

ISSN 0021 - 3865

CBPF-NF-083/83

APLICAÇÕES DE RADIAÇÃO SINCROTON EM BIOFÍSICA

por

George Bemski

Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas - CNPq/CBPF  
Rua Dr. Xavier Sigaud, 150  
22290 - Rio de Janeiro, RJ - Brasil

## RESUMO

Os aceleradores Síncrotron abrem, pela alta intensidade dos feixes dos raios-X que produzem, várias linhas de pesquisa em Biofísica, Bioquímica e outras áreas. A utilização principal dos raios-X de Síncrotron em Biologia reside em espectroscopias EXAFS (Extended X-ray Absorptions Fine Structure) e XANES (X-Ray Absorption Near Edge Spectra) aplicadas a macromoléculas que contem um átomo absorvedor, com  $Z = 19$  até  $Z = 42$ . Informações sobre os átomos vizinhos (número, identidade, distância) do absorvedor, o estado de oxidação, a simetria ao redor do absorvedor podem ser obtidas.

Entre as proteínas, as hemoglobinas constituem uma família na qual o uso de radiação Síncrotron dá informação sobre os detalhes da estrutura da heme, essencial no seu funcionamento fisiológico. Estas informações são obtidas rapidamente em soluções ou em cristais com resoluções de distâncias da ordem de  $0.02 \text{ \AA}$ .

Alem das espectroscopias, utiliza-se o intenso feixe de pulsos polarizados de raios-X para estudos do comportamento temporal de absorção em proteínas. Um exemplo é o estudo da anisotropia de fluorescência de triptófano em várias proteínas.

A clássica difração de raios-X pode também ser estudada em tempos muito mais curtos do que em outras fontes dos raios-X.

A rapidez dos experimentos com a fonte de raios-X do Síncrotron permite abordar problemas anteriormente deixados de lado por razões técnicas.

A alta intensidade do feixe dos raios-X obtidos pelos aceleradores Síncrotron abriu várias linhas de pesquisas com material biológico. Vamos discutir aqui algumas destas linhas, principalmente EXAFS (Extended X-ray Absorption Fine Structure) e XANES (X-ray Absorption Near Edge Spectra) aplicadas a alguns problemas de interesse biofísico.

## 1. GERAL<sup>(1)</sup>

Utilizando-se uma janela de Berílio, se obtêm num Síncrotron raios-X de alta intensidade, com  $\lambda$  entre 0.3 Å e 4 Å (energias de 40 keV a 2,5 keV). Estas energias permitem absorção pela camada K para elementos com  $Z > 19$  (K) até  $Z=42$  (Mo), e da camada L para  $Z > 45$  (Rh) até  $Z = 94$  (Pt). Um aumento de  $\lambda$  até 6 Å permitirá absorções pelo fósforo e enxofre, ambos de interesse biológico.

Os EXAFS cobrem uma região de energias de 50 eV até 800 eV acima da borda de absorção do elemento de interesse. XANES cobre até 50 eV acima desta borda. Fisicamente a diferença principal consiste do fato de EXAFS corresponder a transições aos estados eletrônicos livres, e XANES aos estados ligados.

Em termos gerais estas espectroscopias permitem:

- 1) identificação dos átomos até uma distância de aproximadamente 4,5 Å do átomo absorvedor, e com uma resolução aproximadamente de 0.02 Å.
- 2) Identificação do número dos vizinhos.
- 3) Refinamento nas coordenações dos átomos de elementos metálicos.
- 4) Determinação de estado de oxidação.

Os EXAFS e os XANES fornecem informação local, no sentido semelhante às ressonâncias paramagnéticas, em contraste com a difração de raios-X.

A alta intensidade de raios-X do Síncrotron permite obter informação em tempos muito curtos. As amostras podem ser líquidas, congeladas ou cristalinas.

Figuras 1 e 2 dão exemplos de espectros EXAFS esperados para diversos vizinhos do átomo metálico. Na Fig. 1 aparece um átomo absorvedor M com 4 nitrogênios na primeira esfera de coordenação e 4 enxofres na segunda. A soma dos espectros devido a cada grupo de átomos equivalentes resulta em um espectro total muito mais complicado, mas rico em informação. Na figura 2 análises semelhantes estão feitas no caso de Mo com S, O e Mo como vizinhos a uma distância de 2 Å. Observam-se as diferenças nos espectros dos EXAFS em função da identidade do vizinho.

Na prática observa-se primeiro EXAFS em estruturas simples e conhecidas antes de passar a moléculas mais complexas.

## 2 TRANSMISSÃO E FLUORESCÊNCIA

### 2.1 Transmissão

Chamemos  $\mu_T$  o coeficiente de absorção linear da amostra e  $\mu_A$  - coeficiente de absorção linear do elemento de interesse. A absorção dos ftons leva a uma relação do sinal (S) e ruído (R):  $S/R = 2 \sqrt{I_0} \frac{\mu_A}{\mu_T} e^{-1}$ , onde  $I_0$  é a intensidade inicial do feixe de raios X.

Como exemplo, podemos considerar o síncrotron SPEAR, em Stanford, que funciona com  $I_0 \sim 3 \times 10^{10}$  ftons/seg. em área de  $20 \text{mm}^2$ . Com uso dos espelhos se pode chegar a  $10^{12} \frac{\text{fotons}}{\text{seg-ev}}$

$\left(\frac{S}{R}\right)$  é máximo para  $\frac{\mu_A}{\mu_T} \sim 1,3 \times 10^{-5}$ . Como  $\mu_A = N_A \delta_A$ , onde  $N_A$  é a concentração do elemento absorvedor, e  $\delta_A$  é a sua secção de choque para os raios X, calculamos que para obter uma precisão no  $\frac{\delta\mu_A}{\mu_A}$  de 1% precisa-se p.e. no caso de Fe ( $\delta_{A_{Fe}} = 3,85 \times 10^{-20} \text{ cm}^2$ ) de  $N_{A_{Fe}} \sim 10^{18}/\text{cm}^3$ . O limite prático é de 10mM de Fe em uma proteína de Fe típica como a hemoglobina.

## 2.2 Fluorescência

Relaxação das camadas internas por transição radiativa produz fluorescência que aumenta com Z do elemento absorvente. A detecção de fluorescência procede com  $S/R \sim \sqrt{\mu_A}$  e é (no caso do Fe) duas ordens de grandeza maior que em absorção.

## 3 APLICAÇÕES

### 3.1 Hemoglobina

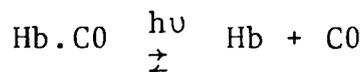
Um dos problemas importantes nos estudos das proteínas é o alosterismo. No caso da hemoglobina sabemos que existem duas conformações estudadas pela difração de raios-X, que correspondem à hemoglobina completamente oxigenada (conformação R) e desoxigenada (conformação T). A importância destes dois estados T e R reside nas diferentes afinidades dos Fe's para oxigênio nos dois casos, e é fundamental para a distribuição do oxigênio no organismo pela hemoglobina.

Num modelo esteroquímico o deslocamento de Fe durante a oxigenação é responsável pela mudança conformacional da proteína inteira. Para obter a distância exata entre Fe e os nitrogênios do plano da heme (Fig. 3) foram obtidos EXAFS de amostras líquidas de soluções de hemoglobina em forma oxigenada e desoxigenada<sup>(2)</sup> nas seguintes condições experimentais: concentração da hemoglobina: 25 mM; volume da amostra: 0.15cm<sup>3</sup>; concentração total de Fe: 2.10<sup>18</sup> átomos; fluxo total de raios-X:

$10^{13}$  ftons; duração da experiência: 20 minutos. Os resultados demonstram que a distância entre Fe e os nitrogênios é de  $2.05 \pm 0.01 \text{ \AA}$  em desoxihemoglobina e de  $1.98 \pm 0.01 \text{ \AA}$  em oxihemoglobina, indicando que o movimento do Fe com respeito ao plano da heme é menor que  $0.1 \text{ \AA}$ . Estas experiências, complementadas por outras medidas, levam a crer que a mudança principal durante a oxigenação é no ângulo  $\alpha$  da histidina com respeito ao plano da heme, melhor que na posição do ferro (Fig. 3). Os EXAFS eram fundamentais nesta investigação, já que a difração de raios-X dificilmente pode ser observada em cristais de oxi-hemoglobina por causa da instabilidade destes cristais durante o prolongado tempo da experiência de difração. (Fig. 4)

#### 4 FOTOLISE DE HEMOGLOBINA

Nos últimos anos estudos da foto-dissociação de hemoglobina eram, entre os mais importantes, feitos com esta proteína, já que dão informações sobre os caminhos que tomam os ligantes (p.e.  $O_2$ , CO) de Fe entre o solvente e sítio de ligação. Num<sup>(3)</sup> estudo observa-se simultaneamente por EXAFS e absorção ótica a fotodissociação e reassociação da hemoglobina com CO como ligante. CO ocupa a mesma posição de  $O_2$  na coordenação do Fe em Hb:



As condições experimentais: amostra 4 mM, feixe de  $100 \text{ mA}$ , S/R  $\sim 3$ ,  $10^5$  contas/ponto, fotolise em  $4^\circ\text{K}$ , lâmpada de tungstênio de 50W.

Uma vez produzida a dissociação de CO toma-se espectros de absorção óticos e de EXAFS em função de tempo e de temperatura (Fig. 4). A variação observada utilizando estas duas técnicas não é idêntica. Chega-se a conclusão que o CO dissociado da heme e situado nas posições muito próximas ao Fe ( $0.05 \text{ \AA}$ ) não altera os EXAFS mas produz uma variação nos espectros de absorção ótica. Este tipo de estudo permite obter informações sobre os poços de potencial que o ligante dissociado encontra dentro da proteína, antes de recombinar-se com o Fe.

## 5 ANISOTROPIAS ESTÁTICAS

Estudos com monocristais e com raios-X polarizados permitem a detecção de anisotropias nas ligações entre o elemento absorvedor e algum ligante.

Os fotoeletrons originais de raios-X polarizados estão emitidos em direções preferidas, sendo a distribuição angular descrita pela distribuição de Legendre. A amplitude de EXAFS é proporcional a  $\cos^2 \alpha$ , onde  $\alpha$  é o ângulo entre a direção de polarização dos raios-X e o vetor entre o átomo absorvente e o átomo espalhador.

Como um exemplo tomemos o caso de plastocianina<sup>(4)</sup> uma proteína de cobre. Várias moléculas de plastocianina compõem a célula unitária. Um dos ligantes de Cu é metionina que contém enxofre como um de seus componentes.

Medidas de EXAFS com R.X. polarizados e monocristal de plastocianina indicam que todas as moléculas de plastocianina em célula unitária tem as ligações Cu-S paralelas a menos de 5°-

## 6 OUTRAS APLICAÇÕES DA RADIAÇÃO SINCROTRON

### 6.1 Anisotropia de Rotação dos Resíduos em Proteínas

$$(\tau \leq 10^{-9} \text{ seg})$$

A observação de anisotropia de fluorescência é uma técnica bastante utilizada na Biologia há muito tempo. A novidade no experimento a ser descrita consiste no uso da fonte de UV pulsada de sincrotron SPEAR<sup>(5)</sup> O experimento consistia em observação da anisotropia da emissão de resíduos de triptófano excitados pelo pulso de 1,28 MHz, em 300 nm. Utiliza-se um monocromador e um polarizador obtendo-se um feixe de 0,2 mm de diâmetro sobre a amostra de proteína em solução. A emissão es

tá observada a 90° da direção de luz incidente, sendo detectada por um fotomultiplicador.

A largura do pulso da luz excitante é de  $0,65 \cdot 10^{-9}$  seg. Cada 20 seg. o polarizador troca de orientação  $x \rightleftharpoons y$ . Cada pulso contem  $10^4$  ftons. Acumula-se  $5 \cdot 10^4$  contas.

A coleção de resultados leva 10-40 minutos. Os pulsos produzem um ensemble de moléculas excitadas e alinhadas (pulsos são polarizados na direção Y). A anisotropia está definida como:

$$A(t) = \left| \frac{y(t) - x(t)}{y(t) + 2x(t)} \right| = A_0 e^{-\frac{t}{\phi}}$$

onde  $y(t)$  e  $x(t)$  são as amplitudes medidas com o polarizador nestas duas direções, e  $\phi = \frac{V\eta^*}{kT}$  é o tempo de correlação rotacional. ( $\eta$  - viscosidade,  $V$   $\frac{kT}{}$  volume,  $K$  - constante de Boltzmann)

A intensidade  $F(t) = y(t) + 2x(t) = F_0 e^{-\frac{t}{\tau}}$  onde  $\tau$  - tempo de vida do estado excitado.

Os resultados indicam que os triptófanos em certas proteínas (p.e. mielina) têm um tempo  $\phi$  da ordem de 1 nseg, enquanto  $\phi$  da nucleasa é de 9,85 nseg. Os  $\tau$ 's medidos são da ordem de 6 nseg nos dois casos. Existe interesse em conhecer estes tempos para associar melhor a estrutura e a função das proteínas. A vantagem do Síncrotron consiste em produzir alta intensidade de UV e pulsos de largura menor de  $10^{-9}$  nseg.

## 7 CRISTALOGRAFIA

Foram obtidas medidas de difração de raios-X em várias proteínas. Contadores proporcionais medem simultaneamente as difrações em muitos  $\lambda$ 's. Uma resolução de 1 Å foi obtida em

---

\* para moléculas esféricas

$\beta$  - lactamasa e de 2 Å em outros casos de maior peso molecular. O tempo utilizado é entre 50 e 100 vezes menor que com técnicas convencionais (6)

## 8 XANES

Em caso de XANES observam-se as transições entre estados eletrônicos ligados, tais como  $1s \rightarrow 3d$ ,  $1s \rightarrow 4s$ ,  $1s \rightarrow 4p$  (7)

As energias e amplitudes destas transições que ocorrem na faixa de energias até 50 eV acima da borda de absorção, contém informações sobre o estado eletrônico do íon metálico, sobre o tipo de ligação (iônica, covalente) existente entre o íon e os vizinhos e sobre a simetria existente no conjunto íon e vizinhos. A dificuldade nos cálculos teóricos exatos faz com que sejam preferíveis experimentos iniciais com moléculas pequenas cujos resultados são utilizados em exames de macromoléculas de interesse biológico.

Um exemplo é o estudo de hemocianina<sup>(8)</sup> proteína de cobre utilizada em transporte de oxigênio em moluscos. Nota-se (Fig. 5) uma diferença de 3 eV entre os espectros de oxi e desoxihemocianina, indicando que o cobre é 2+ em oxihemocianina e 1+ em desoxi. A existência de transição atribuída a  $1s \rightarrow 3d$  em oxi e a sua ausência em desoxihemocianina confirma esta conclusão, já que  $Cu^{1+}$  tem a camada 3d plenamente ocupada.

Em estudo de XANES em metaloproteínas com substituição de Co<sup>(9)</sup> nota-se uma diferença de 8 eV entre as transições  $1s \rightarrow 3d$  e  $1s \rightarrow 4p$ . Esta diferença diminui quando o grau de covalência aumenta, independentemente da geometria. A transição  $1s \rightarrow 3d$  é presente só em estruturas pentacoordenadas e distorcidas tetraedras, sendo ausente em complexos de simetria octaedra.

Em hemoglobina observa-se uma diferença de 4 eV entre a borda de absorção de todas as hemoglobinas com ligantes ( $O_2$ , CO, NO, etc.) e a única hemoglobina penta-coordenada (desoxi).

## 9 CONCLUSÃO

Durante ainda a curta existência das fontes intensas dos raios-X dos Sincrotrons, foi já demonstrado que a potencialidade de destes feixes intensos para o seu uso em Biofísica, Bioquímica e Biologia é muito grande. Além dos exemplos utilizados neste trabalho pode-se, p.e., mencionar trabalhos já existentes em microscopia de raios-X.

A escala do tempo utilizada em experiências é cada vez menor com conseqüente possibilidade de novas aplicações como a angiografia. Estamos persuadidos que os próximos dez anos vão trazer muito progresso neste campo.

## TABELA DAS ILUSTRAÇÕES

- Fig. 1 - Um exemplo hipotético. O metal M tem vizinhos ní— trogênios e enxofre. O espectro resultante é a soma das contribuições individuais. Synchrotron Radiation Research, S. Doniach, P. Eisenberger, K. Hodgson; Plenum Press, p. 435
- Fig. 2 - Cálculo das fases e amplitudes espalhadas pelos áto mos de oxigênio, enxofre e molibdeno todos a  $2 \text{ \AA}$  do átomo de Mo espalhador. Synch. Rad. Res. p. 433.
- Fig. 3 - A geometria da heme em hemoglobina. As distâncias entre Fe e  $N_1$  e  $N_3$  variam menos que  $0.1 \text{ \AA}$  entre oxi e desoxihemoglobina.  $\alpha$  varia por várias grades. "Hemo globin", R. Dickerson, I. Geist, Ed. Benjamin 1983 p. 50.
- Fig. 4 - Variação em função da temperatura nos espectros de EXAFS e na absorção ótica depois da dissociação de hemoglobina com CO (ref. 3)
- Fig. 5 - XANES em várias formas de hemocianina 1) oxigenada, 2) desoxigenada, 3) com CO. Synch. Rad. Res. p. 454.

REFERÊNCIAS

1. Synchrotron radiation research - H- Winick; S. Doniach - Plenum Press.
2. P. Eisenberger, R.G. Shulman, B.M. Kincaid, G.S. Brown, S.S. Ogawa; Nature 274, 30-34 (1978)
3. B. Chance, T. Yonetani, M. Perutz, H. Frauenfelder, L. Powers; Stanford Synchrotron Radiation Laboratory Activity Report (4/1/81 - 3/31/82, Maio 1982) VIII-135.
4. J.E. Hahn, R.A. Scott, H.C. Freeman, S. Doniach, K.O. Hodgson; Intern. Conf. on EXAFS and Near Edge Structure, Sept. 13-17, 1982, Frascati, p. 77.
5. I. Munro, I. Pecht, L. Stryer "Subnanosecond motion of tryptophan residues in proteins" - Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 56-60 (1979)
6. K.S. Wilson, E. Stina et al. "Macromolecular crystallography with synchrotron Radiation. II. Results", J. Appl. Crystallogr. 16, 28-41 (1983)
7. R.G. Shulman, Y. Yafet, P. Eisenberger, W.E. Blumberg; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 1384 (1976).
8. T.K. Eccles, Tese de Ph.D Univ. Stanford, 1977
9. A. Desidir e G. Rotilio, Intern. Conf. on EXAFS and Near Edge Structure Sept. 13-17, 1982, Frascati

-11-

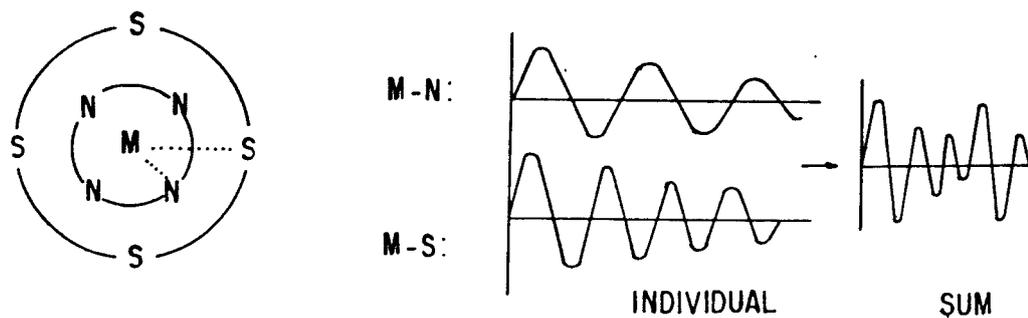


Figura 1

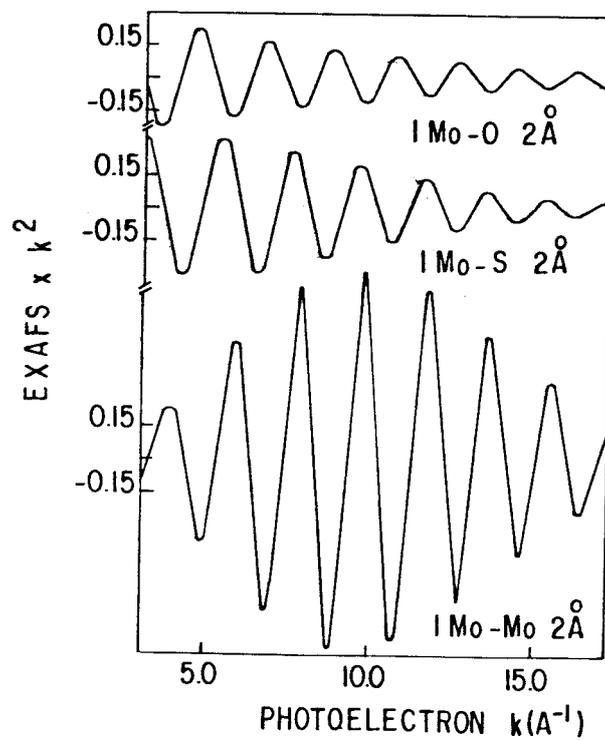


Figura 2

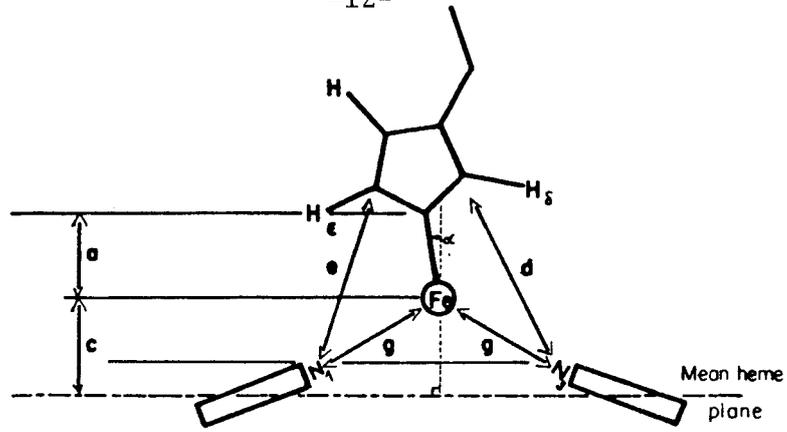


Figura 3

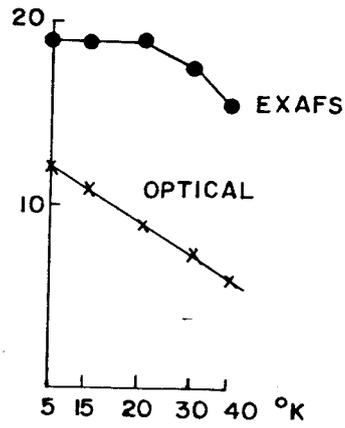


Figura 4

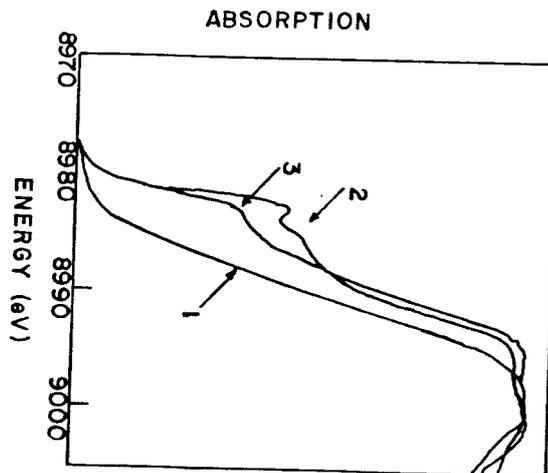


Figura 5