde{\mathfrak{H}} = g_e \beta_e \vec{H}_0 \cdot \vec{S} + \vec{S} \cdot \vec{A} \cdot \vec{I} - g_n \beta_n \vec{H}_0 \cdot \vec{I} \quad (2.1)$$

onde o primeiro termo descreve a interação Zeeman eletrônica, o segundo a interação hiperfina entre o spin do elétron e o spin do núcleo e o terceiro termo corresponde à interação Zeeman nuclear. Assumindo-se a aproximação de campo forte ($g_e \beta_e H_0 \gg A$),^[4] o hamiltoniano dado por (2.1) torna-se:

$$\tilde{\mathfrak{H}} = g_e \beta_e H_0 S_z + A S_z I_z - g_n \beta_n H_0 I_z \quad (2.2)$$

e os autovalores de energia são dados por:

$$E = g_e \beta_e H_0 m_S + A m_I m_S - g_n \beta_n H_0 m_I \quad (2.3)$$

Os autoestados são identificados por

$$|\Psi\rangle = |\varepsilon\mu\rangle \quad (2.4)$$

onde $\varepsilon = 2 m_S$ e $\mu = 2 m_I$. As regras de seleção para transições induzidas pelo campo eletromagnético aplicado são $\Delta m_S = \pm 1$, $\Delta m_I = 0$ (EPR) e $\Delta m_S = 0$, $\Delta m_I = \pm 1$ (NMR). As frequências de ressonância correspondentes, ω_{EPR} e ω_{NMR} , são, respectivamente:

$$\omega_{EPR} = \frac{g_e \beta_e H_0 + A m_I}{(h/2\pi)} \quad (2.5)$$

$$\omega_{NMR} = \frac{g_n \beta_n H_0 - A m_S}{(h/2\pi)} \quad (2.6)$$

Quando $S = 1/2$ e $I = 1/2$, das equações acima deduz-se que há quatro transições permitidas que são mostradas na Fig. 2.1. Os valores de $|A|$ e $g_n \beta_n H_0$ influenciam as posições relativas dos níveis de energia como mostrado na Fig. 2.1.

Nas equações acima considerou-se a forma isotrópica do acoplamento entre o spin eletrônico e o nuclear que se constitui na expressão hiperfina de contato de Fermi, ou seja:

$$\tilde{\mathfrak{H}}_{CF}(hf) = \frac{8\pi}{3} \bar{\mu}_e \cdot \bar{\mu}_n |\Psi(\vec{r})|^2 \quad (2.7)$$

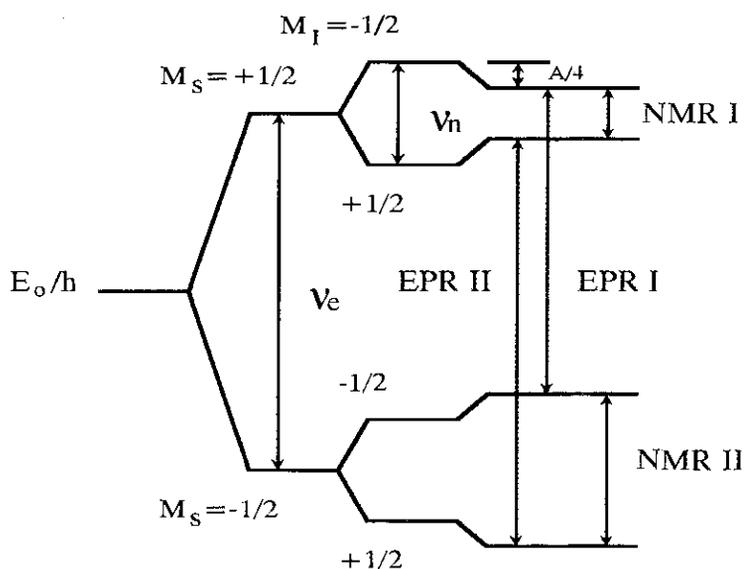
$$A_{CF}(hf) = \frac{16\pi g_e \beta_e g_n \beta_n}{3h} |\Psi(\vec{r})|^2 \quad (2.8)$$

onde $\mu_e = (2\pi/h)g_e\beta_e S$, $\mu_n = (2\pi/h)g_n\beta_n I$ e $\psi(r)$ é a função de onda do elétron desemparelhado no núcleo. Contudo, a expressão mais geral do hamiltoniano hiperfino inclui o acoplamento dipolar de natureza anisotrópica dado por:

$$\tilde{N}_{dip}(hf) = \frac{1}{r^3} \left\{ \vec{\mu}_e \cdot \vec{\mu}_n - 3 \frac{(\vec{\mu}_e \cdot \vec{r})(\vec{\mu}_n \cdot \vec{r})}{r^2} \right\} \quad (2.9)$$

$$A_{dip} = \frac{2\pi g_e \beta_e g_n \beta_n}{hr^3} (3 \cos^2 \theta - 1) \quad (2.10)$$

onde \vec{r} é o vetor que une o dipolo eletrônico ao nuclear e θ é o ângulo entre o vetor \vec{r} e o vetor campo magnético aplicado H_0 .



$$E_1/h = \nu_e/2 + \nu_n/2 - A/4$$

$$E_2/h = -\nu_e/2 + \nu_n/2 + A/4$$

$$E_3/h = \nu_e/2 - \nu_n/2 + A/4$$

$$E_4/h = -\nu_e/2 - \nu_n/2 - A/4$$

$$\text{Onde: } \nu_e = g_e \beta_e H_0/h, \nu_n = g_n \beta_n H_0/h \text{ e } A = |A|$$

Figura 2.1.- Transições permitidas de EPR e NMR em um sistema de spins com $S = I = 1/2$.

A solução do Hamiltoniano mais geral ainda resulta no diagrama de níveis de energia mostrado na Fig. 2.1 enquanto $g_e \beta_e H_0 \gg |A_x|, |A_y|$ e $|A_z|$, onde A_x, A_y e A_z são as componentes principais do tensor hiperfino. No entanto, as funções de onda na aproximação de 1ª ordem não são mais dadas por:

$$|\psi_i\rangle = |m_S m_I\rangle \quad (2.11)$$

e sim por combinações lineares destes estados

$$|\psi_i\rangle = \sum_{m_S, m_I} c_{i, m_S, m_I} |m_S m_I\rangle \quad (2.12)$$

Como ainda há somente quatro níveis de energia, a notação anterior ainda possui validade para distingui-los. O uso da forma mais geral das autofunções dadas por (2.12) tem como consequência a possibilidade de ocorrência de transições de spin diferentes daquelas mostradas na Fig. 2.1, quando um campo eletromagnético é aplicado. Estas transições são denominadas de “transições proibidas”.

Na ausência de campos eletromagnéticos aplicados, as populações dos níveis de energia do sistema de spin são dados pelos fatores de Boltzmann quando o sistema está em equilíbrio térmico. O retorno de um sistema ao equilíbrio térmico (relaxação) pode ser considerado como resultante de transições induzidas pelo acoplamento deste sistema com um reservatório térmico, no qual a probabilidade de transição termicamente induzida $W_{\varepsilon\eta, \varepsilon'\eta'}$ do estado $|\varepsilon\eta\rangle$ ao estado $|\varepsilon'\eta'\rangle$ está relacionado à taxa $W_{\varepsilon'\eta', \varepsilon\eta}$ por:

$$\frac{W_{\varepsilon\eta, \varepsilon'\eta'}}{W_{\varepsilon'\eta', \varepsilon\eta}} = \frac{p_{\varepsilon'\eta'}}{p_{\varepsilon\eta}} \quad (2.13)$$

onde $p_{\varepsilon\eta}$ é a probabilidade de ocupação de estado $|\varepsilon\eta\rangle$ no equilíbrio térmico. Utilizando a relação de Boltzmann, a eq. (2.13) se torna:

$$\frac{W_{\varepsilon\eta, \varepsilon'\eta'}}{W_{\varepsilon'\eta', \varepsilon\eta}} = \exp\left(\frac{E_{\varepsilon\eta} - E_{\varepsilon'\eta'}}{kT}\right) = B_{\varepsilon\eta, \varepsilon'\eta'} \quad (2.14)$$

Transformando-se a equação acima para uma notação mais compacta, tem-se:

$$\frac{W_{ij}}{W_{ji}} = \exp\left(\frac{E_i - E_j}{kT}\right) = B_{ij} \quad (2.15)$$

onde $i \equiv \varepsilon\eta$ e $j \equiv \varepsilon'\eta'$.

2.3.- O experimento de Feher e o princípio da técnica de ENDOR

Os princípios da ressonância dupla descritos acima foram utilizados por Feher (1959) em seu estudo da ressonância do spin de elétrons ligados a átomos doadores em cristais de silício.^[51] No sistema estudado por Feher, 5% dos núcleos de silício possuem momento magnético nuclear (isótopo ^{29}Si com spin $1/2$). Como consequência do grande raio das órbitas eletrônicas, o spin do elétron se acopla magneticamente a muitos núcleos de ^{29}Si situados em diferentes sítios da rede cristalina dando origem a muitos campos hiperfinos.

A situação acima pode ser descrita considerando-se o Hamiltoniano de um elétron interagindo com N spins de núcleos de ^{29}Si , ou seja:

$$\tilde{\mathfrak{H}} = g_e \beta_e \bar{H}_0 \cdot \vec{S} + \vec{S} \cdot \sum_{i=1}^N \tilde{A}_i \vec{I}_i - \sum_{i=1}^N g_n \beta_n \bar{H}_0 \cdot \vec{I}_i \quad (2.16)$$

onde A_i é o acoplamento hiperfino do i -ésimo núcleo. Os valores de A_i são determinados pela localização cristalográfica do i -ésimo núcleo relativo ao átomo doador. A solução é uma generalização da eq. (2.3), usando N números quânticos m_i , os autovalores de I_{zi} ,

$$E = g_e \beta_e H_0 m_S + \sum_{i=1}^N A_i m_i m_S - \sum_{i=1}^N g_n \beta_n H_0 m_i \quad (2.17)$$

A ressonância do spin eletrônico ocorre quando $\Delta m_S = \pm 1$, $\Delta m_i = 0$ para todo i . A frequência de ressonância será:

$$\omega_e = \frac{g_e \beta_e H_0 + \sum_{i=1}^N A_i m_i}{(h/2\pi)} \quad (2.18)$$

Como há muitos valores possíveis de A_i , e como cada m_i pode ser $+1/2$ ou $-1/2$, a eq. (2.18) indica que a frequência de ressonância de EPR é formada pela contribuição de muitos termos hiperfinos (interações hiperfinas não resolvidas).

Feher percebeu que cada núcleo de ^{29}Si sofre a ação do campo hiperfino de somente um elétron. Portanto, as ressonâncias dos spins nucleares são estreitas e cada sítio de ^{29}Si resulta em duas transições ressonantes, conforme o campo hiperfino do elétron esteja orientado paralela ou antiparalelamente ao campo magnético aplicado, ou seja:

$$\omega_{ni} = \frac{g_{ni}\beta_{ni}H_0 - A_i m_S}{(\hbar/2\pi)} \quad (2.19)$$

As frequências de transição nuclear dos núcleos de ^{29}Si localizados em cada sítio cristalográfico em relação ao átomo doador produzem um par distinto de linhas. Através da técnica experimental de ENDOR, concebida em 1956, Feher conseguiu detectar ressonâncias correspondentes às interações hiperfinas não resolvidas atribuídas a interação do elétron com núcleos de ^{29}Si em diferentes sítios. O experimento de Feher demonstrou portanto um grande potencial da técnica de ressonância magnética dupla e ampliou as aplicações da EPR.

2.4.- Descrição simplificada do experimento de ENDOR transiente

Para descrever o fenômeno de ENDOR, analisa-se o diagrama de níveis de energia com suas respectivas populações para um sistema de spin com $S = 1/2$ e $I = 1/2$ (Fig. 2.2). Inicialmente, considera-se os 4 níveis em equilíbrio térmico entre si, implicando, desta forma, na existência de processos de relaxação spin-rede. Todos os processos de relaxação, com exceção de $W_{1e} = (2T_{1e})^{-1}$ (relaxação spin eletrônico-rede), foram desprezados. Para temperaturas acima de alguns Kelvins, o fator de Boltzman eletrônico pode ser expandido da seguinte forma:

$$\frac{N_1}{N_4} = \exp\left(-\frac{g_e\beta_e H_0}{kT}\right) \cong 1 - \frac{g_e\beta_e H_0}{kT} \quad (2.20)$$

A diferença de população entre os níveis nucleares (1 e 3, 2 e 4) (Fig. 2.2) pode ser desprezada porque estas diferenças são da ordem de $g_n\beta_n H_0/kT$, que é aproximadamente 10^{-3} vezes a diferença de população entre os níveis eletrônicos. Fazendo-se $\delta = g_e\beta_e H_0/2kT$ e $N_4 = 1+\delta$, a primeira ordem as populações iniciais dos níveis de energia são mostradas na Fig. 2.2a. Induzindo-se transições de EPR entre os níveis 4 e 3 com potência de microondas suficientemente baixa para evitar saturação, estas populações de equilíbrio térmico serão

mantidas pela relaxação spin eletrônico-rede. Contudo, aumentado-se a potência de microondas de modo que a taxa de absorção induzida se torne comparável à taxa de relaxação do spin do elétron, a transição de EPR será saturada e as populações relativas dos dois níveis envolvidos serão igualadas, como mostra a Fig. 2.2b. Nesta situação o sinal de EPR atinge a condição de saturação.

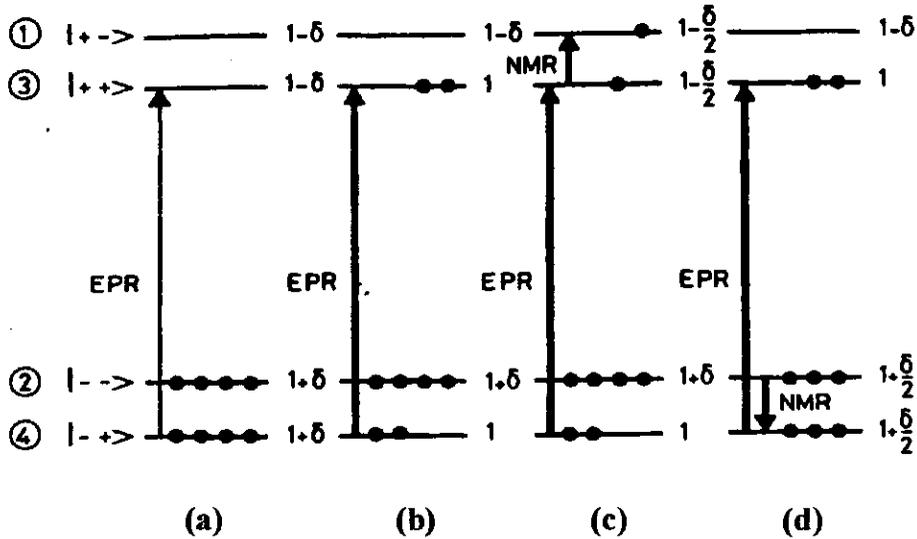


Figura 2.2.- Diagrama de populações dos níveis de energia para ENDOR transiente com $S = I = \frac{1}{2}$, $A > 0$, $g_e > 0$, $A/2 > \nu_n$. (a) EPR não saturado; (b) EPR saturado; (c) aplicação da RF; (d) segundo sinal de ENDOR.

Finalmente, aplica-se uma radiofrequência nuclear (RF) entre os níveis 3 e 1 como é mostrado na Fig. 2.2c. Como foi assumido que a taxa de relaxação spin nuclear-rede é efetivamente nula, o campo RF saturará esta transição e igualará as populações destes estados. O resultado é a produção de uma nova diferença de população entre os níveis 3 e 4 correspondentes à transição de EPR. Portanto, a aplicação de RF parcialmente desatura o sinal de EPR fazendo com que o mesmo aumente de intensidade. Este aumento no sinal de EPR é registrado e constitui-se no sinal de ENDOR. Se a frequência nuclear fosse aplicada entre os níveis 2 e 4, o sinal de EPR seria também desaturado e um segundo sinal de ENDOR seria observado (Fig. 2.2d). A desaturação parcial do sinal de EPR pelo campo RF pode ser considerado como um aumento na taxa de relaxação W_{1e} efetiva.^[2]

No exemplo mostrado na Fig. 2.2 obter-se-ia apenas o chamado sinal de ENDOR transiente. Isto é porque, na presença de um campo de microondas e de um campo RF saturantes, os três níveis de energia envolvidos eventualmente se tornariam todos igualmente populados com uma população menor que a do nível 2, e novamente não haveria sinal de EPR.

Este sinal de ENDOR transiente decai com o tempo de relaxação spin do elétron-rede (T_{1e}). A descrição acima do efeito ENDOR foi usada no primeiro experimento de ENDOR realizado por Feher.^[3]

2.5.- ENDOR de estado estacionário

A descrição de experimento de ENDOR dado na seção anterior é muito intuitiva e muito útil para um entendimento fundamental deste método. Entretanto, ela é simplificada, já que assume-se que todos os processos de relaxação, com exceção de T_{1e} , são desprezíveis e como consequência obter-se-ia apenas um sinal de ENDOR transiente. Para se obter uma mudança de estado estacionário na intensidade do sinal de EPR (ENDOR estacionário), altera-se a taxa de relaxação efetiva W_{1e}^{ef} através da introdução de caminhos de relaxação paralelos para os spins eletrônicos. Esta taxa de relaxação efetiva é igual à soma das relaxações paralelas, ou seja:

$$W_{1e}^{ef} = \frac{1}{2T_{1e}^{ef}} = \sum_i W_i = \sum_i \frac{1}{2T_i} \quad (2.21)$$

onde W_i é uma taxa de relaxação spin-rede individual do spin eletrônico, nuclear ou ambos (caso de relaxação cruzada).

Este caso é ilustrado na Fig.2.3, onde as setas sólidas simbolizam as transições dos spins eletrônico e nuclear induzidas por radiação, enquanto que as setas tracejadas caracterizam as taxas de relaxação spin-rede para o elétron (W_{1e}) e para o núcleo (W_{1n}) e os processos de relaxação cruzada (W_{x1} e W_{x2}). Nestes dois últimos processos, as transições de relaxação dos spins eletrônico e nuclear ocorrem simultaneamente. Uma forma comum de relaxação cruzada é a chamada relaxação dipolar elétron-núcleo, geralmente observada quando há interação hiperfina dipolar com prótons. Desta forma, a obtenção de um sinal de ENDOR estacionário pode ser explicada pela presença de um mecanismo que envolve uma mudança induzida por NMR no tempo de relaxação efetivo spin eletrônico-rede ($T_{1e}^{ef} = 1/2W_{1e}^{ef}$).

Num experimento de ENDOR estacionário, uma transição de EPR (ν_{EPR} , Fig.2.3) é irradiada continuamente com uma intensidade alta o suficiente para que a relaxação spin-rede não possa mais competir com a taxa de transição induzida. Isto resulta na perturbação da

distribuição de equilíbrio térmico de Boltzman, ou seja, a diferença de população entre os dois níveis se torna menor fazendo com que a transição seja parcialmente saturada. Qualquer mudança subsequente na intensidade do sinal de EPR dependerá da taxa de transição induzida pelo campo de microondas competindo com todos os outros processos que contribuem para a relaxação efetiva do spin eletrônico entre os dois níveis envolvidos. Esta taxa de relaxação efetiva é composta pela relaxação do spin do elétron W_{1e} entre os níveis 1 e 2 e o processo de atalho (“bypass”) $1 \rightarrow 3 \rightarrow 4 \rightarrow 2$, envolvendo uma relaxação do spin nuclear W_n do nível 1 para o nível 3 (W_{nI}), uma relaxação do spin do elétron W_{2e} de 3 para 4, e finalmente uma relaxação nuclear de 4 para 2 (W_{2n}). Outros processos de atalho envolvem as taxas de relaxação cruzadas W_{1x} e W_{2x} juntamente com W_n (Fig.2.3). A taxa de relaxação efetiva entre os níveis 1 e 2 descrita acima pode ser aumentada (intensidade) a partir da aplicação de um forte campo de RF em ressonância com as transições dos spins nucleares, em competição com W_n ($1 \rightarrow 3$ ou $2 \rightarrow 4$). Isto causa uma maior eficiência da relaxação $1 \rightarrow 3 \rightarrow 4 \rightarrow 2$, aumentando a taxa de relaxação spin-rede efetiva e, portanto, levando a desaturação da transição de EPR juntamente com um aumento da intensidade do sinal de EPR. É exatamente este efeito que é detectado no experimento de ENDOR.^[6]

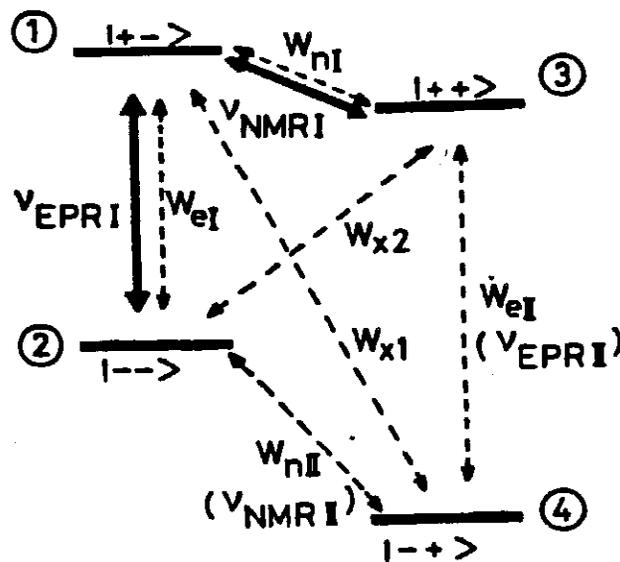


Figura 2.3.- Diagrama de níveis de energia, na aproximação de campo magnético alto, para a interação magnética de um elétron desemparelhado ($S = 1/2$) com um núcleo de $I = 1/2$ e para $\nu_n > A/2$. As setas sólidas representam transições de EPR e NMR induzidas, as setas tracejadas representam as taxas de relaxação.

Desta forma, os resultados da discussão apresentados até agora claramente mostram que a eficiência do efeito ENDOR depende criticamente das intensidades relativas das taxas W_e , W_n , W_{1x} e W_{2x} . Se os processos W_x forem desprezados, o melhor sinal de ENDOR é obtido quando W_e e W_n são comparáveis em intensidade, porque nestas condições não haverá interrupções no caminho efetivo da relaxação do spin eletrônico.^[6]

2.6.- ENDOR em amostras policristalinas: Princípio da seleção de orientações moleculares

Em sistemas policristalinos os mono-cristais são orientados aleatoriamente na amostra. Como resultado, os eixos de simetria destes mono-cristais (e também os eixos de simetria dos centros paramagnéticos) podem ter qualquer orientação em relação ao vetor campo magnético aplicado. Apesar do campo magnético possuir uma direção fixa durante o processo de medida, assume-se por conveniência que o vetor campo magnético pode ter uma orientação arbitrária num certo sistema de eixos moleculares fixos no espaço. Considera-se também que a interação Zeeman eletrônica é o termo dominante no Hamiltoniano de spin, portanto o sistema de coordenadas no qual o tensor g é diagonal, é o sistema de referência apropriado (Fig.2.4).

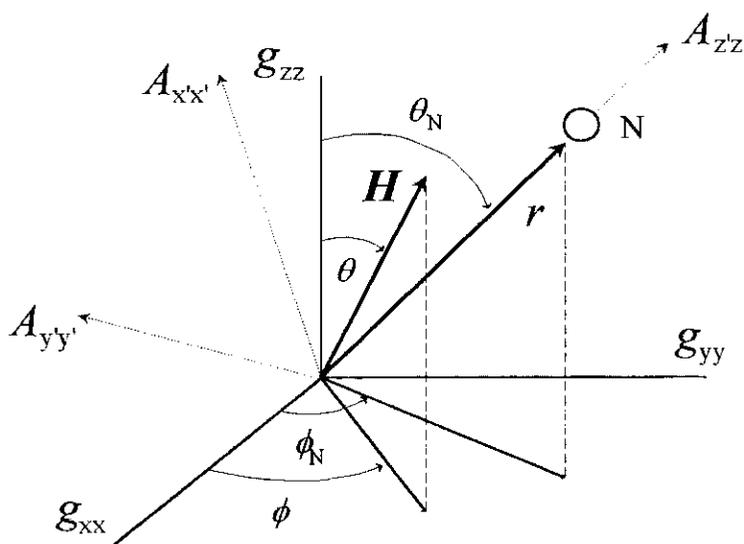


Figura 2.4.- Ângulos polares que descrevem a direção do vetor campo magnético aplicado, H , e a direção do vetor r que conecta o centro paramagnético com o núcleo no sistema de coordenadas do tensor g .

Os espectros de EPR de materiais policristalinos são obtidos a partir da contribuição das ressonâncias correspondentes a todas as orientações moleculares (cada orientação sendo definida por um conjunto de ângulos θ e ϕ) com relação ao campo magnético aplicado. Toda orientação molecular individual possui uma ou mais contribuições para o espectro de EPR de pó, dependendo dos valores de m_I , onde m_I é número quântico magnético do spin nuclear, de acordo com a equação do campo de ressonância (H_{res}) de 1ª ordem para sistemas com $S = 1/2$:

$$H_{res} = \frac{h\nu_{EPR} - m_I A(\theta, \phi)}{\beta_e g(\theta, \phi)} \quad (2.22)$$

Onde β_e é o magneton de Bohr, $A(\theta, \phi)$ é a constante hiperfina, $g(\theta, \phi)$ é o fator g efetivo, ν_{EPR} é a frequência de microondas e h é a constante de Planck. Os valores de g e A são dados por :

$$g(\theta, \phi) = \left[\sum_{i=1}^3 (g_i h_i)^2 \right]^{1/2} \quad (2.23)$$

$$A(\theta, \phi) = \frac{\left[\sum_{i=1}^3 \left(\sum_{j=1}^3 A_{ji} g_j h_j \right)^2 \right]^{1/2}}{g(\theta, \phi)} \quad (2.24)$$

onde h_i ($i = 1, 2$ e 3) são os cosenos diretores do vetor campo magnético no sistema de eixos do tensor- g , ou seja (Fig.2.6):

$$h_1 = \cos\phi \sin\theta, \quad h_2 = \sin\phi \sin\theta, \quad h_3 = \cos\theta,$$

As equações (2.22), (2.23) e (2.24) revelam que cada orientação molecular possui muitas contribuições para o espectro de EPR de pó.

Num experimento de ENDOR, a situação é diferente, pois o campo magnético é mantido fixo em um certo valor. Portanto, para se encontrar as orientações moleculares que estão em ressonância para um dado valor de H_{res} tem-se que efetuar um cálculo inverso ao que resultou nas eqs (2.22-2.24). Estas orientações moleculares são representadas por um conjunto de valores θ e ϕ em relação aos eixos principais do tensor g . Deste modo, ao se obter o espectro de ENDOR em um dado campo de ressonância (H_{res}), se está fazendo uma seleção das orientações moleculares que mais contribuem para este espectro. O princípio da seleção de orientações

moleculares foi primeiramente sugerido por Rist e Hyde (1970) e forma a base da interpretação do espectro de ENDOR de pó.^[7] Posteriormente, este princípio foi desenvolvido e aperfeiçoado por outros autores, como Hoffman et al. (1984, 1985), Hurst et al. (1985), True et al. (1988) e Gurbiel et al. (1993).^[8]

Para um dado valor do campo de ressonância determina-se as frequências de ressonância do spin nuclear que constituem o espectro de ENDOR. Estas frequências estão associadas às orientações moleculares selecionadas pelo campo de ressonância, podendo-se, com isto, se estabelecer uma relação entre elas. Em primeira ordem, tem-se:

$$h\nu_{NMR} = K(m_S) \quad (2.25)$$

com

$$K^2(m_S) = \sum_i \left[(\tilde{S}_e^T \tilde{A})_i - g_n \beta_n H_{res} h_i \right]^2 \quad (2.26)$$

onde

$$\tilde{S}_e^T = \frac{m_S [g_1 h_1, g_2 h_2, g_3 h_3]}{g(\theta, \phi)} \quad (2.27)$$

O tensor- A é uma soma das interações superhiperfinas isotrópica (A_{iso}) e anisotrópica. Assumindo-se que a interação entre os spins do elétron e do núcleo é dada somente pelo termo dipolar pode-se escrever:^[4]

$$A_{ij} = \frac{-\beta_e g_n \beta_n}{hr^3} g_i (3r_i r_j - \delta_{ij}) + A_{iso} \delta_{ij} \quad (2.28)$$

Onde r_i ($i = 1, 2$ e 3) são os cossenos diretores que descrevem a direção do núcleo no sistema de eixos do tensor- g , ou seja:

$$r_1 = \cos\phi_N \sin\theta_N, r_2 = \sin\phi_N \sin\theta_N, r_3 = \cos\theta_N$$

onde r é a distância entre os spins eletrônico e nuclear (ver Fig.2.4). Quando a anisotropia do tensor- g é pequena comparada com o fator g médio ($\Delta g_{ef} \ll g_{med}$), os spins do elétron e do núcleo são quantizados quase ao longo da mesma direção (direção do campo aplicado) e a eq. (2.28) se torna:

$$A(\varphi) = \frac{-g_e \beta_e g_n \beta_n}{h r^3} (3 \cos^2 \varphi - 1) + A_{iso} \quad (2.29)$$

onde φ é o ângulo entre a direção do campo magnético aplicado e a direção que conecta os spins eletrônico e nuclear. Os fatores g_e e g_n são, respectivamente, os fatores g do spin eletrônico e do spin nuclear.

Portanto, a expressão final das frequências de ENDOR é obtida substituindo-se as eqs. (2.26) e (2.27) na eq. (2.25), então

$$\nu(H, m_s) = \left[\sum_{i=1}^3 \left[\frac{m_s}{g(\theta, \phi)} \left(\sum_{j=1}^3 g_j h_j A_{ji} \right) - h_i \nu_0 \right]^2 \right]^{1/2} \quad (2.30)$$

Onde

$$\nu_0 = \frac{g_n \beta_n H_{res}}{h} \quad (2.31)$$

A equação (2.30) mostra que as frequências de ENDOR dependem dos fatores- g eletrônicos, do tipo de núcleo, da direção $[h_1, h_2, h_3]$ e do valor do campo aplicado (H_{res}), bem como da posição do núcleo no sistema de eixos principais do tensor g (r , ϕ_N e θ_N , ver Fig.2.6). Como H_{res} e $[h_1, h_2, h_3]$ variam quando o campo magnético é varrido através do espectro de EPR, as frequências de ENDOR também variam com o campo aplicado.

Quando os núcleos que interagem com o elétron desemparelhado estão muito distantes do centro paramagnético, as constantes hiperfinas dipolares se tornam pequenas. Quando estas se tornam menores que a largura de linha de ENDOR, o espectro consistirá de uma ou mais ressonâncias isotrópicas centradas em torno da frequência do núcleo livre. Este fenômeno é chamado de ENDOR matricial.^[9]

O tensor nuclear hiperfino pode ter qualquer simetria ou orientação. Para o caso mais geral, quando o tensor é totalmente assimétrico é impossível encontrar um sistema de coordenadas onde o tensor hiperfino é diagonal. Quando a anisotropia de g é pequena comparada com o valor médio de g , os spins eletrônico e nuclear são quantizados na direção do campo magnético aplicado. Nestas condições, a energia hiperfina máxima acontece quando o campo aponta na direção do vetor que conecta o metal com o núcleo ($A_{z-z'}$) e o mínimo quando

o campo esta perto ao plano $A_{x'x'}$, $A_{y'y'}$ (Fig. 2.4).^[11] No caso de sistemas com tensor g axial, a direção do campo magnético no sistema de coordenadas do tensor g é determinada somente pelo ângulo polar θ (Fig. 2.4). Quando o campo magnético tem um valor $H(\theta)$, a contribuição para a ressonância será devida principalmente aqueles cristais para os quais o ângulo entre a direção do campo aplicado e o eixo $g_{//}$ é θ .^[12]

A interpretação dos picos de ENDOR num campo magnético dado devem ser consistentes com a interpretação em todos os outros valores de campo, isto impõe condições estritas entre a identificação dos picos e determinação das coordenadas nucleares.

2.7.- Referências

-
- [1] C. Slichter. "Principles of Magnetic Resonance". 3rd ed., Springer-Verlag. 1990.
- [2] L Kevan e L. Kispert. "Electron Spin Double Resonance Spectroscopy". John Wiley and Sons. 1976.
- [3] G. Feher. 1956. *Phys. Rev.* **103**, 834.
- [4] J. Weil, J. Bolton e J. Wertz. "Electron Paramagnetic Resonance: Elementary Theory and Practical Applications". John Wiley and Sons, Inc., New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore. 1994.
- [5] G. Feher. 1959. *Phys. Rev.* **114**, 1219.
- [6] H. Kurreck, B. Kirste e W. Lubitz. "Electron Nuclear Double Resonance Spectroscopy of Radicals in Solution: Application to Organic and Biological Chemistry". VCH Publishers, Inc. 1988.
- [7] G. Rist e J. Hyde. 1970. *J. Chem. Phys.* **52**, 4633.
- [8] B. Hoffman, J. Martinsen e R. Venters. 1984. *J. Magn. Reson.* **59**, 110. B. Hoffman, R. Venters e J. Martinsen. 1985. *J. Magn. Reson.* **62**, 537. G. Hurst, T. Henderson e R. Kreilick. 1985. *J. Am. Chem. Soc.* **107**, 7294. A. True, M. Nelson, R. Venters, W. Orme-Johnson e B. Hoffman. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 1935. R. Gurbiel, Y. Fann, K. Surerus, M. Werst, S. Musser, P. Doan, S. Chan, J. Fee e B. Hoffman. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 10888.
- [9] D. Leniart, J. Hyde e J. Vedrine. 1972. *J. Phys. Chem.* **76**, 2079.
- [11] Hurst, T. Henderson e R. Kreilick. 1985. *J. Am. Chem. Soc.* **107**, 7294
- [12] B. Hoffman e R. Gurbiel. 1989. *J. Magn. Reson.* **82**, 309.

Capítulo 3

Materiais e Métodos

3.1.- Preparação de Amostras

Hemoglobina humana foi obtida de acordo com o procedimento padrão.^[1] Sangue humano foi coletado em heparina (anticoagulante) e as hemácias foram lavadas três vezes com solução de cloreto de sódio (NaCl) 0.9% (W/v). As células empacotadas foram hemolisadas com água destilada e clorofórmio (concentração final de clorofórmio: 10% v/v) durante a noite a 4°C. Solução de Hb é obtida por centrifugação e estocada a -20°C em solução com 50% de glicerol v/v em tampão Tris pH 8.5. Para retirar os fosfatos orgânicos da Hb e ajustar o pH, usamos colunas de filtração (Sephadex G-25, Sigma Co.) equilibradas com tampão fosfato 0.1 M e pH 7.1. Mioglobina de cavalo (Sigma) foi diluída (5 mM) em tampão fosfato 0.1 M e pH 7.0.

Gás de óxido nítrico (NO) foi preparado reagindo ácido nítrico a 30% com cobre metálico, na ausência de oxigênio, lavado em solução de KOH e armazenado em balão de água destilada para evitar que pequenas quantidades de NO₂ permanecessem no gás.

Nitrosil hemoglobina (HbNO) foi preparada através da reação da Hb desoxigenada com gás de NO, em atmosfera anaeróbica (N₂). Nitrosil mioglobina (MbNO) foi preparada através da reação da Mb desoxigenada com gás de NO também em atmosfera anaeróbica. A Mb é desoxigenada através da reação com ditionito de sódio enquanto que a Hb com fluxo de gás de N₂.

3.2.- Medidas de EPR e ENDOR

Medidas de EPR e ENDOR em banda X foram feitas a baixas temperaturas utilizando um espectrômetro modelo Bruker ESP300E, com uma cavidade retangular para baixa temperatura (EN 801). A temperatura da amostra foi controlada utilizando um criostato de fluxo de hélio líquido (Oxford ESR 900) com um controlador de temperatura Oxford ICT4. As temperaturas foram medidas com um termopar AuFe

versus Cromel localizado abaixo da amostra. A flutuação na leitura indica que a variação na temperatura foi de cerca 0.1 K. Foi feita uma variação térmica dos espectros de ENDOR, tanto para MbNO e HbNO na faixa de temperatura entre 4 K e 45 K.

Foram feitas medidas de ENDOR em três faixas diferentes de radio frequência, que correspondem às faixas de interação hiperfina do complexo paramagnético com diferentes átomos. Entre 5 MHz e 11 MHz, o N_e da His-F8, entre 11 MHz e 17.5 MHz, os prótons na vizinhança da protoporfirina e entre 17.5 MHz e 25 MHz, com o N do ligante. Lamentavelmente nesta última faixa somente conseguimos obter espectros para valores de campo magnético baixo, e mesmo assim muito fracos.

Em 10 K foram medidos espectros de ENDOR em função à posição do campo magnético no espectro de EPR (isto é em função a valores de g), tanto para MbNO quanto para HbNO. Esta variação foi feita para aplicar a metodologia de seleção de orientações. Nesta temperatura os espectros de EPR foram parcialmente saturados com 10 mW de potência de microonda, e os espectros de ENDOR de prótons e ^{14}N , foram medidos com uma frequência de modulação fixa de 12.5 kHz, uma amplitude de modulação de 354 kHz, uma potência de radiofrequência de 120 W e acumulando 50 passagens.

3.3.- Simulações dos espectro de ENDOR

Os espectros de ENDOR de prótons e ^{14}N foram ajustados usando o programa GENDOR.^[2] Este programa simula espectros ENDOR de sistemas policristalinos com espectros de EPR com estrutura hiperfina não resolvida. Os tensores g , hiperfino (A) e quadrupolar (P) podem ter simetria arbitrária e orientações diferentes. Os espectros simulados dependem dos fatores g , da largura de linha do espectro de EPR e da frequência de microonda, determinados por simulações de EPR de hemoproteínas em solução congelada.^[3] E foram considerados como parâmetros de ajuste: os valores principais dos tensores A e P , os ângulos de Euler entre A e g , os ângulos de Euler entre P e A , a largura de linha do espectro de ENDOR e o valor de g observado (campo magnético).

O programa simula a contribuição de cada núcleo independentemente. Para construir os espectros resultantes, cada componente é multiplicada por um fator escolhido de tal forma que a soma delas se ajuste, visualmente, o melhor possível, ao espectro experimental.

3.3.1.- Simulações para ^1H (prótons)

Em nitrosil hemoproteínas o centro paramagnético é o complexo $\text{N}(\text{HisF8})\text{-Fe}^{2+}\text{-N}(\text{NO})$, e este se apresenta em duas simetrias (rômbica e axial).^[3] O sistema axial é definido no sistema da heme, com g_x conectando os nitrogênios NI e NIII, e g_y conectando os nitrogênios NII e NIV da protoporfirina; g_z é perpendicular ao plano da heme. No sistema rômbico g_z é inclinado 35° em relação à normal da heme, g_x conecta os nitrogênios NI e NIII da heme, e g_y é perpendicular ao plano $g_y g_z$.

A densidade de spin não está localizada num átomo somente, pelo contrário a densidade está distribuída entre os três átomos que formam o complexo. Existem várias distribuições conhecidas para estes complexos, mas a mais utilizada considera: 70% da densidade no Fe^{2+} , 23% no $\text{N}(\text{NO})$ e 7% no $\text{N}(\text{HisF8})$.^[4]

Com o objetivo de simplificar o problema, calculamos um centro de spin reduzido (CSR),^[5] que é uma espécie de “centro de massa” dos três átomos, que substituirá o complexo com a densidade de spin total. Utilizando a distribuição de spin acima, a posição deste CSR (\mathbf{r}_{CSR}) fica definida pela eq. 3.1.

$$\mathbf{r}_{\text{CSR}} = 0.7 \mathbf{r}_{\text{Fe}^{2+}} + 0.23 \mathbf{r}_{\text{N}(\text{NO})} + 0.07 \mathbf{r}_{\text{N}(\text{HisF8})} \quad (3.1)$$

Os vetores $\mathbf{r}_{\text{Fe}^{2+}}$, $\mathbf{r}_{\text{N}(\text{NO})}$ e $\mathbf{r}_{\text{N}(\text{HisF8})}$ são obtidos de dados de ENDOR a baixa temperatura,^[6] já que nossos experimentos foram realizados a 10 K. Para as duas simetrias o centro de spin reduzido se encontra 0.25 Å do Fe^{2+} na direção da ligação $\text{Fe}^{2+}\text{-N}(\text{NO})$ e na Fig. 3.1 está representada a simetria axial.

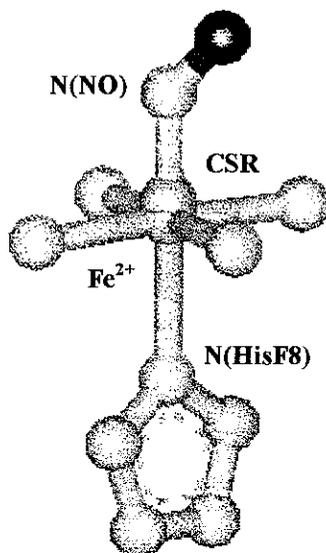


Figura 3.1.- Localização do centro de spin reduzido na simetria axial.

Para iniciar as simulações calculamos os valores das interações hiperfinas e os ângulos de Euler entre o tensor g e os tensores hiperfinos para cada próton da vizinhança da protoporfirina (His-E7, Val-E11 e His-F8), estes valores foram calculados em relação ao centro de spin reduzido. Para isso usamos os dados de raios-X de cadeias α e β de HbNO.^[6] Com as coordenadas de raios-X, podemos calcular as posições dos prótons em relação ao centro de spin reduzido, e usando as equações 2.28 (ver Cap. 2) calculamos os valores principais do tensores A para cada próton. Os ângulos de Euler respectivos são os ângulos θ_N e ϕ_N , como definidos no capítulo 2 (Fig. 2.4).

Para o caso de prótons a interação quadrupolar é nula, já que o spin nuclear é igual a $\frac{1}{2}$. Quando se considera, o tensor hiperfino isotrópico e coincidente com o tensor g , o espectro de ENDOR de prótons característico tem a forma mostrada na Fig. 3.2. Os picos estão centrados na frequência de Larmor para prótons (ν_n) e a distância entre os picos dá o valor do acoplamento hiperfino nessa direção, neste caso este valor será o mesmo em todas as direções de campo magnético.

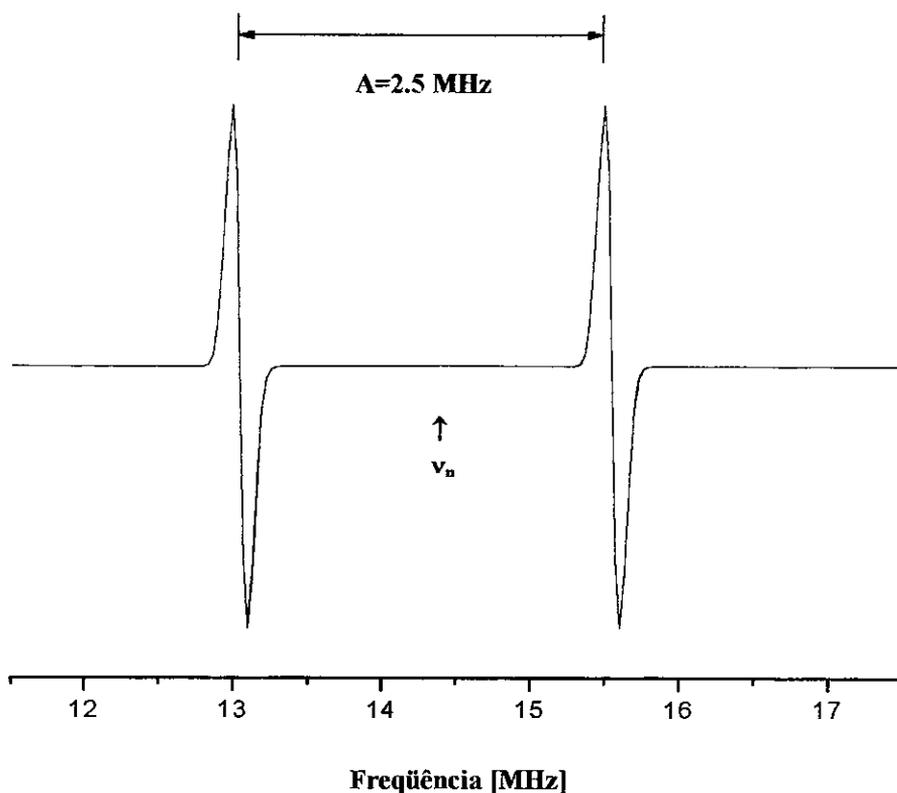


Figura 3.2.- Espectro de ENDOR de prótons no caso de interação hiperfina isotrópica

No caso que o tensor hiperfino é anisotrópico e não coincidente com o tensor g , os espectros de ENDOR dependem da posição do campo magnético no espectro de EPR. Se o campo magnético é fixado num ponto crítico do espectro de EPR em baixos campos ($g = 2.078$),^[3] pode-se, em princípio, selecionar uma única orientação, para a qual resultaria um espectro de ENDOR de monocristais (Fig. 3.3 a). Em outros campos, seleciona-se orientações com θ fixo mas com uma faixa de valores para ϕ ; nestes casos resulta num espectro de ENDOR de pó bidimensional, como mostrado na Fig. 3.3 a. A interpretação dos picos de ENDOR para um dado campo magnético devem ser consistentes com a interpretação em todos os outros valores de campo, isto impõe condições estritas entre a identificação dos picos e determinação das coordenadas nucleares. Por outro lado os espectros de ENDOR também dependem da posição do próton em relação ao campo magnético, portanto espectros de prótons da heme, da His-E7, da Val-E11 e da His-F8 são diferentes (Fig. 3.3 b-c).

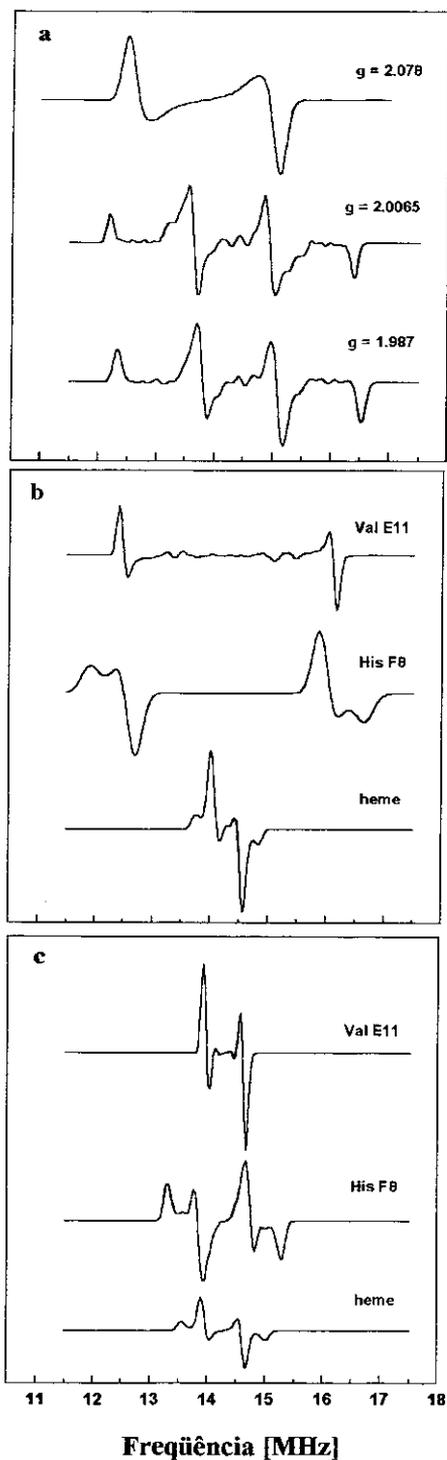


Figura 3.3.- Espectros de ENDOR simulados: (a) Comportamento dos espectros com a orientação para o próton HNE2 da His-E7 para simetria rômbrica nas direções correspondentes aos valores g indicados, (b) Espectros de três diferentes prótons na vizinhança do complexo paramagnético para um campo magnético correspondente a uma direção intermediária ($g = 2.0065$) para simetria axial e (c) para simetria rômbrica.

3.3.2.- Simulações para ^{14}N

O espectro de ENDOR de ^{14}N quando se considera os tensores hiperfino e quadrupolar isotrópicos e coincidentes com o tensor g , é mostrado na Fig. 3.4. Os picos estão centrados no valor da interação hiperfina dividido por dois ($A/2 = 8$ MHz), nessa direção de campo magnético. As distâncias entre picos, marcadas na Fig. 3.4, dão o valor dos acoplamentos Zeeman nuclear (ν_n) e quadrupolar ($P = 0.4$ MHz) nessa direção, no caso isotrópico estes valores serão os mesmos em todas as direções de campo magnético.

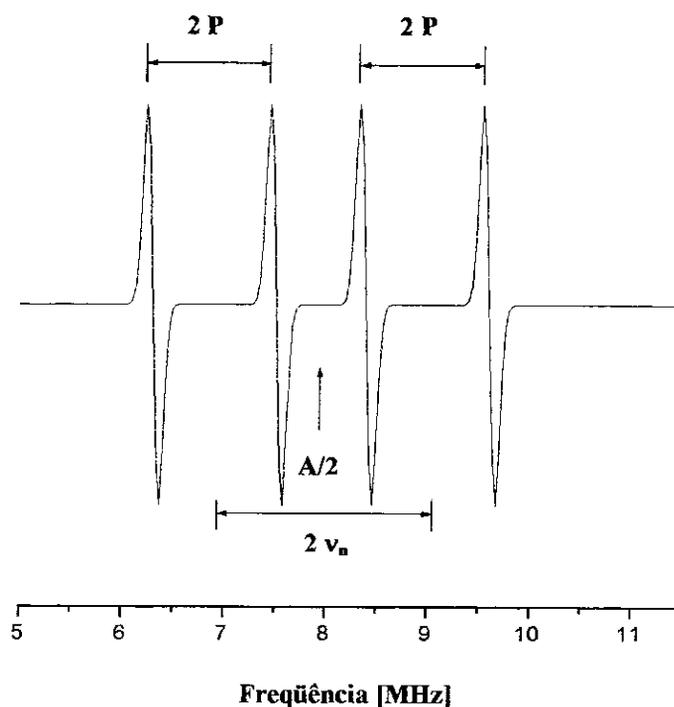


Figura 3.4.- Espectro de ENDOR de ^{14}N no caso de interações hiperfina e quadrupolar isotrópicas e coincidentes com o tensor g .

Quando os tensores hiperfino e quadrupolar não são coincidentes com o tensor g , e entre si, e são anisotrópicos, os espectros de ENDOR têm a forma apresentada na Fig. 3.5 c. Este espectro foi simulado para uma campo magnético intermediário ($g = 2.0065$), com uma interação hiperfina de 16 MHz e uma interação quadrupolar de 0.75 MHz, para esta direção.

Outro aspecto importante que deve ser considerado nas simulações é a diferença de intensidade entre as linhas de uma mesma espécie, esta desigualdade se manifesta quando existem processos de relaxação cruzada, e podem acontecer tanto em espectros ENDOR de prótons como de ^{14}N .^[7] Para simular este tipo de espectro o programa GENDOR oferece a possibilidade de simular pares de linhas equivalentes. Figuras 3.5 a e 3.5 b mostram as simulações de pares de linhas, separadas pelo dobro da interação quadrupolar, correspondentes às menores e maiores radiofrequências, respectivamente. Cada par pode ter uma intensidade diferente o que permite obter uma composição que se ajusta melhor ao espectro experimental no que se refere a relação de intensidade de linhas (Fig. 3.5 c).

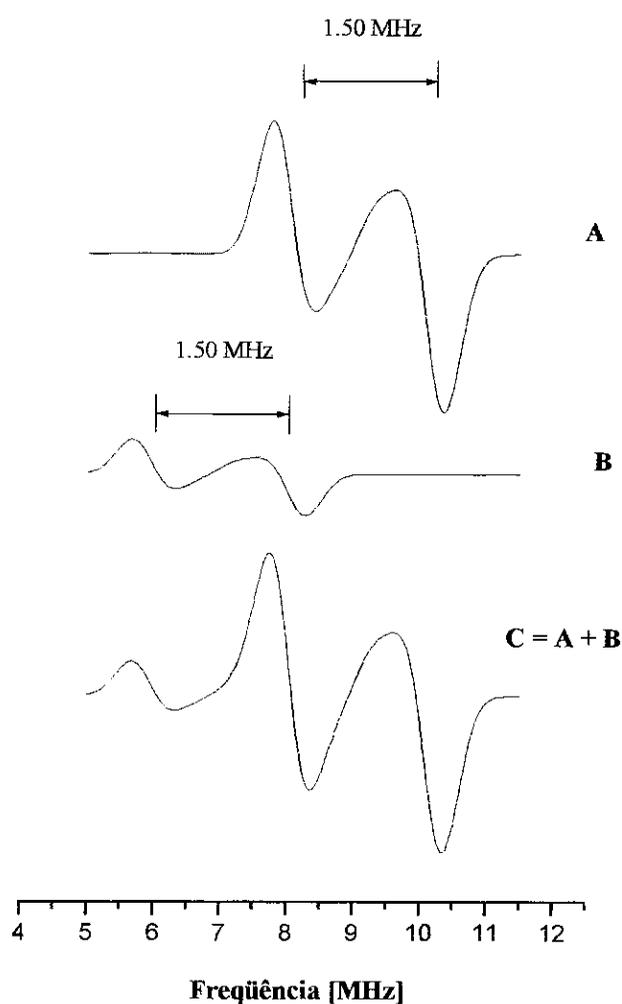


Figura 3.5.- Espectros de ENDOR de ^{14}N , (a) para frequências maiores, (b) para frequências menores e (c) composição considerando diferentes intensidades causadas por relaxação cruzada.

3.4.- Metodologia usada pelo programa THOR

3.4.1.- O Campo de Força

A conformação de um sistema molecular pode ser obtida pela resolução mecânico-quântica do problema. Porém, o elevado número de átomos das macromoléculas biológicas e as atuais limitações computacionais levam a utilização de uma função potencial relativamente simples, descrevendo de forma clássica a interação entre as unidades atômicas. Genericamente atribui-se a denominação de Campo de Força à descrição de um sistema de muitas partículas pela soma de termos simples, que descrevem a interação com os 1^{os} até 4^{os} vizinhos. Para o tratamento de centenas ou milhares de átomos existentes nas proteínas e ácidos nucleicos são introduzidas funções potenciais empíricas, ajustadas por informações experimentais e cálculos quânticos sobre pequenas moléculas. Frequentemente se refere ao conjunto desses parâmetros de ajuste, juntamente com as respectivas funções, como “campo de força molecular.”^[8]

Na simulação da dinâmica molecular, as forças que atuam sobre cada átomo são obtidas calculando-se a primeira derivada do potencial nas posições desses átomos. A partir dessas forças resolve-se as equações de movimento para descrever as variações das posições atômicas com o tempo. A cada passo da dinâmica as forças são reavaliadas. Esse processo iterativo sobre um elevado número de átomos impõe que a escolha da função para a energia potencial seja baseada num compromisso entre precisão e simplicidade. Ela deve ser complexa o suficiente para uma análise precisa e realística da estrutura e da dinâmica do sistema e, ao mesmo tempo, simples o suficiente para que os cálculos sejam efetuados com rapidez e baixo custo computacional, possibilitando que a evolução temporal do sistema seja longa o suficiente para uma significativa amostragem do espaço de configurações.

Diversas funções potenciais têm sido propostas na literatura.^[9] Como fatores comuns entre elas aparecem termos harmônicos para descrever a energia em função da distância entre átomo de ligações covalentes e dos ângulos entre ligações químicas vizinhas; um termo para descrever as rotações em torno de ligações e termos que descrevem interações entre átomos não ligados, que consideram a impenetrabilidade das

nuvens eletrônicas, as forças de dispersão e indução dipolar, assim como atrações e repulsões eletrostáticas.

A função energia potencial para um sistema molecular constituído de N_{at} átomos, com vetores posição r_i ($i = 1, 2, \dots, N_{átomos}$), no programa Thor, tem a forma:

$$E(\{r_i\}) = \sum_{n=1}^{N_b} \frac{1}{2} K b_n (b_n - b_{0n})^2 + \sum_{n=1}^{N_\theta} \frac{1}{2} K \theta_n (\theta - \theta_{0n})^2 + \sum_{n=1}^{N_\xi} \frac{1}{2} K \xi_n (\xi_n - \xi_{0n})^2 + \sum_{n=1}^{N_\phi} K \phi_n [1 + \cos(n \phi_n - \delta_n)] + \sum_{i < j}^{N_{at}} [C_{12}(i,j)/r_{ij}^{12} - C_6(i,j)/r_{ij}^6 + q_i q_j / 4\pi \epsilon_0 \epsilon r_{ij}]$$

onde os três primeiros termos à direita da igualdade são os potenciais harmônicos que descrevem as N_b ligações químicas da molécula, os N_θ ângulos entre pares de ligações consecutivas e os N_ξ ângulos diedrais impróprios respectivamente. Esses termos determinam como a energia varia alterando-se os valores dos comprimentos b_0 e dos ângulos θ_0 e ξ_0 de equilíbrio das ligações químicas. O quarto termo é o potencial torcional somado sobre os N_ϕ ângulos diedrais próprios, para as ligações químicas com liberdade de rotação de 360° . O termo seguinte corresponde aos potenciais de van der Waals e Coulomb somados sobre todos os pares de átomos i e j excluindo-se os primeiros e segundos vizinhos quimicamente ligados, cujas interações são descritas pelos termos harmônicos.

Os parâmetros K_b , b_0 , K_θ , θ_0 , K_ξ , ξ_0 , K_ϕ , n , δ , as constantes $C_{12}(i,j)$ e $C_6(i,j)$ e as cargas atômicas parciais q_i e q_j , para proteínas e ácidos nucleicos, são encontrados na literatura.

3.4.2.- Otimização da Geometria Molecular

Calculando-se a energia de um sistema molecular para diversos valores de coordenadas, pode-se explorar a hipersuperfície de energia potencial para o mesmo. Dependendo das dimensões e características do sistema, a hipersuperfície apresentará um grande número de mínimos locais de energia, que correspondem a pontos no espaço de configurações onde todas as forças sobre os átomos do sistema são balanceadas.

Devido ao elevado número de graus de liberdade das macromoléculas biológicas, uma exploração completa da superfície multidimensional de energia é praticamente impossível. Uma maneira de explorar tal superfície se dá pela minimização da energia potencial molecular.

A otimização da geometria é uma técnica que visa encontrar um conjunto de coordenadas que minimizam a energia potencial dos sistema de interesse. O procedimento básico consiste em caminhar sobre a superfície de potencial na direção em que a energia decresce de maneira que o sistema é levado a um mínimo de energia local próximo. A minimização da energia cobre, portanto, somente uma pequena parte do espaço de configurações. Porém, pelos ajustes nas posições atômicas, ela relaxa as distorções nas ligações químicas, nos ângulos entre ligações e nos contatos de van der Waals.

A minimização de energia, ou otimização da geometria, é um processo iterativo que em coordenadas cartesianas pode ser representado por:

$$\mathbf{r}_{i,n+1} = \mathbf{r}_{i,n} + \Delta\mathbf{r}_{i,n} \quad (i = 1, 2, \dots, N_{at}) \quad (3.1)$$

na qual n é o número de iterações e $\Delta\mathbf{r}_{i,n}$ é o enésimo incremento nas coordenadas do átomo i . Existem diferentes maneiras de determinar o módulo e a direção do passo $\Delta\mathbf{r}_{i,n}$, os métodos mais comuns empregam a primeira derivada da função energia potencial, enquanto métodos mais sofisticados usam também a segunda derivada para melhorar a taxa de convergência.

a) O algoritmo “*steepest-descent*” para minimização de energia

O método *steepest-descent*,^[10] que é um método de primeira derivada, converge vagorosamente nas proximidades de um mínimo, mas é poderoso para configurações cuja energia está distante de um mínimo. O algoritmo *steepest-descent* foi implantado na versão inicial do programa THOR devido à sua robustez e facilidade de implantação. Com este algoritmo é possível construir pequenas moléculas, como aminoácidos, a partir de coordenadas atômicas aleatórias com relativamente poucos passos de

otimização e posteriormente conectá-los para formar cadeias peptídicas. De um modo geral, com o algoritmo *steepest-descent* é possível melhorar estruturas cristalográficas pouco refinadas, otimizar as construídas graficamente a partir de informações de NMR ou por homologia de estruturas conhecidas.

b) Métodos dos gradientes conjugados

Um método mais sofisticado de busca de um mínimo da função energia, além de utilizar a informação sobre a primeira derivada (gradiente), considera o caminho já percorrido na busca do mínimo. Este método denominado de *gradientes conjugados* permite em geral uma convergência mais rápida que o método *steepest-descent* que utiliza somente a informação do gradiente na coordenada atualizada.

Neste método a direção do gradiente no novo ponto ($\mathbf{r}_{i,n+1} = \mathbf{r}_{i,n} + \Delta\mathbf{r}_{i,n}$) é sempre ortogonal ao gradiente do ponto anterior ($\mathbf{r}_{i,n}$), e conseqüentemente a todos os anteriores. Esta propriedade determina um caminho mais direto ao fundo do poço de potencial, evitando o retorno sobre caminhos já percorridos, ao contrário do algoritmo *steepest-descent* que utiliza somente a informação em um ponto e que portanto não pode excluir esta possibilidade.

Na prática, para os sistemas macromoleculares, o algoritmo *steepest-descent* se mostra mais efetivo e rápido nos passos iniciais muito longe do mínimo, entretanto quando se está perto de atingir o mínimo o método do gradiente é muito mais rápido e preciso. Desta forma pode-se conjugar os dois métodos utilizando no início o *steepest-descent* com um critério de convergência relativamente fraco e o método dos *gradientes conjugados* para o refinamento final.

3.5.- Referências

-
- [1] S. Louro, P. Ribeiro e G. Bemski. 1981. *Biochim. Biophys. Acta.* **670**, 56.
 - [2] B. Hoffman, J. Martinsen e R. Venters. 1984. *J. Magn. Reson.* **59**, 110. B. Hoffman, R. Venters e J. Martinsen. 1985. *J. Magn. Reson.* **62**, 537.
 - [3] M. Flores, E. Wajnberg e G. Bemski. 1997. *Biophys. J.* **73**, 3225.

-
- [4] D. Doetschman, S. Schwartz e S. Utterback. 1980. *Chemical Physics*. **49**, 1. S. Utterback, D. Doetschman, J. Szumowski e A. Rizos. 1983. *J. Chem. Phys.* **78**, 5874.
- [5] G. Wells e M. Makinen. 1988. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 6343. R. Kappl e J. Hüttermann. 1989. *Israel J. Chem.* **29**, 73.
- [6] J. Hüttermann, C. Burgard e R. Kappl. 1994. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **90**, 3077.
- [7] L Kevan e L. Kispert. "Electron Spin Double Resonance Spectroscopy". *John Wiley and Sons*. 1976.
- [8] C. Brooks III, M. Karplus e B. Pettitt. "Proteins: A Theoretical Perspective of Dynamics, Structure and Thermodynamics". *John Wiley & Sons, New York*. 1988. W. van Gunsteren e H. Berendsen. 1990. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **29**, 992.
- [9] B. Brooks, R. Bruccoreli, B. Olafson, D. States, S. Swaminathan e M. Karplus. 1983. *J. Comp. Chem.* **4**, 187. S. Weiner, P. Kollman, D. Case, U. Singh, C. Ghio, G. Alagone, S. Profeta e P. Weiner. 1984. *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 765. S. Weiner, P. Kollman, D. Nguyen e D. Case. 1986. *J. Comp. Chem.* **7**, 230. W. van Gunsteren e H. Berendsen. "Groningen Molecular Simulation (GROMOS)". *Library Manual, Biomos, Groningen*. 1987. M. Clark, R. Cramer e N. van Opdenbosch. 1989. *J. Comp. Chem.* **10**, 982.
- [10] K. Wiberg. 1965. *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 1070.

Capítulo 4

Resultados

4.1.- Introdução

A Fig. 4.1 apresenta os espectros de EPR em banda X de MbNO e HbNO a 10 K e 1 mW. Em baixas temperaturas estes espectros apresentam uma forte dependência com a potência.^[1]

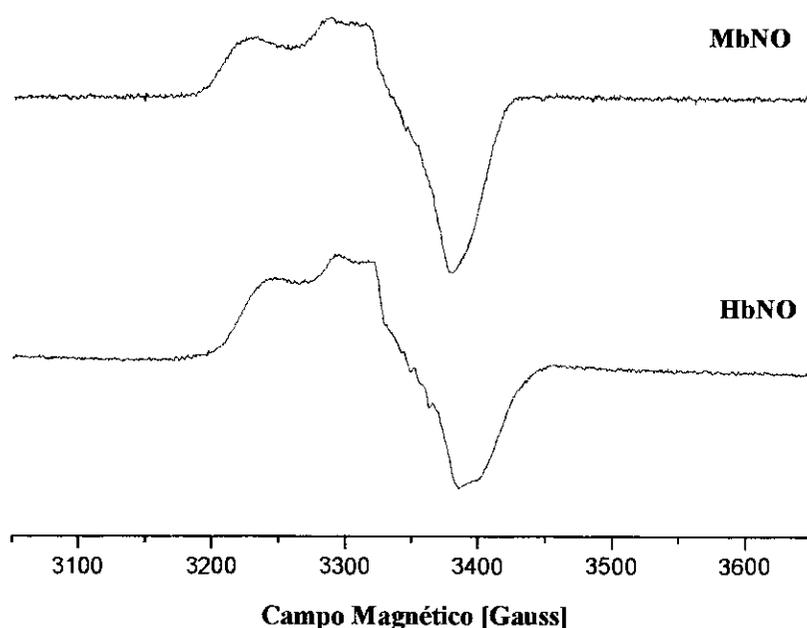


Figura 4.1.- Espectros de EPR em banda X de MbNO e HbNO a 10 K.

Estes espectros apresentam estrutura hiperfina não resolvida devido as interações entre o complexo paramagnético e os núcleos na sua vizinhança tais como o N_α da histidina próxima, o N do ligante, os quatro nitrogênios da protoporfirina e os prótons da protoporfirina e os dos resíduos dos amino ácidos His-F8, His-E7 e Val-E11.

Neste trabalho estamos interessados em estudar e caraterizar as interações hiperfinas com ^{14}N da histidina próxima e com os prótons dos resíduos de amino ácidos,

já que estes núcleos estão envolvidos na estabilização e definição das conformações importantes para o funcionamento destas proteínas.

De acordo com resultados anteriores, os espectros EPR de nitrosil hemoproteínas, estão compostos de duas espécies paramagnéticas correspondentes a duas configurações estereoquímicas, uma com simetria rômbrica e outra com simetria axial. Num estudo recente de EPR por banda Q (Fig. 4.2), os espectros foram reconstruídos considerando que a fração, as larguras de linhas e os fatores g destas componentes variam em função da temperatura, entre 19 K e 200 K.^[2]

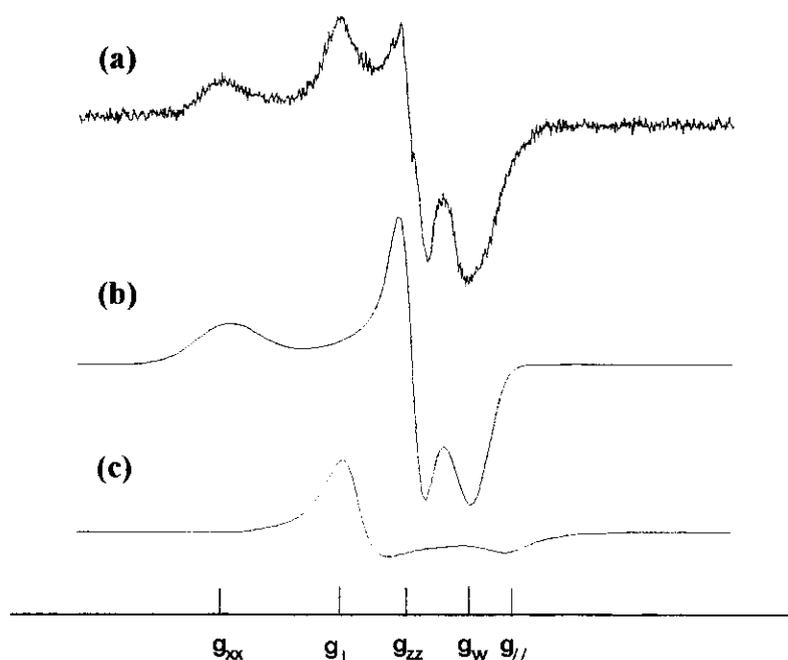


Figura 4.2.- Componentes do espectro de EPR em banda Q de MbNO a 40 K. (a) espectro experimental, (b) componente rômbrica e (c) componente axial.

Estes fatos serão usados na análise e interpretação dos espectros de ENDOR, tanto para ^{14}N como para ^1H (prótons). Também será usado o método de seleção de orientações devido à complexidade apresentada nestes espectros (principalmente para prótons), compostos por uma superposição de muitas componentes.

4.2.- Medidas de ENDOR de ^{14}N da histidina próxima

A Fig. 4.3 apresenta os espectros de ENDOR de ^{14}N de MbNO a 10 K, na faixa de radiofrequência correspondentes às interações com o N_ϵ da His-F8. O espectro superior foi medido para campo baixo e o outro para campo alto.

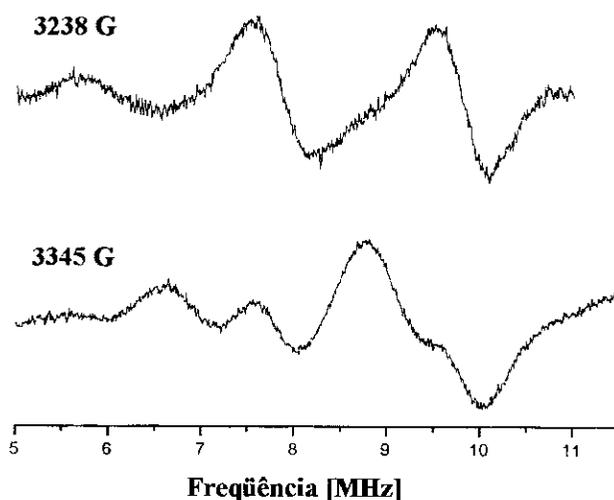


Figura 4.3.- Espectros de ENDOR de ^{14}N de MbNO em 3245 G e 3345G a 10 K.

Kapfl e Hüttermann,^[3] encontraram espectros similares. Eles analisaram estes espectros considerando só uma espécie paramagética, a rômbrica. Na literatura existente não existem trabalhos que considerem as duas simetrias.

Portanto de acordo com os nossos resultados de banda Q, os espectros na região de campo baixo (3238 G) só têm contribuição da componente rômbrica enquanto a campo alto (3345 G) as duas simetrias contribuem. Analisaremos nossos espectros de ENDOR considerando as mesmas combinações espectrais. As figuras 4.4 e 4.5 mostram os ajustes dos espectros, tanto para campo baixo como para campo alto. Em ambos casos foram considerados os tensores A e P não coincidentes com g e também não coincidentes entre si.

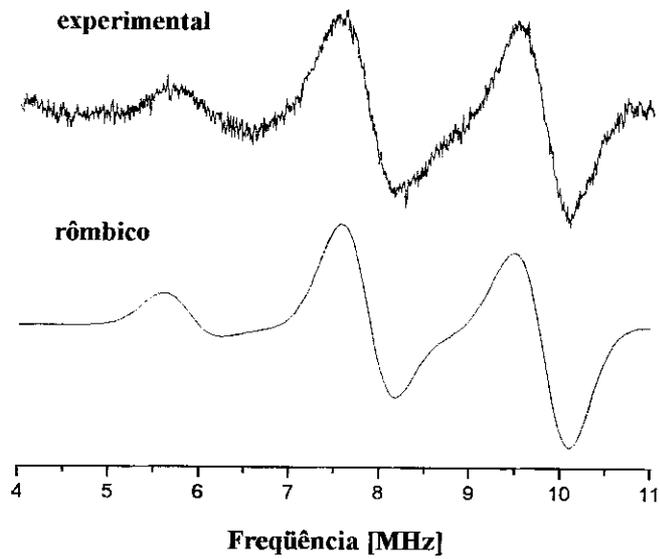


Figura 4.4.- Espectros experimental a 10 K e simulado de ENDOR de ^{14}N de MbNO em 3238 G.

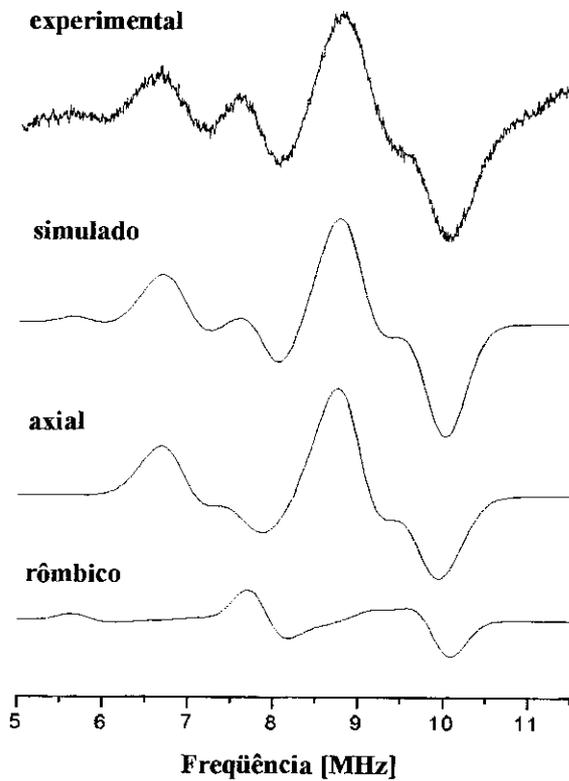


Figura 4.5.- Espectros experimental a 10 K e simulado de ENDOR de ^{14}N de MbNO em 3345 G, mostrando as suas respectivas componentes.

Para HbNO, medimos uma série de espectros em função do campo magnético (Fig. 4.6) a 10 K, para poder observar detalhadamente a variação das componentes dos espectros.

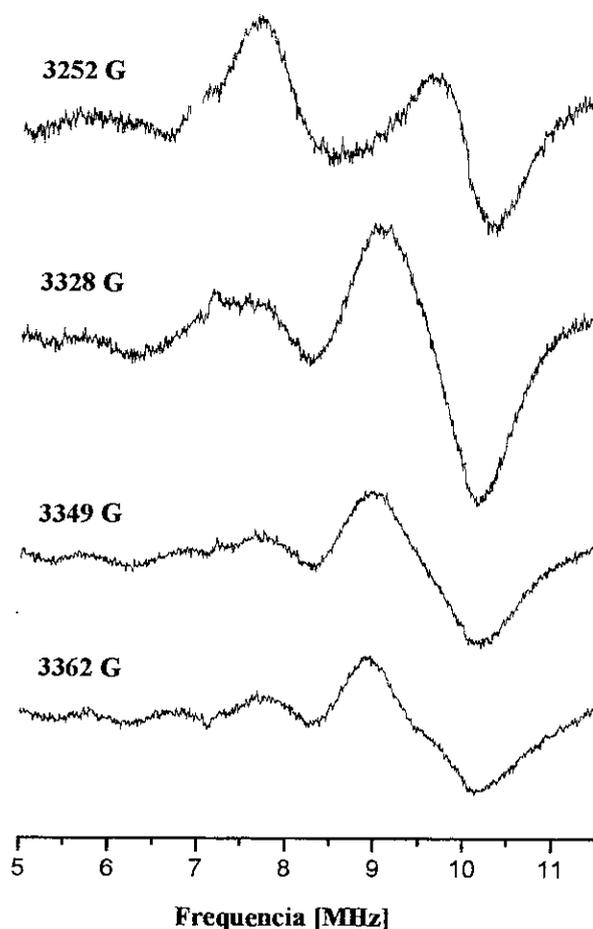


Figura 4.6.- Espectros de ENDOR de ^{14}N de HbNO a 10 K, em função do campo magnético.

De forma similar a MbNO, ajustamos os espectros considerando a superposição das duas simetrias em campos altos e somente simetria rômbrica para campos baixos. As figuras 4.7 e 4.8 mostram a simulações dos espectros de ENDOR de ^{14}N em 3252 G e 3349 G.

A Tabela 4.1 reúne os parâmetros de ajuste para os espectros ENDOR de ^{14}N , de MbNO e HbNO, tanto para simetria rômbrica como para a simetria axial. É importante ressaltar que para iniciar estas simulações tomamos como referência os valores da literatura para A e P .^[5] Estes parâmetros foram iterativamente modificados para obter bons ajustes com os espectros experimentais, chegando aos valores da Tabela 4.1.

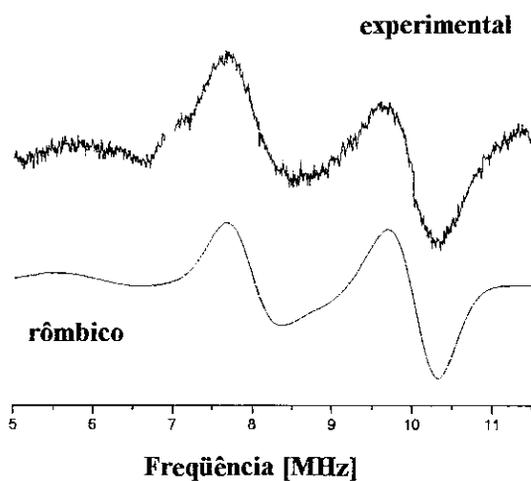


Figura 4.7.- Espectros experimental a 10 K e simulado de ENDOR de ^{14}N de HbNO em 3252 G.

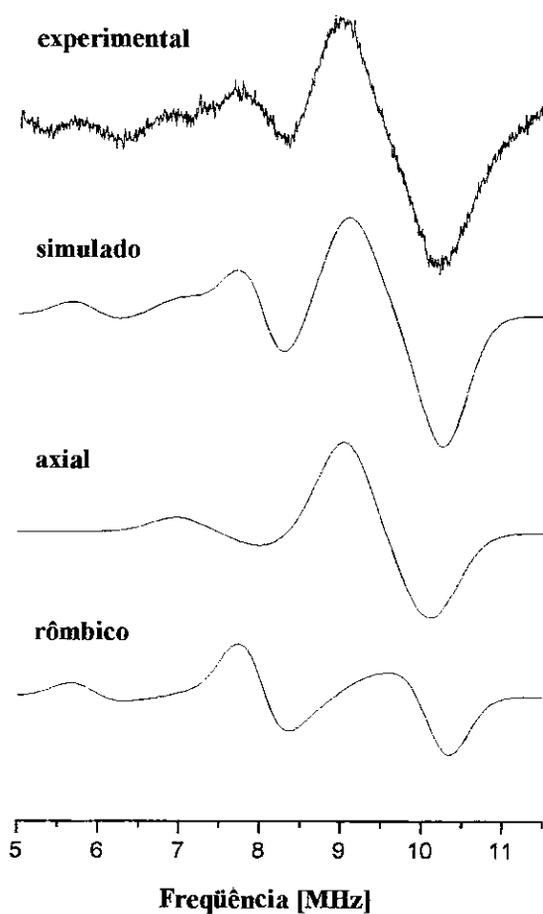


Figura 4.8.- Espectros experimental a 10 K e simulado de ENDOR de ^{14}N de HbNO em 3349 G, e suas respectivas componentes.

Tabela 4.1.- Parâmetros de ajuste das simulações dos espectros de ENDOR de ^{14}N a 10 K para MbNO e HbNO.

Simetria Rômbica					
Nitrosil Mioglobina			Nitrosil Hemoglobina		
$g_{xx} = 2.078$	$g_{zz} = 2.005$	$g_{yy} = 1.982$	$g_{xx} = 2.075$	$g_{zz} = 2.005$	$g_{yy} = 1.975$
A_{xx} (MHz)	A_{zz} (MHz)	A_{yy} (MHz)	A_{xx} (MHz)	A_{zz} (MHz)	A_{yy} (MHz)
16.4	15.7	15.9	16.7	16	16.2
Ângulos de Euler de A em relação a g					
$\phi = 39^\circ$	$\theta = 170^\circ$	$\psi = 0^\circ$	$\phi = 39^\circ$	$\theta = 170^\circ$	$\psi = 0^\circ$
P_{xx} (MHz)	P_{zz} (MHz)	P_{yy} (MHz)	P_{xx} (MHz)	P_{zz} (MHz)	P_{yy} (MHz)
0	-0.7	-0.7	0	-0.75	-0.75
Ângulos de Euler de P em relação a A					
$\alpha = -20^\circ$	$\beta = 0^\circ$	$\gamma = 0^\circ$	$\alpha = -20^\circ$	$\beta = 0^\circ$	$\gamma = 0^\circ$
Simetria Axial					
Nitrosil Mioglobina			Nitrosil Hemoglobina		
$g_{ } = 2.030$	$g_{\perp} = 1.976$		$g_{ } = 2.028$	$g_{\perp} = 1.999$	
$A_{ }$ (MHz)	A_{\perp} (MHz)		$A_{ }$ (MHz)	A_{\perp} (MHz)	
17	16.3		17.2	16.5	
Ângulos de Euler de A em relação a g					
$\phi = 0^\circ$	$\theta = 180^\circ$	$\psi = 0^\circ$	$\phi = 0^\circ$	$\theta = 180^\circ$	$\psi = 0^\circ$
$P_{ }$ (MHz)	P_{\perp} (MHz)		$P_{ }$ (MHz)	P_{\perp} (MHz)	
0	-0.27		0	-0.2	
Ângulos de Euler de P em relação a A					
$\alpha = 85^\circ$	$\beta = 0^\circ$	$\gamma = 0^\circ$	$\alpha = 60^\circ$	$\beta = 0^\circ$	$\gamma = 0^\circ$

A boa qualidade dos ajuste se deve a duas considerações. A primeira leva em conta a diferença de intensidade nas linhas de uma mesma espécie, provocada pela relaxação cruzada, já observada nestes sistemas;^[6] e como descrito no Cap.3 as regiões de alta frequência (7 MHz a 11.5 MHz) e baixa frequência (5 MHz a 9 MHz) podem ser ajustadas separadamente. A segunda considera as diferentes orientações dos tensores A e P , que na simetria rômbrica (-20°) é em sentido inverso que na simetria axial (85° para MbNO e 60° para HbNO).

Neste problema temos as seguintes considerações geométricas: o valor máximo da interação hiperfina (A_{\max}) se encontra na direção da ligação Fe^{2+} -N(His-F8) e o valor mínimo (A_{\min}) numa direção perpendicular a A_{\max} , mas não perpendicular ao plano do imidazol. Nos ajustes consideramos P_{\max} coincidente com A_{\max} e da literatura sabemos que P_{\min} é perpendicular ao plano do imidazol,^[3] portanto α é o ângulo entre as direção do A_{\min} e a normal do plano do imidazol (Fig. 4.9).

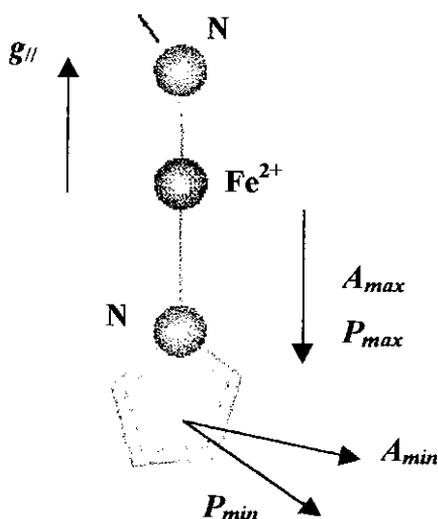


Figura 4.9.- Ilustração das direções máximas e mínimas dos tensores A e P em relação a configuração geométrica da His-F8 e o complexo paramagnético no caso axial.

Portanto nossos resultados indicam que para as estruturas rômica de HbNO e MbNO o plano da His-F8 tem orientações diferentes, e ambas têm orientações diferentes da estrutura axial.

Foi feita uma variação com a temperatura, entre 5 K e 40 K, dos espectros de ENDOR de ^{14}N para campos magnéticos baixo e alto, tanto para MbNO quanto para HbNO. Para ambos casos os espectros não mudam nesta faixa de temperatura (Fig. 4.10).

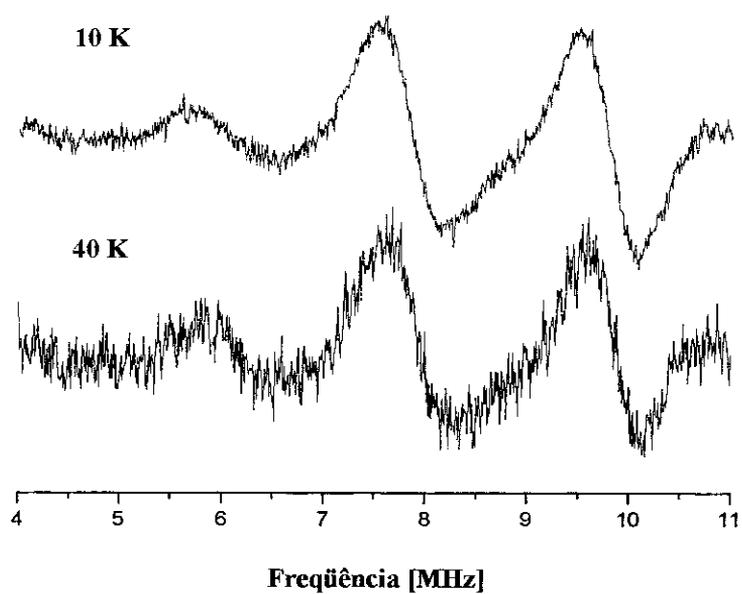


Figura 4.10.- Espectros de ENDOR de ^{14}N de MbNO em 3238 G a 10 K e 40 K.

4.3.- Medidas de ENDOR de ^1H

4.3.1.- Nitrosil Mioglobina

A Fig. 4.11 mostra os espectros de ENDOR de prótons de MbNO em solução congelada a 10 K de temperatura, nas direções correspondentes a $g = 2.069$, 2.0065 e 1.987; selecionados por terem melhor resolução.

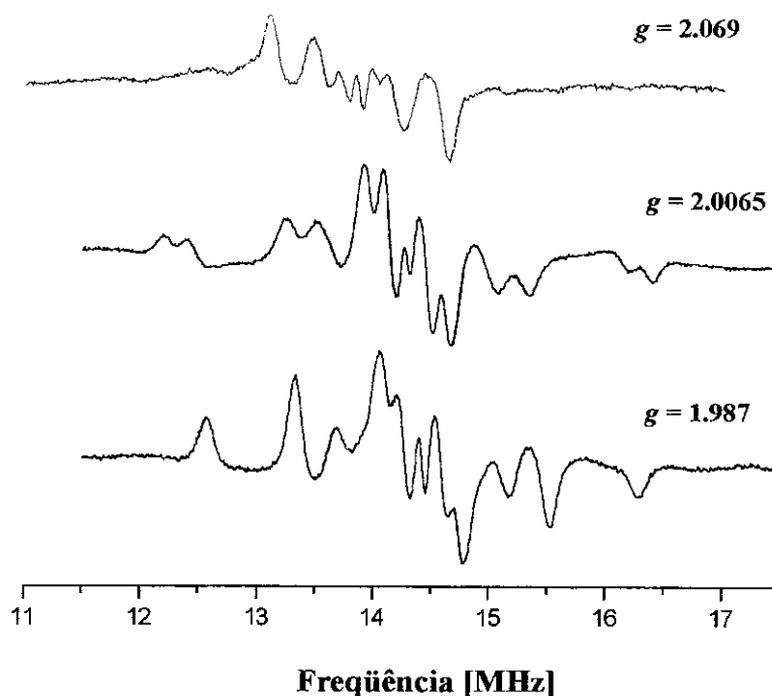


Figura 4.11.- Espectros de ENDOR de prótons de MbNO a 10 K em campos magnéticos correspondentes aos fatores g indicados.

A faixa de frequência entre 11 MHz e 17.5 MHz apresenta as linhas correspondentes às interações hiperfinas entre o complexo paramagnético e os prótons que se encontram na vizinhança da protoporfirina. Estes espectros se apresentam com bastante simetria de forma e intensidade. Uma variação com a temperatura entre 4 K e 40 K mostra que os espectros de prótons de MbNO não mudam nesta faixa de temperatura (Fig. 4.12).

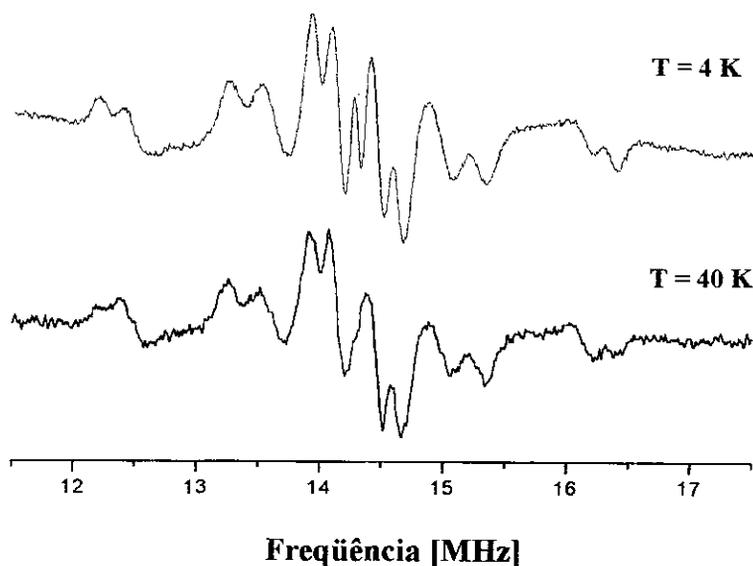


Figura 4.12.- Espectros de ENDOR de prótons de MbNO em $g = 2.0065$ a 4 K e 40 K.

Como manifestamos no primeiro capítulo, a dificuldade na reconstrução das estruturas implica no uso de técnicas e métodos alternativos, com a finalidade de encontrar uma configuração coerente com nossos dados de EPR e ENDOR. Primeiramente usamos o método de seleção de orientações,^[7] já que a análise e interpretação dos espectros de ENDOR de prótons é complicada devido à superposição de muitas espécies (para certos valores de campo têm que ser considerada a superposição de prótons pertencentes às estruturas rômbrica e axial). Com esse objetivo fizemos medidas de ENDOR para diferentes campos magnéticos do espectro de EPR (Fig. 4.13).

Por outro lado usamos as coordenadas de cadeias α , obtidas por raios-X em baixas temperaturas,^[8] para calcular as interações hiperfinas dos prótons da His-E7, da Val-E11, da His-F8 e da heme, em relação ao centro de spin reduzido (definido no capítulo 3), para as duas simetrias (rômbrica e axial). Para simetria rômbrica usamos a eq. 2.28 (ver capítulo 2), e para a simetria axial a expressão simplificada.^[9] Estes valores foram usados como dados iniciais nas simulações dos espectros de ENDOR. Porém para espectroscopia ENDOR, com resolução melhor que a cristalografia de raios-X, as coordenadas de mioglobina não são necessariamente idênticas às coordenadas de cadeias α .

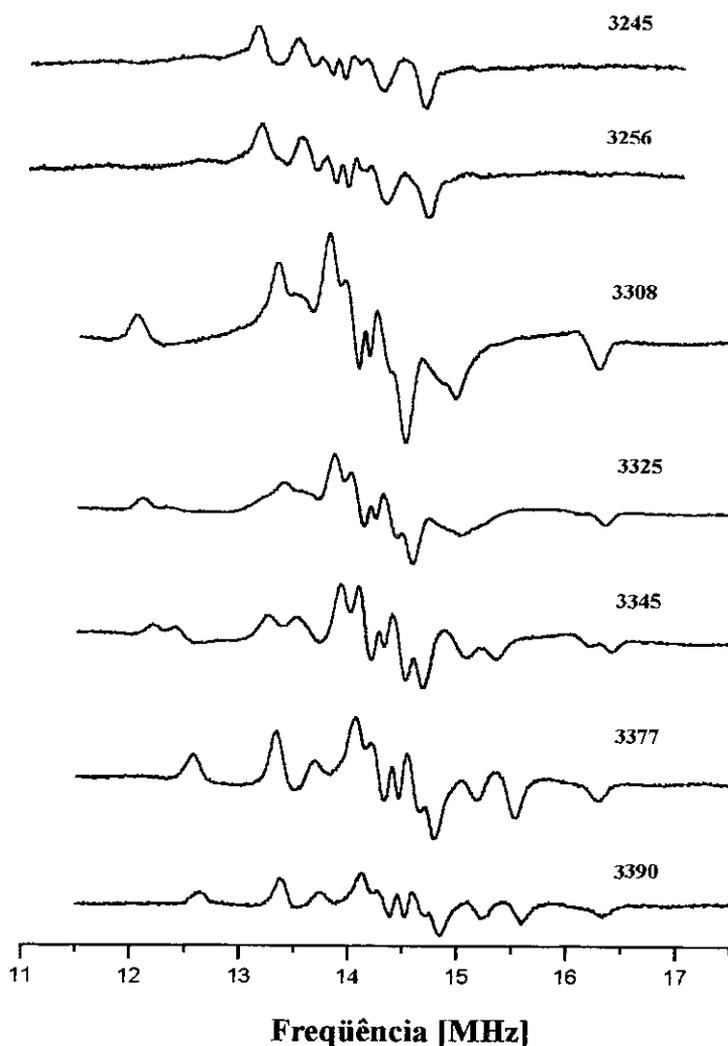


Figura 4.13.- Espectros experimentais de ENDOR de prótons de MbNO a 10 K para diferentes valores de campo magnético.

Depois de calcular os valores principais do tensor A para cada um dos treze prótons observados nas simetrias rômbrica e axial do complexo $N_e(\text{His-F8})\text{-Fe}^{2+}\text{-N(NO)}$, analisamos o comportamento do espectro de cada próton nas direções selecionadas pelo campo magnético. Cinco prótons na simetria axial e oito na simetria rômbrica foram identificados nos espectros (Fig. 4.14). Logo os parâmetros iniciais foram iterativamente modificados, de acordo com a teoria de ENDOR de policristais, com o objetivo de obter melhores ajustes dos espectros experimentais. A dependência dos espectros do campo magnético foi reproduzida (Fig. 4.15).

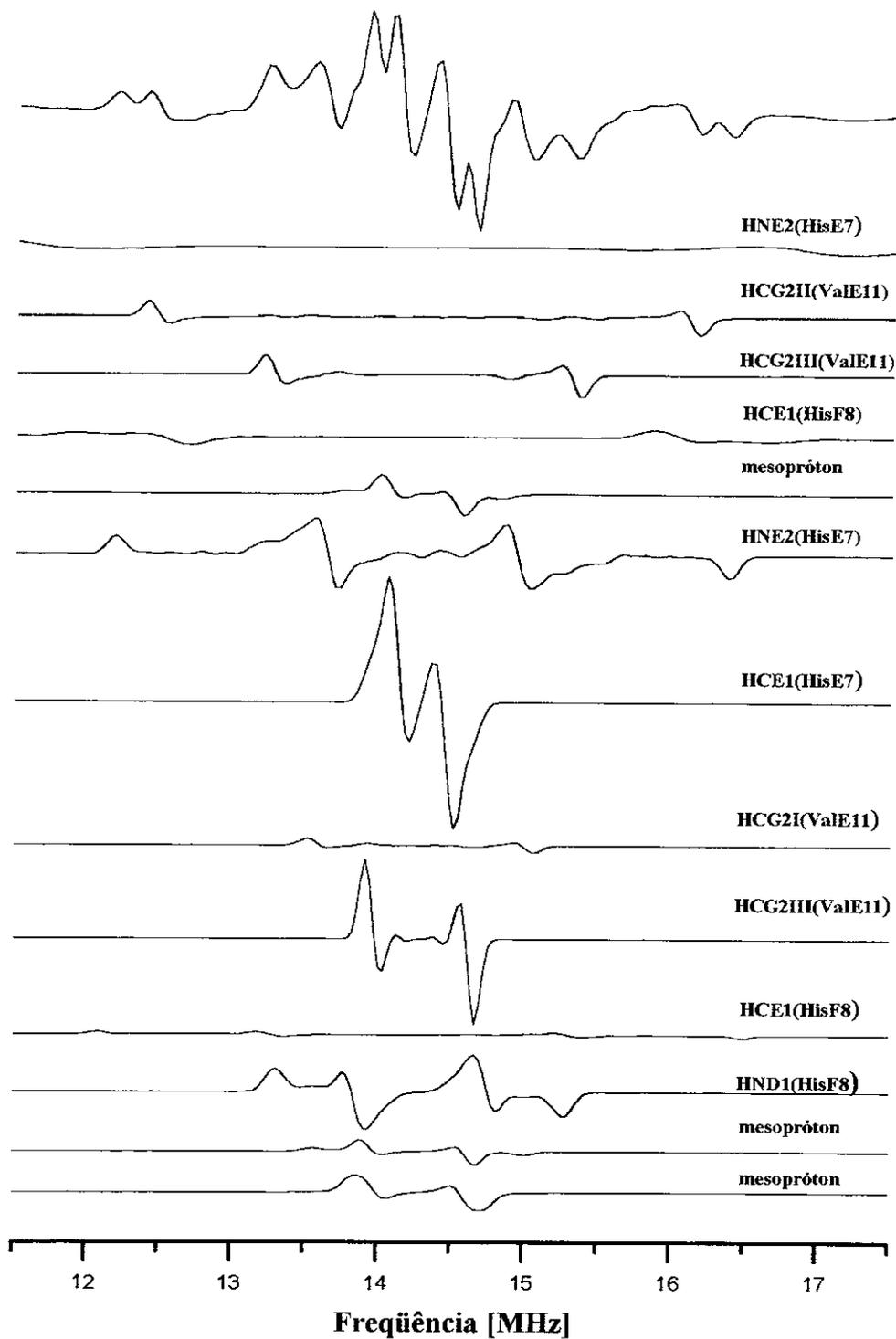


Figura 4.14.- Composição típica dos espectros de ENDOR de prótons de MbNO simulados para um campo magnético de 3345 G. As cinco superiores correspondem à estrutura axial e as oito seguintes à estrutura rômbica.

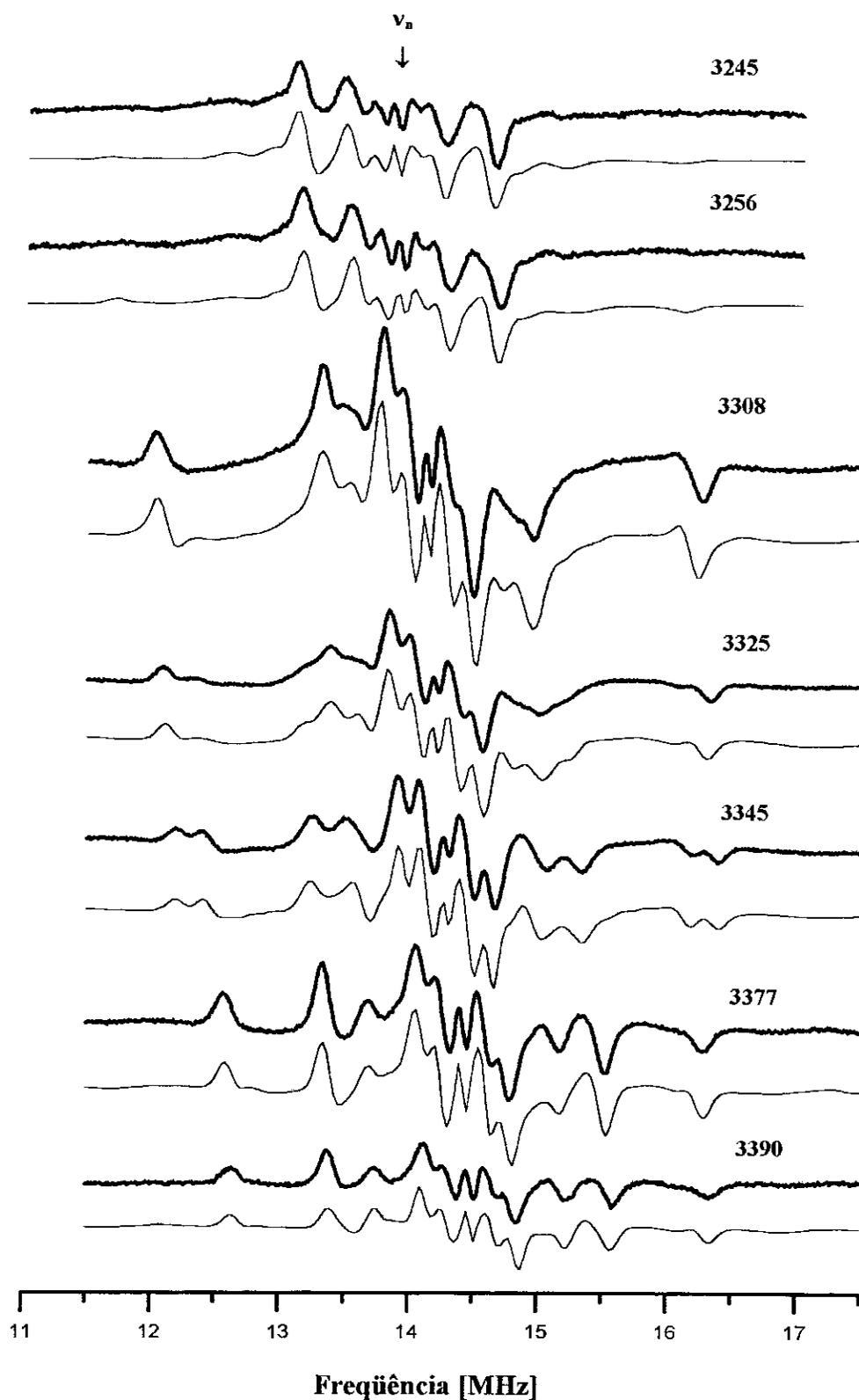


Figura 4.15.- Espectros de ENDOR de prótons de MbNO, experimentais e simulados para diferentes valores de campo magnético a 10 K. A seta indica a posição da linha dos prótons matriciais.

Os parâmetros finais (Tabela 4.2) dão muito bom ajuste para os espectros experimentais (Fig. 4.15). Consideramos somente simetria rômbrica em 3245 G e 3256 G, e superposição de ambas simetrias em 3308 G, 3325 G, 3345 G, 3377 G e 3390 G.

Na estrutura rômbrica o complexo paramagnético interage com os prótons HNE2 e HCE1 da His-E7, com HCG2I e HCG2III da Val-E11, com HND1 e HCE1 da His-F8 e com os mesoprótons HCHA e HCHB que foram considerados equivalentes a HCHC e HCHD respectivamente. Por outro lado na estrutura axial, a interação é com o próton HNE2 da His-E7, com HCG2II e HCG2III da Val-E11, com HCE1 da His-F8 e com os quatro mesoprótons que foram considerados equivalentes.

Tabela 4.2.- Parâmetros de ajuste das simulações dos espectros de ENDOR de prótons, considerando os prótons identificados em nitrosil mioglobina.

Simetria Rômbrica			
Fatores g	$g_{xx} = 2.078$	$g_{zz} = 2.005$	$g_{yy} = 1.982$
Acoples Hiperfínos	A_{xx} (MHz)	A_{zz} (MHz)	A_{yy} (MHz)
HNE2 (His-E7)	-4.2	2.57	1.3
HCE1 (His-E7)	-0.36	-0.38	0.68
HCG2I (Val-E11)	1.47	-0.73	1.47
HCG2III (Val-E11)	0.7	0.7	-0.35
HND1 (His-F8)	-2.07	-0.25	-0.9
HCE1 (His-F8)	-2	1.13	-4.4
HCHA, HCHC (heme)	-0.95	-0.6	1.9
HCHB, HCHD (heme)	1.5	-0.71	-0.71
Simetria Axial			
Fatores g	$g_{ } = 2.030$	$g_{\perp} = 1.976$	
Acoples Hiperfínos	$A_{ }$ (MHz)	A_{\perp} (MHz)	
HNE2 (His-E7)	5.8	-2.9	
HCG2II (Val-E11)	3.7	-1.6	
HCG2III (Val-E11)	2.1	-1.2	
HCE1 (His-F8)	3.35	-4.8	
mesoprótons	1.1	-0.55	

Tabela 4.3.- Coordenadas dos prótons identificados em MbNO em relação ao sistema de eixos de g com origem no centro de spin reduzido, obtidos dos parâmetros da Tabela 4.2.

Simetria Rômbica			
Prótons	θ_N (°)	ϕ_N (°)	r (Å)
HNE2 (His-E7)	52	71	2.72
HCE1 (His-E7)	61	57	4.17
HCG2I (Val-E11)	62	46	3.88
HCG2III (Val-E11)	55	31	4.19
HND1 (His-F8)	142	54	4.44
HCE1 (His-F8)	155	64	3.48
HCHA, HCHC	75	81	4.32
HCHB, HCHD	86	1	4.80
Simetria Axial			
Prótons	θ_N	r (Å)	
HNE2 (His-E7)	30	3.35	
HCG2II (Val-E11)	42	3.99	
HCG2III (Val-E11)	24	4.68	
HCE1 (His-F8)	116	3.46	
heme	90	5.89	

Com os parâmetros da Tabela 4.2, calculamos r , dos prótons identificados, usando a eq. 2.28 (ver Cap. 2). θ_N e ϕ_N são obtidos da simulação (como foi explicado no capítulo 3). Estas coordenadas foram calculadas em relação ao sistema de eixos principais do tensor g , tomando como origem do sistema o centro de spin reduzido (Tabela 4.3).

Kapfl e Hüttermann,^[10] analisaram espectros de ENDOR de cristais de MbNO considerando somente a estrutura rômbica, e identificaram nove prótons da His-E7, Val-E11, Phe-CD1 e da protoporfirina. Os prótons da Phe-CD1 não foram aqui considerados porque se encontram a uma distância grande (> 6 Å) do complexo paramagnético, e em consequência a interação é muito fraca. Por outro lado observar-se diferenças entre prótons da Val-E11 e dois prótons da His-F8 foram identificados na estrutura rômbica.

4.3.2.- Nitrosil Hemoglobina

Para a interpretação dos espectros de HbNO usamos a metodologia descrita anteriormente (Fig. 4.16).

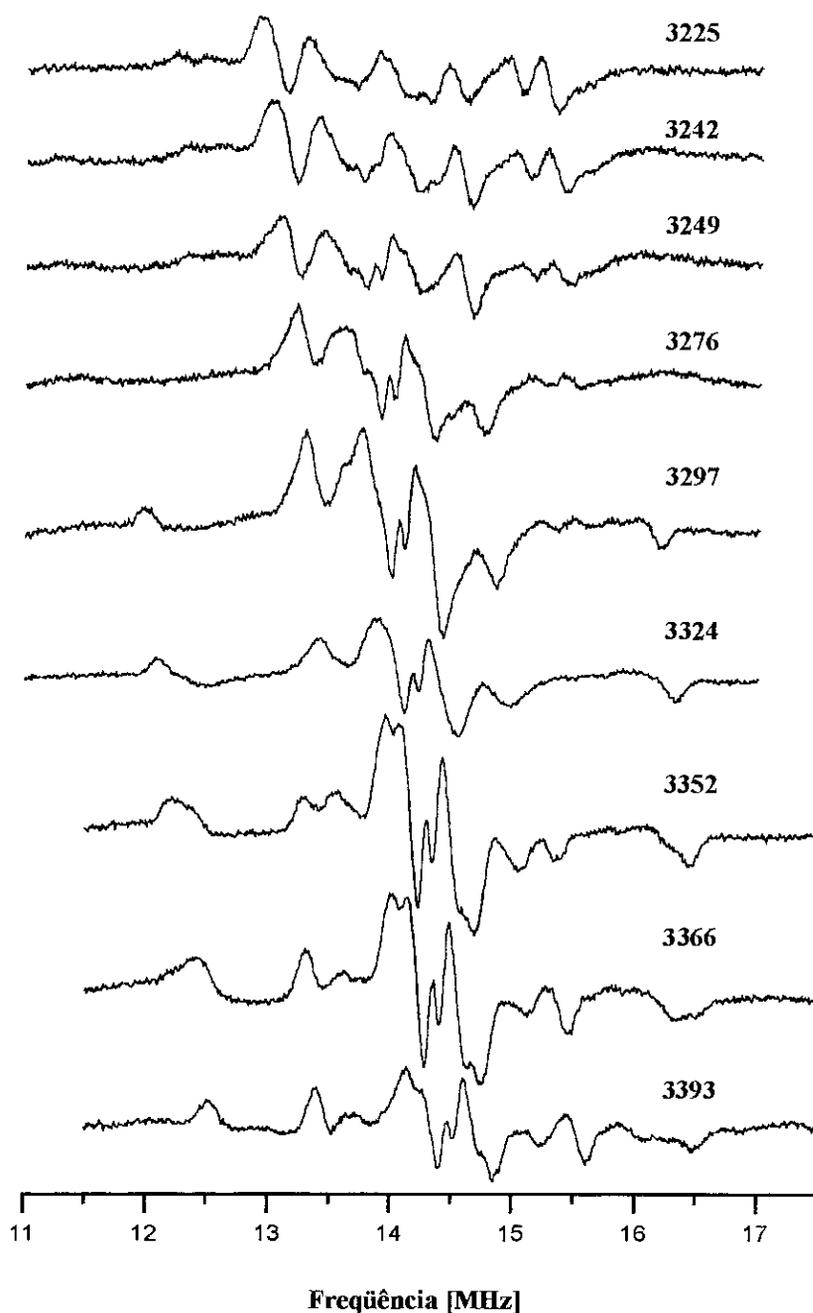


Figura 4.16.- Espectros experimentais de ENDOR de prótons de HbNO a 10 K para diferentes valores de campo magnético.

A maior parte destes espectros apresenta assimetrias na forma e intensidade das linhas espectrais, devido provavelmente aos efeitos de relaxação cruzada, observada nos espectros de ^{14}N de MbNO e HbNO. Foi feita uma variação com a temperatura entre 5 K e 45 K. Observa-se que os espectros de prótons de HbNO mudam nesta faixa de temperatura (Fig. 4.17).

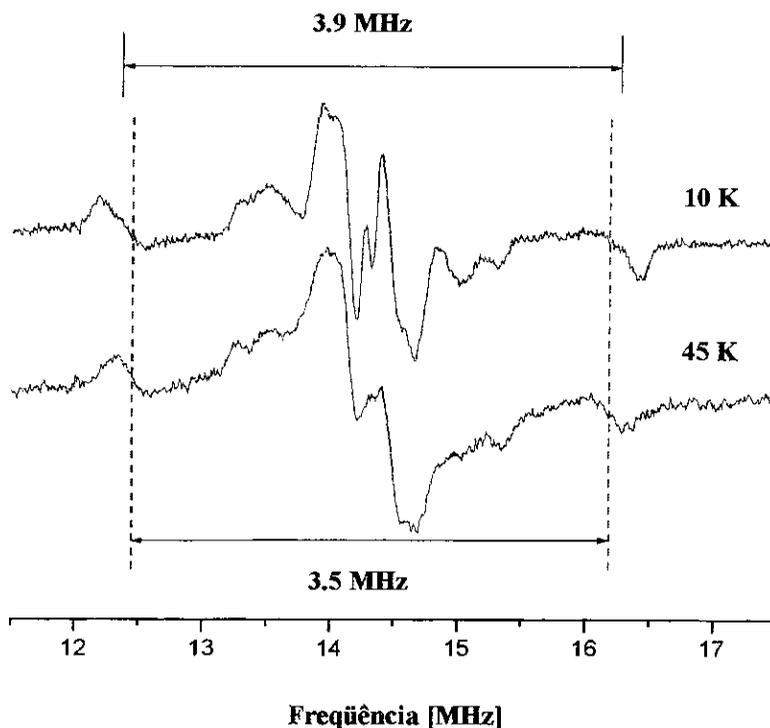


Figura 4.17.- Espectros de ENDOR de prótons de HbNO em $g = 2.0065$ a 10 K e 45 K. As linhas tracejadas indicam uma variação no valor da interação hiperfina nessa direção.

Para analisar os espectros de prótons de HbNO a 10 K, temos que considerar além da superposição de estruturas rômbrica e axial, a superposição de cadeias α e β . Desta vez usamos as coordenadas das duas cadeias obtidas por raios-X,^[8] que são diferentes. Como anteriormente calculamos as interações hiperfinas, usando a aproximação do centro de spin reduzido, dos prótons da His-E7, da Val-E11, da His-F8 e da heme, para as duas simetrias. No caso rômbrico usando a eq. 2.28 (ver capítulo 2), e para o caso axial usando a expressão simplificada.^[9]

Para os campos de 3225 G, 3242 G e 3249 G (Fig. 4.18) consideramos somente a estrutura rômbrica de cadeias α e β .

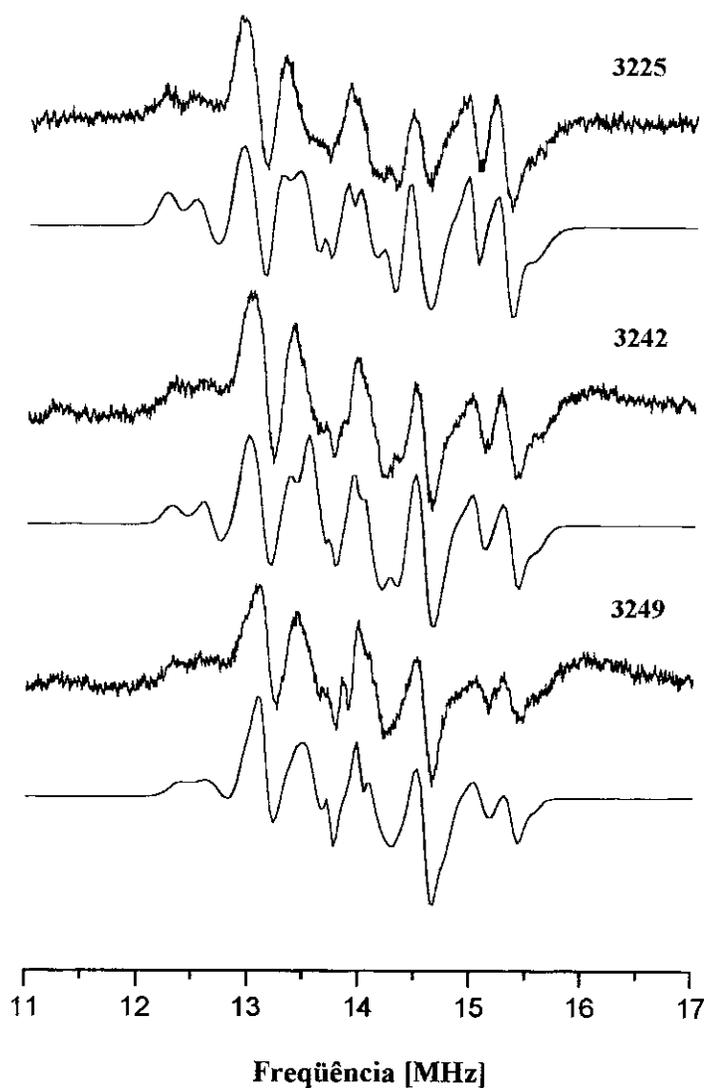


Figura 4.18.- Espectros de ENDOR de prótons de HbNO, experimentais e simulados para 3225 G, 3242 G e 3249 G a 10 K.

Foram identificados sete prótons na simetria rômbrica e cinco na simetria axial de cadeias α , e oito prótons na simetria rômbrica e quatro na simetria axial de cadeias β (Figs. 4.19 e 4.20).

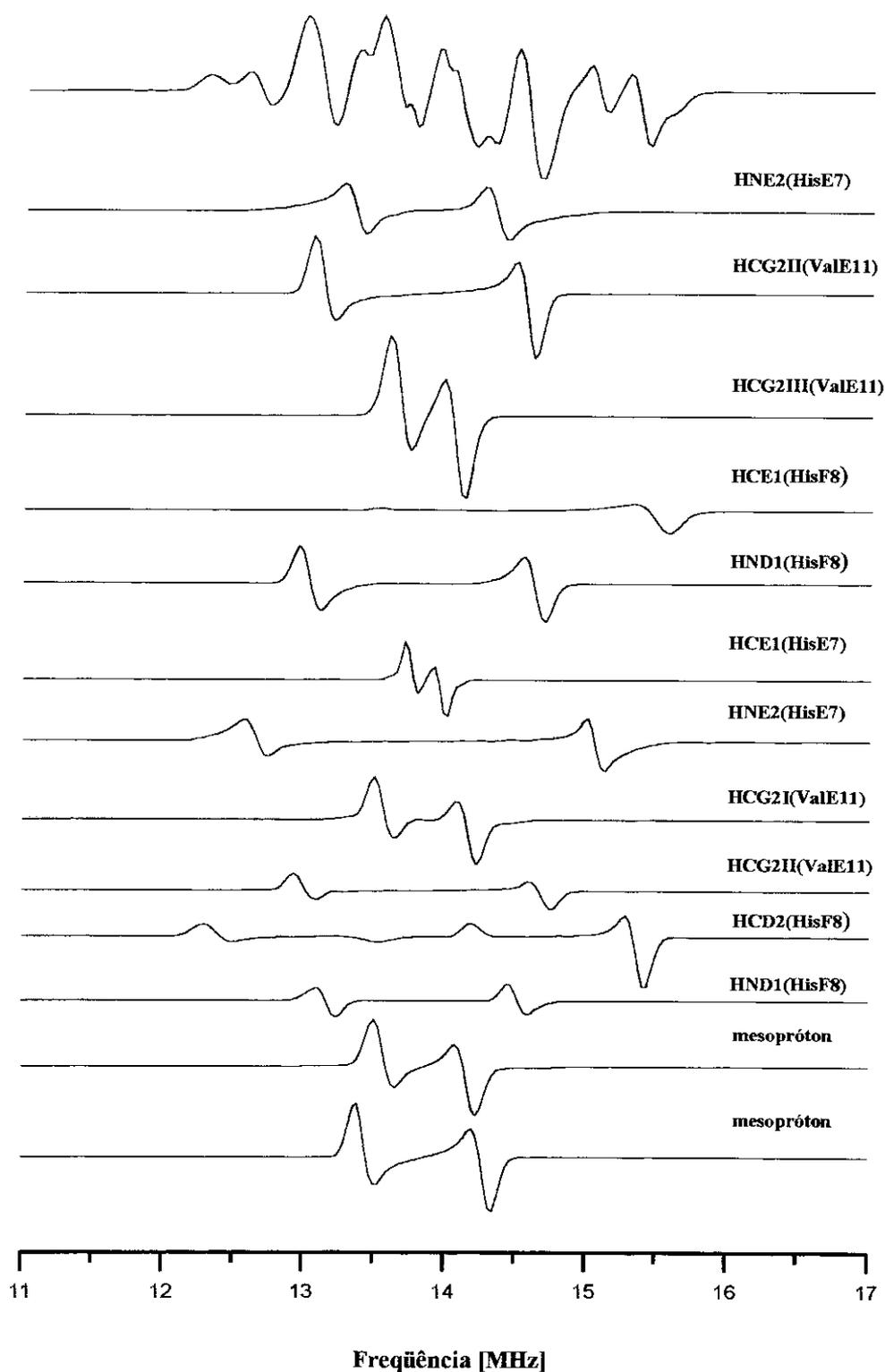


Figura 4.19.- Composição dos espectros de ENDOR de prótons de HbNO simulados, para um campo magnético de 3242 G (somente simetria rômbrica). As cinco componentes superiores correspondem às cadeias α , as seis seguintes às cadeias β e as duas últimas a os prótons da heme considerados equivalentes para as duas cadeias.

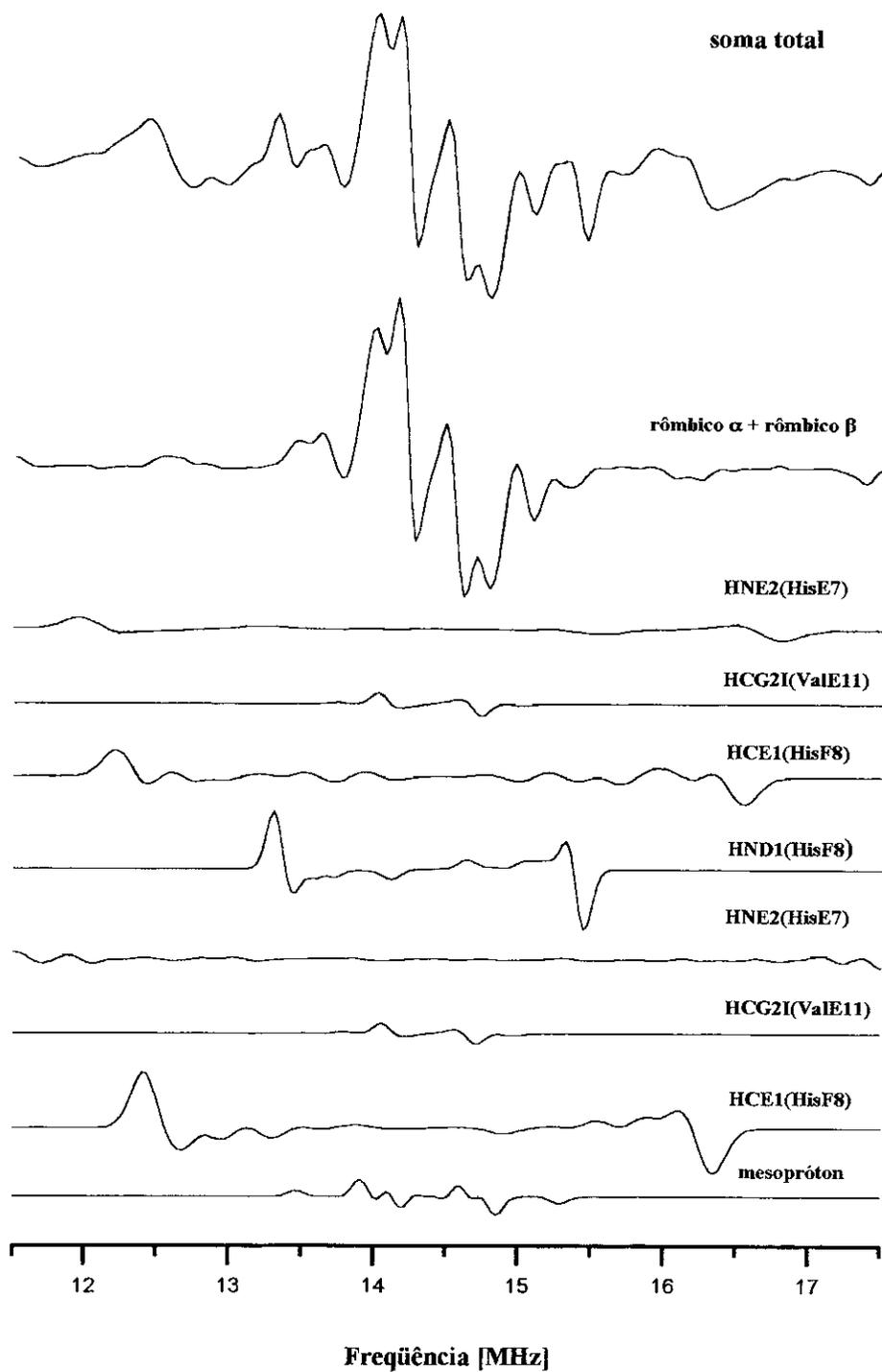


Figura 4.20.- Composição dos espectros de ENDOR de prótons de HbNO simulados, para um campo magnético de 3366 G (superposição de simetrias rômbica e axial). De cima para baixo, a primeira componente corresponde a soma das simetrias rômbica de cadeias α e β , as quatro seguintes à simetria axial de cadeias α , as três seguintes às cadeias β e a última a os prótons da heme considerados equivalentes para as duas cadeias.

Uma vez identificados os prótons, os parâmetros iniciais foram iterativamente modificados, com o objetivo de obter os melhores ajustes dos espectros experimentais. A dependência dos espectros em relação ao campo magnético também foi reproduzida (Figs. 4.18 e 4.21). Em 3276 G, 3297 G, 3324 G, 3352 G e 3363 G foi considerada a superposição das simetrias rômbrica e axial.

Os parâmetros finais estão dados na Tabela 4.4, para HbNO os parâmetros finais foram bastante próximos aos parâmetros iniciais quando comparados com a variação dos parâmetros de MbNO. Isto mostra simplesmente que as coordenadas de MbNO são diferentes de α -NO. Da mesma forma a partir destes dados obtém-se as posições dos prótons identificados em α -NO e β -NO (Tabela 4.5).

Na estrutura rômbrica de cadeias α o complexo paramagnético interage com o próton HNE2 da His-E7, com HCG2II e HCG2III da Val-E11, com HCE1 e HND1 da His-F8. Para a estrutura rômbrica de cadeias β a interação é com os prótons HNE2 e HCE1 da His-E7, com HCG2I e HCG2II da Val-E11, com HCD2 e HND1 da His-F8. Os prótons HCHA e HCHB da protoporfirina foram considerados equivalentes a HCHC e HCHD, respectivamente, nas cadeias α , e todos eles equivalentes a seus similares em cadeias β .

Na estrutura axial de cadeias α o complexo paramagnético interage com o próton HNE2 da His-E7, com HCG2I da Val-E11, com HCE1 e HND1 da His-F8. Na estrutura axial de cadeias β a interação é com o próton HCG2I da Val-E11 e com HCE1 da His-F8. Os quatro mesoprótons foram considerados equivalentes nas cadeias α , e equivalentes a seus similares em cadeias β .

Da análise destes espectros em função ao campo magnético, observamos que os espectros de prótons da His-F8, tanto para simetria rômbrica quanto para simetria axial, sofrem um forte alargamento da suas larguras de linha em campos intermediários (orientações próximas a $g = 2.005$).

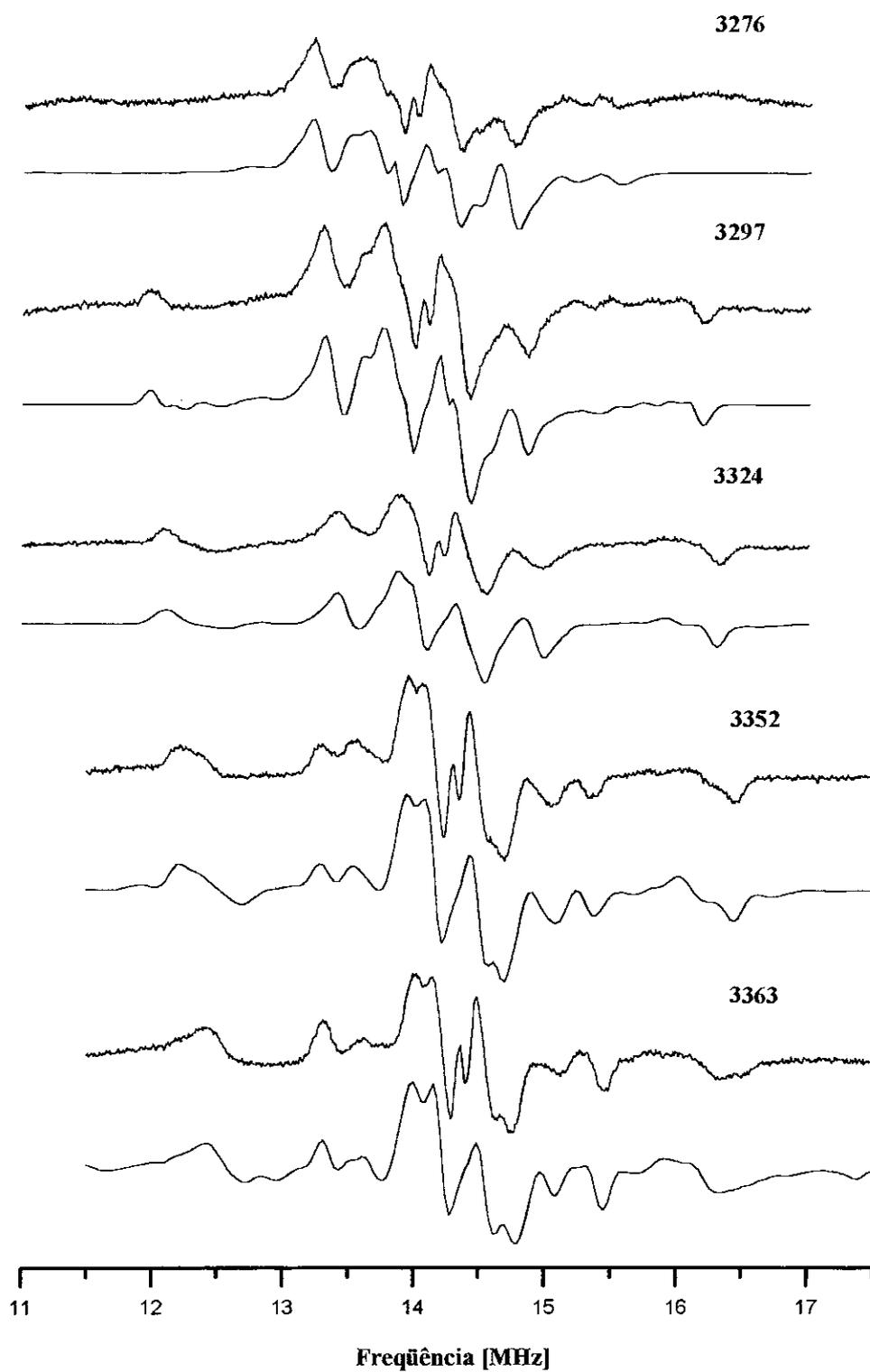


Figura 4.21.- Espectros de ENDOR de prótons de HbNO, experimentais e simulados em 3276 G, 3297 G, 3324 G, 3352 G e 3363 G a 10 K.

Tabela 4.4.- Parâmetros de ajuste das simulações dos espectros de ENDOR de prótons de nitrosil hemoglobina.

Cadeias α (rômbica)			
Fatores g	$g_{xx} = 2.075$	$g_{zz} = 2.005$	$g_{yy} = 1.975$
Acoples Hiperfinos	A_{xx} (MHz)	A_{zz} (MHz)	A_{yy} (MHz)
HNE2 (His-E7)	-3.5	1	2.6
HCG2II (Val-E11)	3.4	-1.5	-1.5
HCG2III (Val-E11)	0.9	-0.45	-0.45
HCE1 (His-F8)	-2.4	-3.4	0.67
HND1 (His-F8)	-1.95	-1.61	-0.79
HCHA, HCHC (heme)	-0.95	-0.6	1.9
HCHB, HCHD (heme)	1.6	-0.85	-0.85
Cadeias β (rômbica)			
HCE1 (His-E7)	-0.3	-0.22	0.5
HNE2 (His-E7)	-3.7	-2.4	5.8
HCG2I (Val-E11)	1.3	-0.65	-0.65
HCG2II (Val-E11)	3.6	-1.5	-1.8
HCD2 (His-F8)	-3.05	-0.63	-3.05
HND1 (His-F8)	-1.8	-1.3	-1.3
Cadeias α (axial)			
Fatores g	$g_{\parallel} = 2.028$	$g_{\perp} = 1.999$	
Acoples Hiperfinos	A_{\parallel} (MHz)	A_{\perp} (MHz)	
HNE2 (His-E7)	4.7	-2.35	
HCG2I (Val-E11)	1.3	-0.65	
HCE1 (His-F8)	2.7	-4.2	
HND1 (His-F8)	-0.5	-2.1	
mesoprótons	1.8	-0.9	
Cadeias β (axial)			
HNE2 (His-E7)	6.12	-3.06	
HCG2I (Val-E11)	1.2	-0.6	
HCE1 (His-F8)	1.05	-3.83	

Tabela 4.5.- Coordenadas dos prótons identificados em HbNO em relação ao sistema de eixos de g com origem no centro de spin reduzido, obtidos dos parâmetros da Tabela 4.4.

Cadeias α (rômbica)			
Prótons	θ_N (°)	ϕ_N (°)	r (Å)
HNE2 (His-E7)	50°	84°	2.84
HCG2II (Val-E11)	82°	14°	3.46
HCG2III (Val-E11)	67°	32°	4.17
HCE1 (His-F8)	106°	60°	3.31
HND1 (His-F8)	119°	83°	5.3
HCHA, HCHC	109°	89°	4.45
HCHB, HCHD	93°	0°	4.51
Cadeias β (rômbica)			
HCE1 (His-E7)	60°	122°	4.6
HNE2 (His-E7)	70°	89°	2.82
HCG2I (Val-E11)	60°	1°	4.86
HCG2II (Val-E11)	73°	5°	3.4
HCD2 (His-F8)	141°	141°	3.46
HND1 (His-F8)	133°	65°	5.5
Cadeias α (axial)			
Prótons	θ_N	r (Å)	
HNE2 (His-E7)	31°	3.12	
HCG2I (Val-E11)	28°	4.98	
HCE1 (His-F8)	116°	3.29	
HND1 (His-F8)	141°	5.3	
mesoprótons	90°	4.5	
Cadeias β (axial)			
HNE2 (His-E7)	49°	2.97	
HCG2I (Val-E11)	51°	5.1	
HCE1 (His-F8)	151	3.67	

4.3.3.- Variação do espectro de ENDOR de prótons de HbNO com a temperatura

Como foi colocado no item anterior, foi observada variação dos espectros de ENDOR de prótons de HbNO com a temperatura, para vários valores de campo magnético. A variação mais notória é observada para campos altos. Comparando os espectros em 3345 G para 10 K e 45 K (Fig. 4.17), observamos diferenças em várias faixas de radiofrequência. A análise desta variação com a temperatura é em geral complicada devido a grande superposição de componentes, e esta superposição gera múltiplas possibilidades na variação dos parâmetros de ajuste.

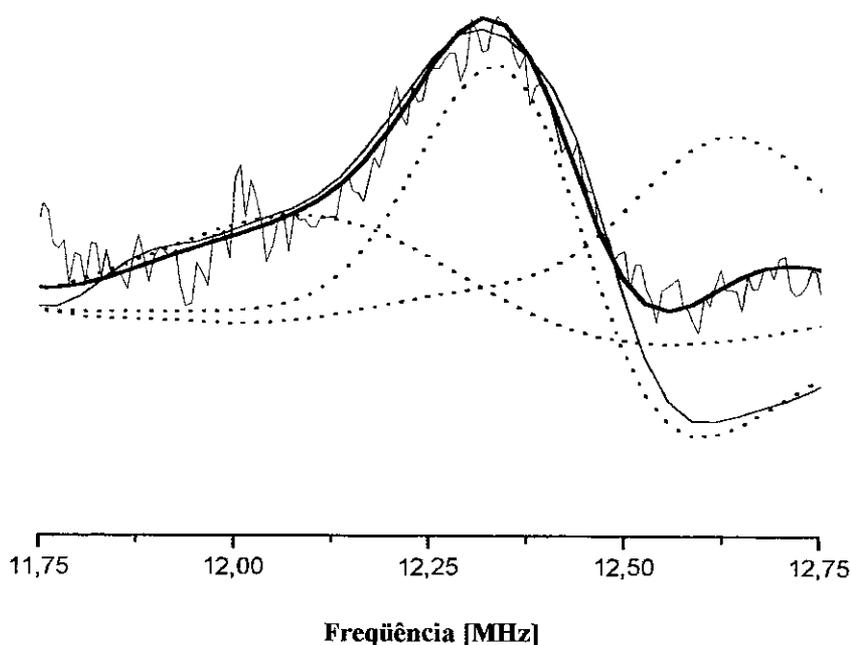


Figura 4.22.- Espectro de ENDOR de prótons de HbNO a 45 K na região que apresenta variação com a temperatura. Ajuste com os novos parâmetros (linha contínua grossa), ajuste com os parâmetros de 10 K (linha contínua fina) e componentes (linhas tracejadas).

Para o campo magnético de 3345 G e na faixa entre 11.75 MHz e 12.75 MHz temos a superposição de somente três componentes (Fig. 4.22, linhas tracejadas), o que facilita a análise nesta região do espectro. Mostramos esta região do espectro simulado a 10 K de temperatura (Fig. 4.22, linha contínua fina), que não é satisfatório. Foi necessário mudar os valores das interações hiperfinas de duas das três componentes para obter um bom ajuste (Fig. 4.22, linha contínua grossa). Isto implica duas possibilidades;

variação dos valores principais dos tensores ou das suas orientações em relação a seu respectivo tensor g . As duas componentes cuja variação foi considerada, correspondem aos prótons HNE2 da His-E7 na simetria rômica e HCE1 da His-F8 na simetria axial, ambos da cadeia β . Em ambos casos, a constante de acoplamento hiperfino nesta direção diminui com aumento da temperatura.

No caso do próton HNE2 da His-E7, considerando só a variação na orientação do tensor A em relação ao tensor g , com uma variação de 2° em relação a sua posição a 10 K. Por outro lado se consideramos somente a variação nos valores principais do tensor hiperfino (ou seja na distância), ele se afasta 0.1 \AA da sua posição a 10 K.

Também observamos diferenças no espectro em outras faixas de radiofrequência, como a faixa dos prótons da Val-E11 (entre 13.1 MHz e 13.8 MHz). Neste caso a superposição de componentes é grande e dificulta a interpretação.

4.4.- Referências

-
- [1] E. Wajnberg, M. Linhares, L. El-Jaick e G. Bemski. 1992. *Eur. Biophys. J.* **21**, 57.
 - [2] M. Flores, E. Wajnberg e G. Bemski. 1997. *Biophys. J.* **73**, 3225.
 - [3] R. Kappl e J. Hüttermann. "Advanced EPR: Applications in Biology and Biochemistry". *Elsevier, Amsterdam*. 1989.
 - [5] M. Höhn, J. Hüttermann, J. Chien e L. Dickinson. 1983. *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 109.
 - [6] E. Wajnberg e O. Alves. 1996. *J. Magn. Reson. B.* **113**, 119.
 - [7] G. Rist e J. Hyde. 1970. *J. Chem. Phys.* **52**, 4633.
 - [8] J. Hüttermann, C. Burgard e R. Kappl. 1994. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **90**, 3077.
 - [9] B. Hoffman e R. Gurbiel. 1989. *J. Magn. Reson.* **82**, 309.
 - [10] R. Kappl e J. Hüttermann. 1989. *Israel J. Chem.* **29**, 73.

Capítulo 5

Discussão e Conclusões

5.1.- Otimização das estruturas de MbNO e HbNO

Desde os experimentos pioneiros realizados por Feher,^[1] primeiro a usar a técnica de ENDOR no estudo das hemoproteínas, muitos trabalhos têm descrito diferentes aspectos da estrutura eletrônica de prótons e nitrogênios na região da heme; principalmente em meta- e nitrosil hemoglobina e mioglobina,^[2] devido a grande similaridade da estrutura eletrônica do $\text{Fe}^{2+}\text{-NO}$ paramagnético a do $\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$ fisiológico. Porém não conhecemos nenhum trabalho na literatura que estude os espectros de ENDOR de MbNO em solução congelada e considere a superposição das simetrias rômbrica e axial.

Neste trabalho, os espectros de ENDOR foram obtidos usando o método de seleção de orientações, e analisados considerando as duas conformações presentes em baixas temperaturas, utilizando a aproximação do centro de spin reduzido. Dentro desta aproximação, observamos diferenças entre as duas simetrias características de MbNO e HbNO, entre cadeias α e β de HbNO, e finalmente entre prótons de um mesmo amino ácido presente no bolso da heme, na região distal.

Os espectros de ENDOR foram bem ajustados permitindo identificar, caracterizar, e observar as diferenças entre as interações hiperfinas de prótons na vizinhança da heme. As coordenadas obtidas para prótons identificados para a estrutura axial não se ajustam com as posições dos respectivos amino ácidos na estrutura completa de MbNO e HbNO (axiais),^[3] disponíveis no banco de estrutura de proteínas (PDB) obtidas por raios-X a temperatura ambiente. No caso da simetria rômbrica não existe uma estrutura completa tanto para MbNO quanto para HbNO.

Considerando que a baixa temperatura a estrutura das proteínas é diferente da temperatura ambiente, é interessante obter uma estrutura de amino ácidos coerente com nossos dados de prótons identificados por ENDOR e com as distâncias e ângulos das

ligações químicas (C-H, H-C-H, etc.). No caso axial as coordenadas calculadas dos espectros de ENDOR foram introduzidas no sistema de referência da proteína e estas posições são consideradas como vínculos geométricos. O programa THOR,^[4] é então usado para otimizar a estrutura e verificar que conformação da proteína é consistente com nossas identificações. Para o caso rômico a posição do ligante foi construída a partir dos dados de EPR e ENDOR,^[5] o mesmo procedimento do axial foi seguido com os respectivos prótons, incluindo o complexo paramagnético nos vínculos geométricos.

As figuras 5.1, 5.2 e 5.3 apresentam o resultado da otimização para MbNO, α -NO e β -NO, em ambas simetrias. As coordenadas finais para ambas simetrias estão em bom acordo com os valores teóricos de comprimentos de ligação C-H e dos ângulos diedrais H-C-H.

No caso de HbNO a dependência com a temperatura não foi reproduzida totalmente devido à grande superposição de componentes, que leva a mais de uma interpretação. De fato esta mudança pode ser relacionada com duas questões, a primeira é uma mudança da posição do ligante (a variação da interação hiperfina do próton HCE1 da His-F8 reforça esta hipótese), a outra é uma mudança na posição dos resíduos dos amino ácidos (His-E7 e Val-E11) que é compatível com a flexibilidade do esqueleto da proteína com a temperatura.^[6] Uma mistura dos dois efeitos não pode ser descartada.

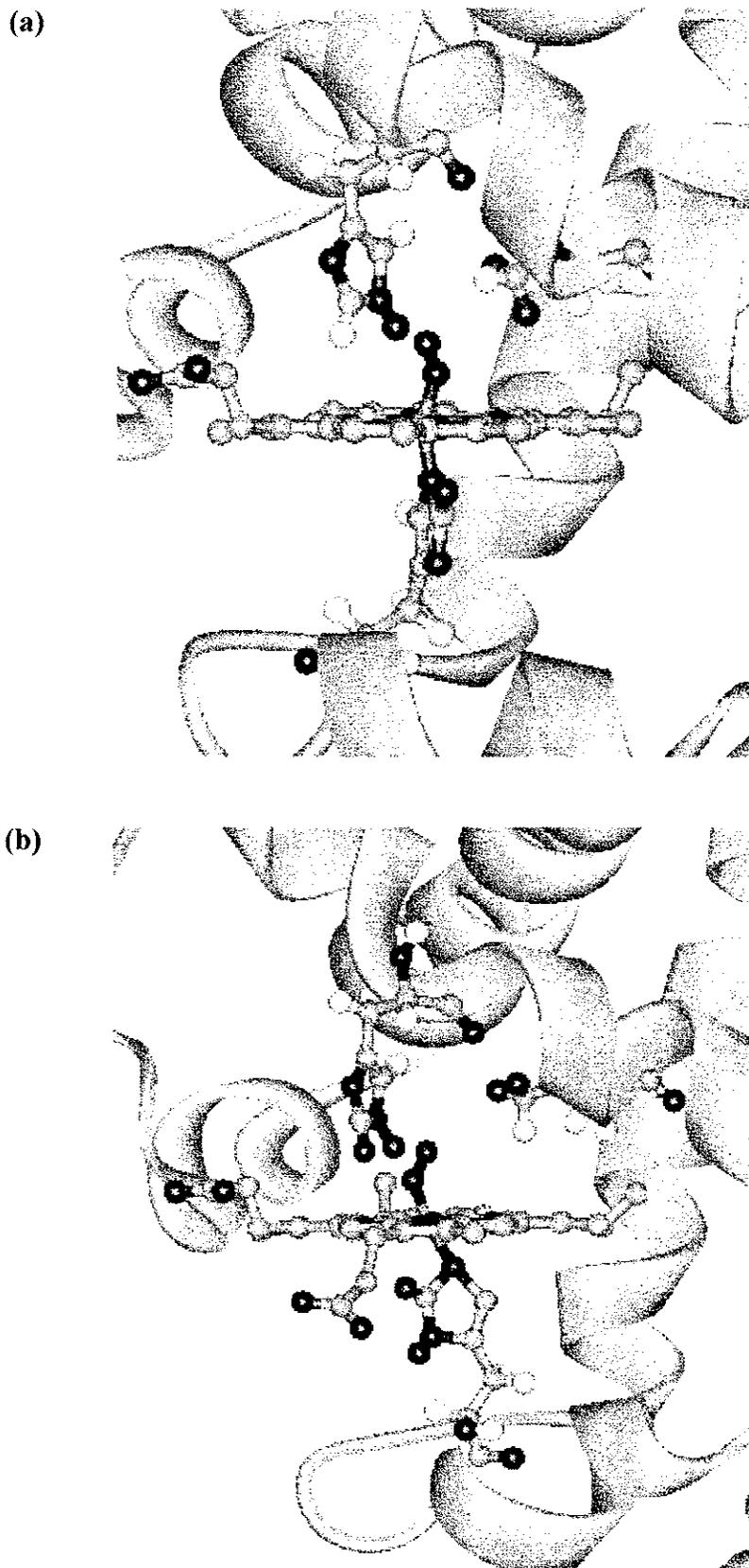


Figura 5.1.- Estruturas finais de MbNO tanto para a simetria (a) axial quanto para a simetria (b) rômica mostrando os prótons identificados por ENDOR (verde). Ferro (laranja), nitrogênio (azul), carbono (cinza) e oxigênio (vermelho).

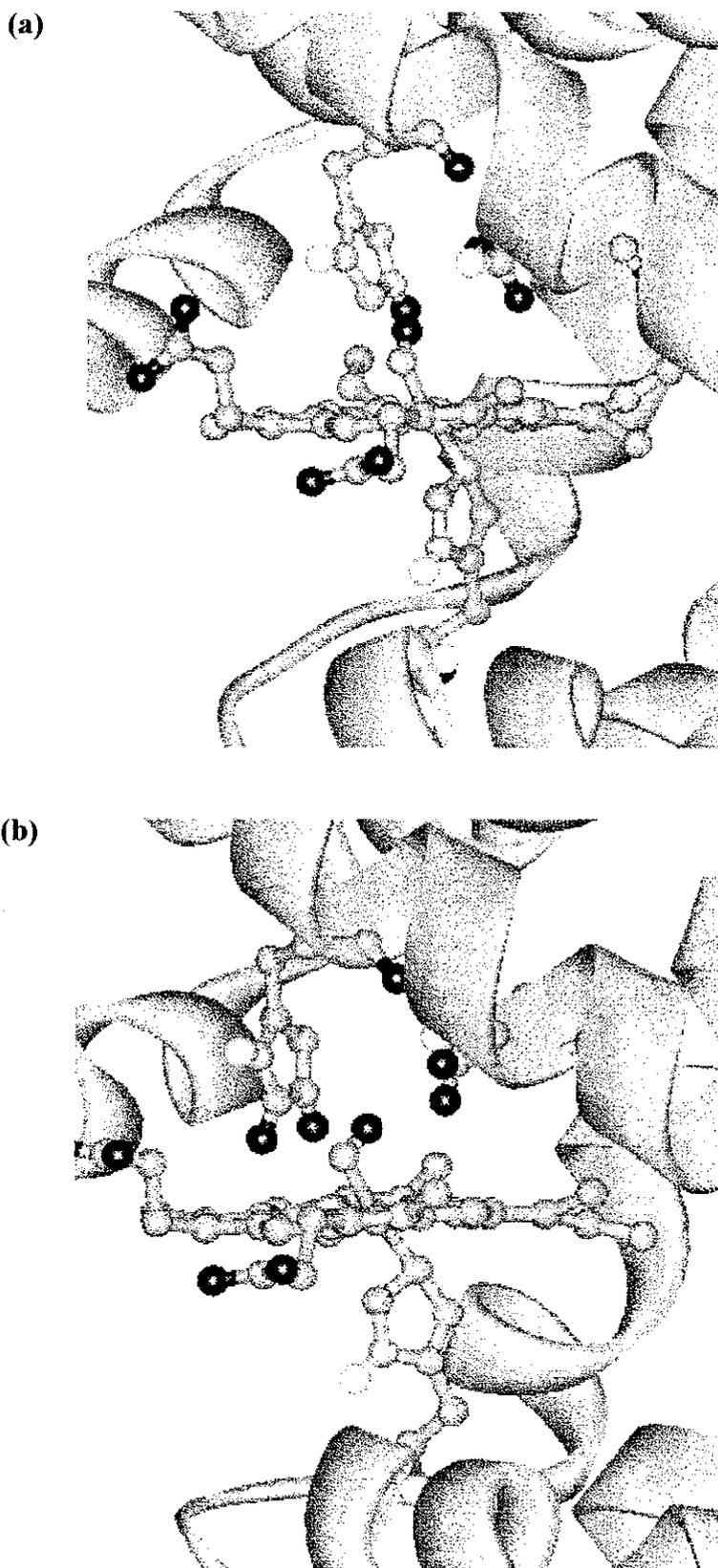


Figura 5.2.- Estruturas finais da simetria rômica para (a) α -NO, (b) para β -NO mostrando os prótons identificados por ENDOR (verde). Ferro (laranja), nitrogênio (azul), carbono (cinza) e oxigênio (vermelho).

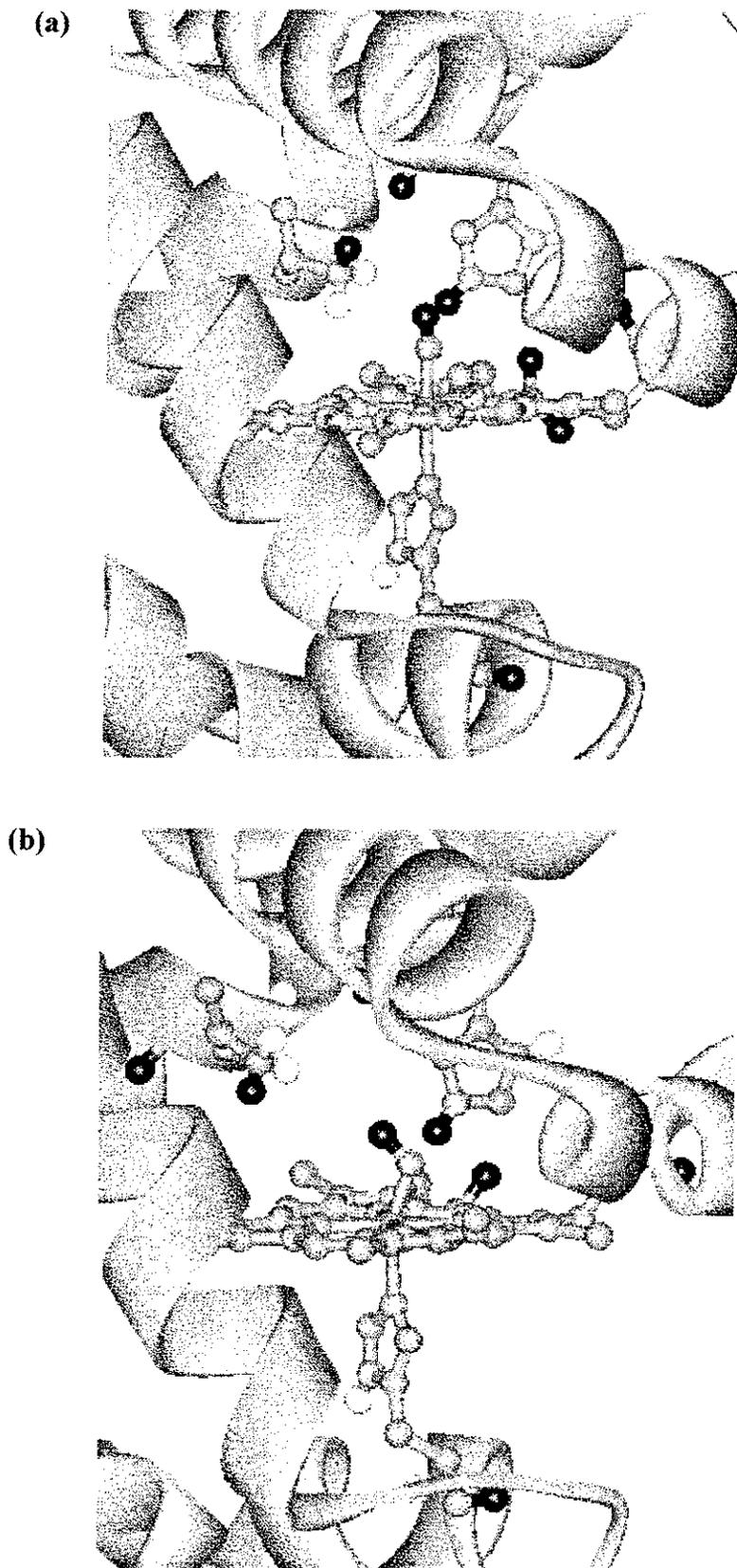


Figura 5.3.- Estruturas finais da simetria axial para (a) α -NO, (b) para β -NO mostrando os prótons identificados por ENDOR (verde). Ferro (laranja), nitrogênio (azul), carbono (cinza) e oxigênio (vermelho)

5.2.- Papel da His-E7 e Val-E11 em nitrosil hemoproteínas

O papel da histidina distal, His-E7, em mioglobina de mamíferos e hemoglobinas tem sido estudado intensivamente, já que existe a suspeita de que este é o resíduo chave no controle da afinidade pelo oxigênio.^[7] A valina distal, Val-E11, é também de interesse porque ela tem contato com o ligante do Fe e com a His-E7, restringindo o tamanho do sítio de ligação nestas proteínas. Diferentes autores têm sugerido que a Val-E11, tanto em mioglobina quanto em hemoglobina podem orientar a ligação do oxigênio junto com o N_ε da His-E7 para estabelecer uma mais eficiente ponte de hidrogênio e que sua proximidade ao ligante inibe a ligação do CO, impedindo a sua geometria Fe-C-O linear mais favorável.^[8]

Três mecanismos foram propostos para explicar a habilidade da mioglobina para estabilizar O₂ e evitar a ligação do CO. Primeiro, acessibilidade estérica: a proximidade da histidina distal (His-E7) ao ferro da heme reduz a afinidade pela ligação do CO prevenindo a formação da ligação Fe-C-O linear, configuração perpendicular ao plano da heme que foi observada por análise de dados de cristalografia de raios-X no estudo dos complexos heme CO.^[9] Em contraste, a configuração inclinada favorecida pela coordenação do O₂ não seria estericamente impedida pela histidina distal.^[10] Dois, ponte de hidrogênio: estudos de difração de neutrons em mioglobina de cachalote revelaram uma ponte de hidrogênio entre a His-E7 e o ligante para a ligação do O₂ mas não para a ligação do CO.^[11] Terceiro, polaridade local: Traylor et al. (1985) mostraram que a composição do solvente e a polaridade local também contribuem para a discriminação entre CO e O₂.^[12]

Dos experimentos de Frauenfelder,^[13] sabemos que o ligante em carboxi mioglobina (MbCO) pode assumir três conformações (*A*₀, *A*₁, *A*₃). Na conformação *A*₀, a ligação Fe-C-O é quase linear,^[14] sendo a conformação equivalente para a conformação axial em MbNO e HbNO. Diversos experimentos mostraram que a His-E7 não interage com o ligante CO na conformação *A*₀ de MbCO.^[15] Não obstante, nossos resultados de prótons mostram que a His-E7 e Val-E11 interagem com o NO na conformação axial de MbNO e HbNO (ligação linear), e estas interações são mais intensas que na

conformação rômbrica (Tabelas 4.2 e 4.4). Este resultado é muito importante , já que a conformação axial é dominante a temperaturas fisiológicas.

Esta diferença pode ser entendida considerando que a His-E7 e Val-E11 estão dentro do bolso da heme e ajudam a estabilizar a conformação axial em MbNO e HbNO, enquanto na conformação A_0 quase linear de MbCO, experimentos e simulações por dinâmica molecular mostram que a His-E7 é relativamente móbil e provavelmente sai fora do bolso distal (Fig. 5.4.).^[16]

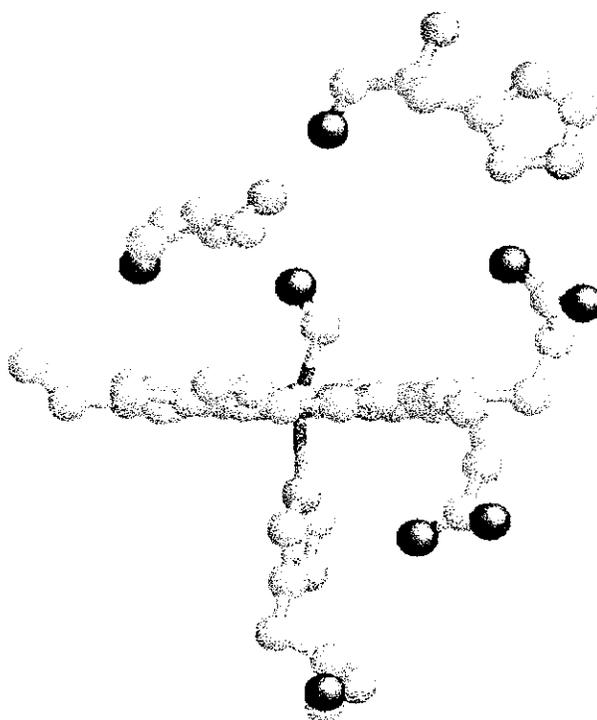


Figura 5.4.- Estrutura da conformação A_0 de MbCO a baixa temperatura, obtida por raios-X.

Por outro lado Braunstein et al. (1993),^[15] usando espectroscopia infravermelha estudaram a influência de diferentes mutantes da His-E7 e da Val-E11 na orientação do CO em MbCO de cachalote. Para a maioria deles, foi observada somente uma simples conformação o qual indicaria que a His-E7 tem um papel crucial na determinação do espectro de conformações do CO na estrutura nativa. Mas o fato de alguns mutantes apresentarem mais de uma simples conformação para CO indica que a aparição de múltiplos estados A não está exclusivamente conectada à presença da His-E7. Esta

hipótese está de acordo com Hüttermann et al. (1994),^[17] que usando as espectroscopias EPR e ENDOR observaram as conformações rômbrica e axial em nitrosil tetrafenil porfirina-imidazol (NO-TPP-Im) que não contêm a His-E7 nem a Val-E11, e o imidazol no lugar da His-F8.

Neste trabalho a aplicação da espectroscopia ENDOR, devido a alta resolução espectral, nos estudos de MbNO e HbNO em solução congelada levou a um conjunto de detalhada informação estrutural a respeito dos prótons no bolso da heme e o N_ε da His-F8. Devemos lembrar que a solução congelada está mais próxima das condições fisiológicas que os cristais. Equilíbrio conformacional entre as simetria rômbrica e axial é observada, e segundo Frauenfelder o equilíbrio conformacional é relevante para a função da proteína.^[18] Nossos resultados em MbNO complementam o trabalho de Kappl e Hüttermann sobre cristais de MbNO que estão na conformação puramente rômbrica,^[19] e em HbNO estabelecem um resultado novo. É bastante provável que na escala de resolução de ENDOR apareçam diferenças estruturais entre soluções congeladas e cristais.

A dependência com a temperatura dos espectros de EPR em banda Q de nitrosil hemoproteínas (MbNO e HbNO) mostraram que as simetrias rômbrica e axial estão presentes em baixas temperaturas.^[20] Figuras 5.1a e 5.4 apresentam as diferenças entre a estrutura axial de MbNO e MbCO, as interações hiperfinas dos prótons em MbNO estabilizam esta orientação. Neste trabalho os resultados de ENDOR de prótons mostram que a His-E7 e Val-E11 estão presentes no bolso da heme e ajudam a estabilizar a ligação do NO nas conformações rômbrica e axial de MbNO e HbNO, em contraposição à usual hipótese de que somente a His-E7 é importante no controle do ligante. Nossos resultados em prótons mostram que quando ambos amino ácidos estão presentes, eles interagem com o Fe-NO em cada uma das conformações. Porém é conhecido que as duas conformações podem existir também sem eles.^[17]

Todos estes experimentos mostram que o aparecimento das conformações rômbrica e axial em MbNO e HbNO não podem ser explicadas simplesmente pela presença da His-E7 e a Val-E11. Resultados teóricos sugerem que a orientação do ligante é também determinada pela histidina próxima.^[14] Nosso resultado em N_ε da His-F8 estão de acordo com esta hipótese, já que observamos orientações diferentes do

plano do imidazol, nas estruturas rômica (HbNO diferente de MbNO) e axial; este resultado foi obtido como consequência da superposição destas estruturas que reproduziram muito bem os espectros experimentais. Fazemos este comentário porque nos trabalhos do grupo de Hüttermann, se apresentam simulações pouco próximas aos espectros experimentais sobre tudo em campos altos.

5.4.- Conclusões

- * A combinação de dados estruturais obtidos por raios-X, EPR e ENDOR, junto com otimização por mecânica molecular nos permitiu obter estruturas coerentes para as duas conformações características de nitrosil hemoproteínas.
- * A dependência com a temperatura dos espectros de ENDOR de prótons de HbNO indicam uma mudança na conformação da proteína, e esta pode ser causada pela flexibilidade com a temperatura do complexo $N(\text{His-F8})\text{-Fe}^{2+}\text{-N}(\text{NO})$ e do esqueleto da proteína.
- * A alta resolução do ENDOR permitiu observar diferenças entre as duas simetrias (rômica e axial) de MbNO e HbNO, diferenças entre as cadeias α e β de HbNO, e diferenças entre prótons dum mesmo amino ácido presente no bolso da heme.
- * A His-E7 e Val-E11 ajudam a estabilizar as duas conformações em nitrosil hemoproteínas, que indica que ambos resíduos exercem o controle do ligante nestes sistemas. Sendo relevante na conformação axial, já que ela é a majoritária e mais importante a temperatura ambiente.
- * Os resultados em N_e da His-F8 indicam, que este amino ácido também está relacionado com as conformações do ligante.
- * As diferenças entre as conformações axiais de MbCO e MbNO, ratificam que nos sistemas nitrosil o sítio ativo apresenta bastante afinidade pelo NO. Deveria ser estudada com mais profundidade a conformação axial a temperatura ambiente e comparada com o sistema de maior importância fisiológica ($\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$).

* A dependência com a temperatura de espectros de ENDOR de prótons ainda é um tópico que fica em aberto. A evolução do sistema com a temperatura, a partir de 10 K poderia ser estudada por dinâmica molecular e para uma certa temperatura (por exemplo 45 K) usar os dados da dinâmica para ajustar os espectros de ENDOR.

5.3.- Referências

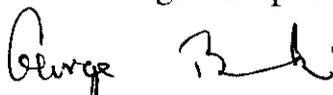
-
- [1] G. Feher, R. Isaacson, C. Scholes e R. Nagel. 1973. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **222**, 86.
- [2] C. Mulks, C. Scholes, L. Dickinson e A. Lapidot. 1979. *J. Am. Chem. Soc.* **101**, 1645. C. Scholes, A. Lapidot, R. Mascarenhas, T. Inubushi, R. Isaacson e G. Feher. 1982. *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 2724. M. Höhn, J. Hüttermann, J. Chien e L. Dickinson. 1983. *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 109. R. Kappl e J. Hüttermann. 1989. *Israel J. Chem.* **29**, 73. J. Hüttermann. "Biological Magnetic Resonance: EMR of Paramagnetic Molecules". *Plenum Press, New York and London*. 1993. J. Hüttermann, C. Burgard e R. Kappl. 1994. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **90**, 3077.
- [3] E. Brucker, J. Olson, M. Ikeda-Saito e G. Phillips Jr. submetido para publicação. N. Chan, P. Rogers e A. Arnone. *Biochemistry.* **37**, 16459.
- [4] P. Pascutti, K. Mundim, A. Ito e P. Bisch. 1999. *J. Comp. Chem.* **20**, 971.
- [5] H. Hori, M. Ikeda-Saito e T. Yonetani. 1981. *J. Biol. Chem.* **256**, 7849. R. Kappl e J. Hüttermann. 1989. *Israel J. Chem.* **29**, 73.
- [6] H. Hartmann, F. Parak, W. Steigemann, G. Petsko, D. Ringe-Ponzi e H. Frauenfelder. 1982. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **79**, 4967.
- [7] J. Olson, A. Mathews, R. Rohlfs, B. Springer, K. Egeberg, S. Sligar, J. Tame, J. Renaud e K. Nagai. 1988. *Nature.* **336**, 265. B. Springer, K. Egeberg, S. Sligar, R. Rohlfs, A. Mathews e J. Olson. 1989. *J. Biol. Chem.* **264**, 3057. A. Mathews, R. Rohlfs, J. Olson, J. Tame, J. Renaud e K. Nagai. 1989. *J. Biol. Chem.* **264**, 16573. R. Rohlfs, A. Mathews, T. Carver, J. Olson, B. Springer, K. Egeberg e S. Sligar. 1990. *J. Biol. Chem.* **265**, 3168.
- [8] M. Perutz. 1970. *Nature.* **228**, 726. M. Perutz. 1989. *Trends Biochem. Sci.* **14**, 42. S. Phillips. 1980. *J. Mol. Biol.* **142**, 531. B. Shaanan. 1983. *J. Mol. Biol.* **171**, 31.
- [9] S. Peng e J. Ibers. 1976. *J. Am. Chem. Soc.* **98**, 8032.
- [10] G. Jameson, F. Molinaro, J. Ibers, J. Collman, J. Branman, E. Rose, e K. Suslick. 1978.. *J. Am. Chem. Soc.* **100**, 6769.

-
- [11] S. Phillips e B. P. Schoenborn. 1981. *Nature*. **292**, 81. J. Hanson, e B. Schoenborn. 1981. *J. Mol. Biol.* **153**, 117.
- [12] T. Traylor, N. Koga e L. Deardruff. 1985. *J. Am. Chem. Soc.* **107**, 6504.
- [13] M. Hong, D. Braunstein, B. Cowen, H. Frauenfelder, I. Iben, J. Mourant, P. Ormos, R. Scholl, A. Schulte, P. Steinbach, A. Xie e R. Young. 1990. *Biophys. J.* **58**, 429.
- [14] M. Lim, T. Jackson e P. Anfinrud. 1995. *Science*. **269**, 962.
- [15] D. Braunstein, K. Chu, K. Egeberg, H. Frauenfelder, J. Mourant, G. Nienhaus, P. Ormos, S. Sligar, B. Springer e R. Young. 1993. *Biophys. J.* **65**, 2447. T. Li, M. Quillin, G. Phillips Jr. e J. Olson. 1994. *Biochemistry*. **33**, 1433.
- [16] F. Yang e G. Phillips Jr. submetido para publicação.
- [17] J. Hüttermann, C. Burgard e R. Kappl. 1994. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **90**, 3077.
- [18] H. Frauenfelder, S. Sligar e P. Wolynes. 1991. *Science*. **254**, 1598.
- [19] R. Kappl e J. Hüttermann. 1989. *Israel J. Chem.* **29**, 73.
- [20] M. Flores, E. Wajnberg e G. Bemski. 1997. *Biophys. J.* **73**, 3225.

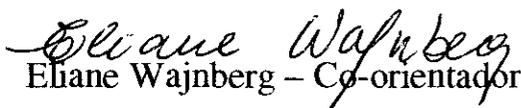
**“ENDOR DE PRÓTONS E NITROGÊNIO DE
NITROSIL HEMOPROTEÍNAS”**

Marco Antonio Flores Rivera

Tese de Doutorado apresentada no Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, fazendo parte da Banca Examinadora os seguintes professores:



George Bemski - Presidente



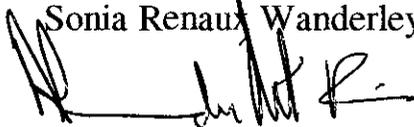
Eliane Wajnberg - Co-orientador



Pedro Geraldo Pascutti



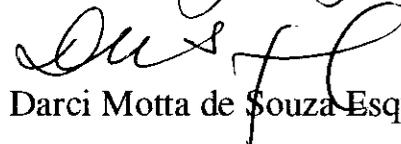
Sonia Renau Wanderley Louro



Alexandre Malta Rossi



Diana Josefina Rosa Guenzburger



Darci Motta de Souza Esquivel - Suplente

Rio de Janeiro, 06 de abril de 2000