

Estudo por SAXS na estabilidade oligomérica da hemoglobina extracelular gigante de *Glossoscolex paulistus*: efeito da Uréia.

Patrícia S Santiago^{1*}(PQ), Francisco Adriano O. Carvalho² (PG), José Wilson P. Carvalho²(PG), Marcel Tabak²(PQ)

¹Campus Experimental de Registro – Universidade estadual paulista “Júlio de Mesquita Filho”/ UNESP; ² Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo; * iqsantiago@gmail.com

Palavras Chave: Hemoglobina extracelular, estabilidade oligomérica, SAXS, agente desnaturante, dissociação, desnaturação

Introdução

A hemoglobina extracelular estudada neste trabalho é extraída do anelídeo *Glossoscolex paulistus* (HbGp) apresentando uma massa molecular de 3.6 MDa [1]. Sendo constituída por subunidades que contém o grupo heme, monômeros (*d*) e trimeros (*abc*), e estruturas polipeptídicas sem o grupo heme, Linkers (*L*) [1,2]. Devido a sua alta massa molecular, tamanho, natureza extracelular e grande resistência à oxidação este tipo de proteína tem sido utilizada como protótipo de sangue artificial [3]. A HbGp tem sido previamente estudada por Espalhamento de Raio X de Baixo Ângulo (SAXS) na ausência e na presença de surfactantes [4], e com variação de pH e temperatura [5]. Nestes estudos observamos o efeito de surfactantes de carga oposta a proteína na dissociação oligomérica e auto-oxidação, além de que o aumento do pH e da temperatura leva a dissociação da proteína em subunidades menores. No presente trabalho, a dissociação e desnaturação da HbGp na forma oxi-, no pH 7.0 e 25°C, foi monitorado em função da concentração de uréia.

Resultados e Discussão

As curvas de SAXS são caracterizadas por dois ombros bem definidos na região de q de 0,04 Å⁻¹ e 0,07 Å⁻¹, e um terceiro, não muito pronunciado, na região de q de 0,12 Å⁻¹. A curva de SAXS da proteína nativa não se modifica na faixa de concentração de 0 a 3 mol/L de uréia, sugerindo uma significativa estabilidade oligomérica da oxi-HbGp, em 3 mg/mL pH 7 (Fig. 1A). O raio de giro (R_g) de 107 Å e D_{max} (dimensão máxima) de 300 Å foi obtido através das análises das curvas de SAXS pelo Gnom. Por outro lado, na faixa de concentração de 3 a 5 mol/L de uréia, a estabilidade da proteína diminui, praticamente desaparecem os ombros característicos da curva de SAXS da HbGp no estado nativo, ocorrendo a redução do R_g e do $I(0)$, devido a dissociação do oligômero (Fig. 1B). Acima de 5 mol/L de uréia observamos a desnaturação da proteína, e através das análises das $p(r)$ observamos o aumento da contribuição das subunidades menores (Fig. 1D).

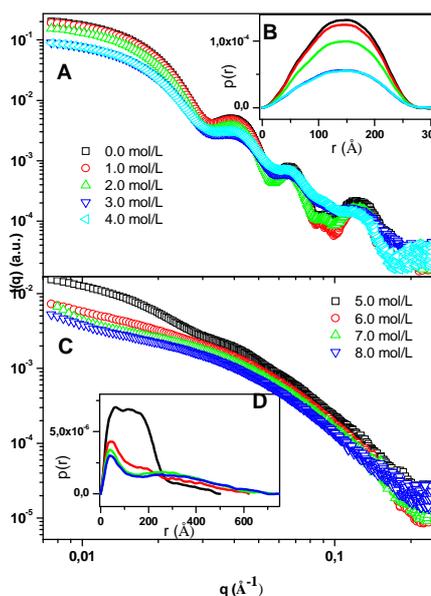


Figura 1. Curvas de SAXS obtidas da oxi-HbGp 3 mg/mL, tampão acetato-fosfato 20 m mol/L pH 7 e 25°C em função da concentração de uréia. Os inserts correspondem as funções $p(r)$ obtidas pelo Gnom.

Conclusões

Estes resultados encontram-se em fase final de análise, e mostram claramente que a adição de uréia inicialmente leva a dissociação de proteína em fragmentos menores, para depois ocorrer a desnaturação da proteína.

Agradecimentos

FAPESP, CNPq e LNL/Campinas (experimentos de SAXS)

¹Carvalho, F. A. O.; Santiago, P. S.; Borges, J.C.; Tabak, M. *Anal. Biochem.* **2009**, 385,257.

² Vinogradov, S.N. *Micron.* **2004**, 35, 127.

³ Rousselot, M.; Le Guen, D.; Chabasse, C.; Zal, F. *FEBS J.* **2006**, 273, 1582.

⁴ Gelamo, E.L.; Itri, R.; Tabak, M. *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 33298.

⁵Carvalho, J.W.P.; Santiago, P.S.; Batista, T.; Salmon, C.E.G.; Barbosa, L.R.S.; Itri, R.; Tabak, M. *Biophys. Chem.* Submetido **2011**.