Universidade de São Paulo
Instituto de Física de São Carlos

Propriedades Físico-Químicas da lectina KM+ monitoradas por Dicroísmo Circular (CD) e Fluorescência. Estimativa do conteúdo de estrutura secundária por CD.

Rosemeire Ap. da Silva de Lucca

USP / IFQSC / SBI
[redacted]
0-2-001050

Dissertação apresentada ao Instituto de Física de São Carlos, para obtenção do título de Mestre em Física Aplicada.

Orientadora: Profa. Dra. Leila Maria Beltramini

Departamento de Física e Informática

São Carlos - 1994

106

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Instituto de Física e Química de São Carlos

Fone (0162) 72-6222
Fax (0162) 72-2218

Av. Dr. Carlos Botelho, 1465
Caixa Postal 369
CEP 13560.970 - São Carlos - SP
Brasil

MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE ROSEMEIRE APARECIDA DA SILVA DE LUCCA APRESENTADA AO INSTITUTO DE FÍSICA E QUÍMICA DE SÃO CARLOS, DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, EM 01/07/1994

COMISSÃO JULGADORA:

Profa.Dra.Leila Maria Beltrami

Profa.Dra.Adelaide Falconi Aléric

Prof.Dr.Hidetake Imasato

À minha mãe pelo carinho,
dedicação e incentivo.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos que de alguma forma contribuiram para a realização deste trabalho, em particular:

À profa. Dra. Leila M. Beltramini pela orientação, confiança e amizade.

Ao prof. Dr. Otaciro R. Nascimento pelas valiosas sugestões, contribuições e pela amizade.

Ao prof. Dr. Marcel Tabak pelas valiosas discussões, sugestões, amizade e por colocar seu laborátorio à disposição.

Ao prof. Dr. Hidetake Imasato pelas contribuições e amizade.

À profa. Dra. Rosemary Sanches pelas sugestões e amizade.

À profa. Dra. Cristina Lara pelo apoio, sugestões e amizade.

À profa. Paula pelas sugestões e amizade.

Ao Paulo pelas sugestões, discussões e amizade.

À Patrícia pelo companheirismo e amizade.

À Bianca pela força, companheirismo e amizade.

Ao Alexandre Marletta pelo valioso auxílio na utilização dos programas e pela amizade.

Aos amigos do Grupo de Biofísica: Rosangela, Joselaine, Marli, Viviane, Jabah, Cláudia, Liana e César pela agradável convivência.

À Bel, Beto, Sueli, Wanda, Bene e Italo pela amizade e auxílio na realização deste trabalho

Aos amigos profs. Osvaldo Takai e Paulo F. Sprovieri pelo valioso auxílio, dedicação e paciência na finalização deste trabalho.

Aos colegas do Grupo de Cristalografia: Valma, Geraldo, Ednilson, João Alexandre, Jorge, Teresa, Célia e Rodrigo pela convivência.

Ao João pelo apoio, carinho e valioso auxílio e dedicação na finalização deste trabalho.

Aos meus pais, Divaldo e Valdecy, pelo carinho e incentivo.

Aos meus irmãos Fernando e André, em particular à minha irmã Geórgia, pela força e pelo carinho.

À toda minha família, em particular aos meus tios Nestor, Antonio, Zenilde, Carlos e Alcina pelo carinho e apoio sempre dados.

Aos amigos de sempre: Johnny, Rita, Célia, Formiga, Silvana, Elenice, Luis Carlos, Sueli, Raquel, Roseli, Dinis e Rosangela por todos estes anos de amizade.

Ao Centro Interdepartamental de Química de proteínas (CIPQ) da faculdade de Medicina de Ribeirão Preto pela determinação da composição de aminoácidos de nossas amostras.

À profa. Dra. Maria C. Roque Barreira do depto. de Microbiologia, Parasitologia e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto por colocar seu laboratório à disposição.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Resumo

Uma nova lectina extraída da semente de *Artocarpus integrifolia*, denominada KM+ foi recentemente descrita. KM+ é haptotática para neutrófilos, promove a aglutinação de hemácias dos grupos **A**, **B**, **O**, estimula a proliferação de linfócitos do baço de camundongos e liga-se em α D-manose, α metil manosídio e α D-glicose. Esta lectina é composta por quatro monômeros, com peso molecular de 13.150 daltons cada, unidos por interações não covalentes. KM+ contém 1,8% de carboidratos e apresentou quatro isoformas com pontos isoelétricos entre 4,2 e 5,2.

Este trabalho teve como objetivos estudar modificações estruturais de KM+ em função de parâmetros como temperatura, força iônica, pH, agentes desnaturantes, ligação com D-manose, monitoradas por dicroísmo circular (CD) e fluorescência. CD também foi utilizado para estimar o conteúdo de estrutura secundária de KM+, utilizando se dois programas descritos na literatura: SSE (Secondary Structure Estimation), que utiliza o método dos mínimos quadrados para a estimativa da estrutura secundária e obtenção dos espectros básicos, baseados nos dados cristalográficos de proteínas de estrutura resolvida; CCA (Convex Constraint Analisys) que utiliza o algoritmo simplex e a partir dos espectros de CD das proteínas de referência calcula os espectros das componentes básicas. Para a estimativa das frações de estrutura secundária o segundo método utiliza o programa Lincomb.

Os espectros de CD foram registrados no intervalo de 185 a 260 nm. O conteúdo em estrutura secundária, estimado pelo programa SSE foi: 0% de α-hélice, 41% de folha β, 27% de volta β e 32,3 de estrutura desordenada; pelo programa CCA foi: 1% de α-hélice, 35% de folha β anti-paralela, 21% de volta β e/ou folha β paralela, 15% de contribuições de aromáticos e/ou ligações dissulfeto, 28% de estrutura desordenada. Os desvios médios quadráticos para os programas SSE e CCA foram 12% e 1%, respectivamente. Portanto a lectina KM+ é principalmente constituída por estruturas tipo folha β e tipo desordenada.

A curva calculada pelo programa CCA foi melhor estimada, pois tem o desvio médio quadrático 12 vezes menor que o do programa SSE. Este resultado, provavelmente ocorre devido aos seguintes fatores: (i) no programa CCA, o espectro da proteína a ser analisada é alinhado com os espectros das proteínas de referência, influenciando no cálculo dos espectros básicos; (ii) maior número de proteínas com estrutura β no grupo de referência do programa CCA.

A estabilidade de KM+ em função da temperatura tem comportamento diferente em tampão sódio fosfato (PBS) daquele observado em água. Em PBS, quando a amostra está a 70°C, a forma do espectro de CD mostrou-se consistente com um espectro de proteína desnaturada. Comumente, um espectro de proteína desnaturada caracteriza-se pela perda da estrutura secundária predominante e aumento da estrutura desordenada. Em água, também a 70°C, na região da estrutura β (216 nm) surge uma nova banda e na região da estrutura desordenada (195 nm) aparece uma banda com valores positivos mimetizando um espectro da estrutura α-hélice. Esta diferença de comportamento pode ser devida à força iônica

A desorganização promovida na molécula de KM+ por cloreto de guanidina foi típica de desnaturação.

O máximo da emissão de fluorescência, da KM+ em PBS pH 7,2, foi a 328 nm, característico de resíduos de triptofano protegidos do solvente. Este máximo mudou para 340 nm em pH 10,5. Este resultado indica mudanças no ambiente químico do triptofano neste pH. O deslocamento para a região do vermelho indica, que em pH 10,5, os resíduos de triptofano estão em maior contato com o solvente.

O número de sítios ligantes de D-manose na molécula de KM+, foi estimado pela supressão da fluorescência promovida pelo D-manose. Esta estimativa foi baseada na suposição de que todos os sítios ligantes de D-manose estivessem próximos aos resíduos de triptofano. A relação encontrada foi de 2 moles de D-manose/mol de KM+.

Abstract

Recently a new lectin, KM+, isolated from *Artocarpus integrifolia* seeds was described. KM+ induces neutrophil migration, agglutination of human red blood cells, proliferation of mouse spleen cells and binding with monosacharides D-mannose, D-glicose and α-metil mannoside. This glycoprotein is composed of four monomers, assembled by non covalent bonds, has 500 aminoacids residues/mol, with a Molecular Weight of 52,000 Daltons and 1.8% of carbohydrates [27]. In this work structural changes of KM+ was studiedas a function of temperature, pH, chemical denaturing agents as well as the binding with D-mannose. These changes were monitored by circular dichroism (CD) and fluorimetry.

Circular Dichroism (CD) spectroscopy was used for the analysis of the secondary structure of KM+ in solution due do its capacity to indicate the presence and to estimate the proportion of α-helix, ß-sheet, ß-turn and unordered conformations. This measurent can be regarded as a function of the relative orientation of the chromophores responsible for their chiroptical activity. CD spectroscopy is also one of the methods of choice for monitorization of conformational changes in proteins as a function of solvents, pH, temperature, ionic strength and specific or non specific binding. Two programs which are in use for estimation of secondary structure: SSE, using the linear least squares method and CCA, using the simplex method., were evaluated in the present work. SSE uses a set of proteins with known X-ray data as the basis for evaluation while CCA uses only pure proteins experimental CD spectra.

Fluorescence spectroscopy is very useful to monitore of protein conformational changes in solution due to the presence of intrinsic fluorophores.

Fluorescence Measurements were performed at 25°C. Samples were excited at 280 nm and the emission was monitored in the range 290-450 nm. The maximum emission as a function of pH was at pH 7.0. The wavelength for maximum emission changed from 328 nm at pH 7.0 to 340 nm at pH 10.5.

CD spectra were recorded over the range of 185 up to 260 nm. The Secondary structure content estimated by SSE program was: 0% α-helix, 41% ß-sheet, 26% ß-turn and 32% random with RMS of 12% and CCA program was: 1% α-helix, 35% antiparallel ß-sheet, 21% ß-turn and/or parallel ß-sheet, 28% random, 15% aromatics contributions and dissulfide linkages with RMS of 1%.

The fractions of secondary structure obtained when using CCA program were more consistent than those of SSE program. The simulation by CCA program was better probably due to its desconvolution of the spectral contribution of the common secondary structures using experimental CD curves of proteins.

The stability of KM+, in PBS, as a function of temperature changes above 55°C but only at 70°C the shape of the CD spectrum is consistent with the loss of the native ordered secondary structure that should accompany protein unfolding.

CD spectra of KM+ in water showed conformational changes as a function of

temperature was not consistent with denaturated proteins.

The unfolding of KM+ by GdnCl and SDS resulted in CD spectroscopic changes: consistent with the increased random structure and disappearence of beta sheet.Using the two denaturing agents together GdnCl and temperature, the denaturation was odserved at lower decreased both GdnCl concentration and at lower temperature.

The estimation of the number of binding sites for D-mannose was obtaided through the fluorescence intensity decrease due to a quenching effect of D-mannose and showed that the stoichiometry of binding was 2 moles of D-mannose/mol of lectin.

Índice

Capítulo 1 - Lectinas 1
1.1 - Introdução 1
1.2 - Lectinas como ferramentas em diagnóstico laboratorial e elucidação de mecanismos fisiopatológicos 2
1.3 - Localização e funções das lectinas nos vegetais 4
1.4 - Lectinas das sementes de Artocarpus integrifolia (jaca) 5
1.4.1 - Propriedades Gerais da KM+ 5
1.5 - Objetivos do trabalho 6
Capítulo 2 - Dicroísmo Circular (CD) 9
2.1 - Introdução 9
2.2 - Atividade Óptica 10
2.2.1 - Origens Físicas 12
2.3 - Determinação do conteúdo de estrutura secundária 22
2.3.1 - Espectro de referência baseado no modelo de homopolipeptídeos 24
2.3.2 - Espectros de referência baseados em proteínas 25
2.3.3 - Combinação linear do espectro CD de proteínas de estrutura conhecida 26
2.3.4 - Combinação linear do espectro de CD de proteínas 28
2.4 - Comparação entre os métodos da análise do CD 30
2.5 - Outras aplicações para o CD 31
Capítulo 3 - Fluorescência 33
3.1 - Introdução 33
3.2 - Fluorescência estática 34
3.3 - Medidas de fluorescência 36
3.3.1 - Espectro de emissão e excitação da fluorescência 36
3.3.2 - Rendimento quântico da fluorescência 37
3.3.3 - Tempo de vida da fluorescência 38
3.4 - Sensibilidade da fluorescência ao meio ambiente 39
3.5 - Supressão da fluorescência 40
3.5.1 - Supressão colisional 41
3.5.2 - Supressão estática 42
3.5.3 - Comparação entre supressão dinâmica e estática 43
3.5.4 - Transferência de energia 44
3.6 - Fluorescência de proteínas 45
3.6.1 - Propriedades espectrais dos aminoácidos aromáticos 46
3.6.2 - Fatores que influenciam o espectro de emissão de proteínas 49
3.6.2.1 - Estrutura tridimensional 49
3.6.2.2 - Associação de proteínas com substratos e outras macromoléculas 51

IFSC — SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO

Capítulo 4 - Material e métodos....52
4.1 - Material....52
4.1.1 - Reagentes, drogas e materiais utilizados....52
4.1.2 - Equipamentos....52
4.1.3. - Soluções tampões....53
4.2 - Métodos....54
4.2.1 - Purificação da lectina....54
4.2.1.1 - Obtenção do extrato bruto....54
4.2.1.2. - Procedimentos cromatográficos....54
4.2.2 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS - Page)....55
4.2.3. - Determinação da composição em aminoácidos da KM+....56
4.2.4. - Medidas fluorimétricas....56
4.2.5. - Medidas de dicroísmo circular....57
Capítulo 5. - Resultados e Discussões....59
5.1. - Purificação da lectina KM+....59
5.2. - Estrutura secundária de KM+ estimada por CD....60
5.3. - Alterações conformacionais induzidas por agentes químicos e físicos monitoradas por CD e Fluorescência....66
5.3.1 - A estabilidade conformacional da KM+ com a temperatura....66
5.3.2. - Modificações conformacionais induzidas por agentes químicos....72
5.3.2.1. - Estabilidade conformacional da KM+ em função do pH....72
5.3.2.2 - Unfolding da KM+ por agentes desnaturantes....75
5.3.2.3.- Supressão da emissão de fluorescência por acrilamida e iodeto de potássio....81
5.4. - Afinidade de KM+ por D-manose....82
Conclusões e Perspectivas....87
Perspectivas....89

Capítulo 1 - Lectinas

1.1 - Introdução

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imune, que aglutinam células e precipitam compostos glicoconjugados ligando-se rápida, seletiva e reversivelmente a carboidratos e à substâncias que contêm açúcar, sem alterar a estrutura covalente das ligações glicosídicas [10]. Esta definição indica que as lectinas têm ao menos dois sítios específicos para a ligação de açúcar. A especificidade do açúcar ligante é determinada pelos monossacarídeos ou oligossacarídeos que inibem as reações de aglutinação e precipitação induzida pela lectina. Bem distribuídas pela natureza, as lectinas são encontradas em quase todos organismos vivos desde plantas até animais, vertebrados e inverterbrados e ainda em vírus e microrganismos.

Os estudos sobre lectinas começaram com o trabalho de Hermann Stilmark em 1888 [32], o qual pela primeira vez observou que o extrato bruto de *Ricinus comunis* poderia aglutinar células vermelhas do sangue. Os estudos sobre propriedades biológicas e estrutura das lectinas de origem vegetal avolumaram-se desde então e tornaram-se ferramentas importantes na compreensão dos mecanismos moleculares relacionados com adesão celular e/ou interação com carboidratos ou glicoproteínas.

A utilização da cromatografia de afinidade para a separação de lectinas, usada pela primeira vez por Agrawal & Goldestein em 1965 [1], contribuiu significativamente para o desenvolvimento destes estudos, pois conhecendo-se a especificidade da lectina é possível encontrar-se uma matriz cromatográfica com afinidade apropriada para sua purificação. A obtenção de material purificado em larga escala é fator fundamental para

estudos de suas características gerais, propriedades moleculares e interações com diversos sistemas biológicos.

As lectinas de plantas são geralmente ricas em aminoácidos hidrofóbicos e ácidos, e são pobres em aminoácidos contendo enxôfre. Algumas exceções são encontradas nas lectinas do germe de trigo e da batata. A maioria das lectinas são glicoproteínas com quantidade variável de açúcar. Um grande número de lectinas são metaloproteínas, as quais precisam de cátions divalentes, tais como Ca^{2+} e Mn^{2+}, para apresentarem atividade completa. Seus pesos moleculares variam de 8.500 a 250.000 daltons. Geralmente são oligômeros constituídos de duas ou mais subunidades, idênticas ou não. Porém, a estrutura tetramérica é a mais comum [19]. Devido às suas propriedades, as lectinas têm sido muito utilizadas por um grande número de pesquisadores, em pesquisa básica, clínica e aplicadas à agricultura. Seu uso oferece vantagens incluindo a alta estabilidade e a disponibilidade de numerosas lectinas com diferentes especificidades. Estas proteínas têm se mostrado uma ferramenta muito útil na bioquímica, imunologia celular e outras áreas relacionadas.

1.2 - Lectinas como ferramentas em diagnóstico laboratorial e elucidação de mecanismos fisiopatológicos

Em ciência básica lectinas tem sido empregadas nas seguintes situações:

- como matriz para afinidade cromatográfica de moléculas glicoproteicas, glicoproteínas de membrana (receptores de hormônios, fator de crescimento, neurotransmissores), imunoglobulinas, etc;
- para detecção e quantificação de glicoproteínas e polissacarídeos por técnicas de imunodifusão, substituindo a utilização de imunoglobulinas;
- no comportamento da célula viva quanto aos aspectos de: comunicação celular; regulação do crescimento; diferenciação celular; resposta imunológica e estudos de células tumorais.

O emprego de lectinas nos estudos acima citados se originaram através da descrição de duas de suas principais propriedades: *certas lectinas aglutinam hemácias de grupos sanguíneos específicos*, sendo assim são largamente utilizadas no diagnóstico de tipo sanguíneo; *outras são mitogênicas* sendo de grande utilidade na determinação de cariótipos e estudos das células imunocompetentes de pacientes [16]. As lectinas, por ligarem-se especificamente a moléculas ou grupos de moléculas de açúcar, provocando aglutinação seletiva, são utilizadas como sonda para identificar e mapear os açúcares da superfície da célula [31]. Esta identificação é extremamente importante para:

a) diagnóstico de antígenos de histocompatibilidade, essencial na área de transplantes;
b) no fracionamento de populações e sub-populações de células da medula óssea, a serem utilizadas em transplantes;
c) em estudos oncológicos, na identificação das células malignas e na revelação de algumas alterações sofridas ao tornaram-se malignas, uma vez que a malignicidade é particularmente mediada pelas ramificações das moléculas de açúcar, que estão na superfície celular.

Em doenças infecciosas, o estudo das lectinas presentes na superfície do corpo bacteriano tem permitido uma melhor compreensão de como ocorre a instalação e o desenvolvimento destas doenças. A adesão da bactéria ao tecido é o primeiro fator para a instalação do processo infeccioso. A adesão bacteriana deve-se a produção de lectinas na forma de proteínas filamentosas conhecidas como fimbrias e estas se ligam a açúcares específicos presentes na célula hospedeira. Assim, conhecendo-se a estrutura molecular do açúcar e/ou da lectina da bactéria, novas drogas poderiam ser desenvolvidas e seriam úteis no tratamento e/ou prevenção da instalação do processo infeccioso [30].

Uma nova classe de lectinas, denominadas selectinas, identificadas em organismos de mamíferos, está sendo estudada e parece estar envolvida no processo inflamatório. Algumas são secretadas por macrófagos e o mecanismo molecular envolvido ainda é objeto de estudos mas especula-se que as selectinas seriam responsáveis pelo transporte de leucócitos (polimorfonucleares) através da parede do tecido endotelial adjacente à área da reação inflamatória [15]. Os receptores endocísticos, como as lectinas hepáticas,

entre os quais o mais conhecido é a sialoglicoproteína do rato, estão envolvidos na eliminação de glicoproteínas que perderam o ácido siálico de suas estruturas, sendo este o sinal para a célula hepática fagocitar estas macromoléculas e retirá-las da circulação [31].

1.3 - Localização e funções das lectinas nos vegetais

Apesar da existência de muitas informações acerca das propriedades biológicas das lectinas suas funções nas plantas ainda são objeto de investigação. Estas funções dependem da localização da lectina na planta. Diversas hipóteses com respeito as funções fisiológicas das lectinas em plantas foram sugeridas baseadas em suas propriedades gerais e sua localização: proteínas de reserva, mecanismos de defesa contra doenças e simbioses microorganismo-planta [19].

Na agricultura o uso de lectinas contra parasitas de plantas é promissor. As lectinas da *Canavalia ensiformes* e *Limax flavus* são hábeis para controlar o ataque de nematóides às raízes do tomate. Aparentemente, as lectinas bloqueiam os quimioreceptores dos nematóides, inibindo sua adesão à planta. O feijão (*Phaseolus vulgaris*) e o tomate, que apresentam altas taxas de lectinas em suas sementes, têm mostrado maior resistência a bactérias [16].

As sementes de leguminosas representam uma fonte razoável de lectinas. Elas são normalmente encontradas nas cotiledôneas, onde podem constituir acima de 10% do nitrogêneo total da semente. Podem ser encontradas, em pequenas quantidades, também no eixo embrionário e em sementes de feijão [19]. Lectinas são também encontradas em partes vegetativas das plantas como folhas, galhos, caules e raízes.

1.4 - Lectinas das sementes de *Artocarpus integrifolia* (jaca)

Os estudos de lectinas presentes no extrato bruto da semente de *Artocarpus integrifolia* (jaca) tem sido fonte de interesse de vários pesquisadores. Este extrato apresentava outras propriedades além da aglutinação de hemácias: proliferação de linfócitos T, estimulação de síntese de imunoglobulinas pelo linfócito B [3] e ligação específica com imunoglobulina A, IgA [27]. Em 1986, uma das lectinas extraídas da semente de jaca foi purificada, e caracterizada a partir de extrato salino da semente, cuja propriedade principal foi a de ligar-se especificamente com a IgA. Esta lectina foi denominada jacalina [26].

Recentemente foi descrito o isolamento e caracterização de outra lectina, chamada KM+, também oriunda do extrato salino da semente de jaca. Esta lectina induz migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal do rato, apresenta atividade quimiotática sobre neutrófilos humanos "in vitro", aglutina hemácias do grupo ABO e estimula a proliferação de linfócitos do baço de camundongos Balb c. O monossacarídeo D-manose inibiu a migração de neutrófilos estimulada por KM+, tanto "in vivo" como "in vitro" [28].

1.4.1 - Propriedades gerais da KM+

A lectina KM+ foi purificada por cromatografia de afinidade em resina de Sepharose-D-manose. É composta por quatro monômeros, sendo que cada monômero tem peso molecular de 13 kDa, ligados não covalentemente. É uma glicoproteína ácida, possui quatro isoformas com pIs 4,0; 4,2; 5,0 e 5,2. KM+ possui 38% de aminoácidos hidrofóbicos, 9,2% de prolina, 1 resíduo de triptofano por monômero e contém 1,8% de carboidratos, determinados pelo método fenol-H_2SO_4 [28]. A atividade hemoaglutinante da KM+ e sua inibição pelos monossacarídeos D-manose, D-glicose e α–metil manosídeo indicam que a KM+ tem pelo menos dois sítios de ligação para o açúcar. Estes sítios estão diretamente envolvidos na atividade indutora da migração de

neutrófilos, uma vez que esta atividade foi inibida por 0,1 M de D-manose tanto "in vitro" como "in vivo". Os autores sugerem que um sítio poderia estar envolvido na interação com carboidratos na superfície dos neutrófilos e o outro com os glicoconjugados na matriz extracelular. Esta ligação com a matriz extracelular poderia ser o "fator" de conecção para direcionar um fluxo de neutrófilos para o meio extravascular. Estudos estruturais da KM+ poderão ser potencialmente úteis para a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos em vários processos fisiopatológicos, bem como no desenvolvimento de novas drogas, a serem utilizadas como terapêutica em processos mediados principalmente por polimorfonucleares [28].

Dados cristalográficos preliminares tais como sistema cristalino, parâmetros de rede e grupo espacial para cristais da KM+ têm sido obtidos e um conjunto de dados de difração de raios-X com uma completeza de 90% até 3,0 Å de resolução foi coletado [20]. Análises destes dados utilizando funções de auto-rotação revelam a existência de elementos de simetria não cristalográfica e a provável orientação do tetrâmero na cela unitária (Oliveira, P.S.L., comunicação pessoal).

1.5 - Objetivos do trabalho

Em linhas gerais, o objetivo deste trabalho é obter a KM+ em grande escala e estudar aspectos de suas propriedades físico-químicas e estruturais, em solução, monitoradas por técnicas espectroscópicas.

Os métodos espectroscópicos são largamente utilizados para analisar a conformação de proteínas. A importância fundamental destes métodos é permitir estudos conformacionais de proteínas em solução. Apesar da cristalografia de raios-X resolver estruturas tridimensionais com resolução de até 0,8 Å, a espectroscopia em solução pode responder questões não facilmente tratáveis por aquele método. A primeira delas seria responder qual a relação entre a conformação de uma proteína em solução e em cristais? Embora pareça que essas estruturas sejam bem similares, é muito difícil, se não

impossível, estabelecer a identidade exata. Entretanto, com o conhecimento da estrutura tridimensional de uma proteína, é possível indagar sobre uma variedade de questões específicas e procurar as respostas projetando-se habilmente experimentos em solução.

A maior utilidade da espectroscopia óptica de proteínas é seu papel em sondar pequenas mudanças na conformação como:

- a mobilidade conformacional local que deve ocorrer na atividade enzimática;
- a conformação requerida para a formação de vários complexos;
- as relações entre interações e mudanças conformacionais.

Como todos os níveis da estrutura são acessíveis às técnicas espectroscópicas, inclusive a estrutura primária [6], é possível examinar uma molécula de proteína em diferentes níveis. Porém, a informação obtida das técnicas espectroscópicas é mais estatística do que específica, isto é, a informação obtida é freqüentemente uma média sobre a molécula inteira, tal como a fração dos resíduos de aminoácidos organizados numa configuração α-hélice ou o número de grupos ionizáveis numa proteína. Técnicas espectroscópicas são, em última análise, ferramentas de grande utilidade para estudos de alterações conformacionais e/ou previsão de estrutura secundária que ocorrem em moléculas pequenas e grandes em função de parâmetros como: solventes, força iônica, temperatura, reagentes químicos, ligantes específicos e não específicos.

As técnicas espectroscópicas, utilizadas no presente trabalho, foram: dicroísmo circular (CD-circular dichroism) e fluorescência. O CD pode ser usado nos três níveis de estrutura não covalente (secundária, terciária e quaternária) e a fluorescência pode ser usada para sondar estruturas terciária e quaternária.

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

a) Obter quantidades em larga escala de KM+, utilizando colunas cromatográficas preparativas e comparar suas propriedades com aquelas descritas na referência 28;

b) Estudar KM+ por CD e através desta metodologia estimar o conteúdo em estrutura secundária, utilizando programas descritos na literatura. O CD também permitirá monitorar o comportamento de KM+ frente à ação de agentes físicos, temperatura, e químicos, como pH, desnaturantes, e açúcares.

c) KM+ será submetida a estudos por espectroscopia de fluorescência que permite monitorar modificações estruturais, a níveis terciários, frente a ação de agentes químicos (pH, agentes desnaturantes), bem como a estequiometria da ligação com o monossacarídeo D-manose (um de seus açúcares ligantes).

Capítulo 2 - Dicroísmo Circular (CD)

2.1 - Introdução

Quase todas as moléculas sintetizadas por organismos vivos são opticamente ativas e o dicroísmo circular (CD-circular dichroism) é uma das maneiras de se medir esta atividade.Em moléculas pequenas, a atividade óptica é causada pela presença de átomos de carbono assimétrico e pelo efeito que estes átomos têm sobre qualquer cromóforo vizinho.

Neste capítulo será verificado como a conformação de uma macromolécula pode afetar sua atividade óptica. As interações entre cromóforos vizinhos desempenham um papel importante, uma vez que apenas com o espectro de absorção é possível observa-las. Como a atividade óptica está intimamente relacionada com a conformação de uma molécula, esta técnica vem sendo largamente utilizada em estudos de mudanças conformacionais, vizinhanças locais, interações de ligantes com proteínas, "folding-unfolding-refolding" de proteínas, bem como uma estimativa qualitativa do conteúdo de estrutura secundária. Este uso tem-se ampliado devido à disponibilidade de aparelhos comerciais cada vez mais sofisticados e eficientes. A teoria básica na qual fundamenta-se esta técnica é muito menos difundida do que seus estudos experimentais, devido à sua complexibilidade. As vantagens que o CD proporciona são: alta sensibilidade às mudanças conformacionais, facilidade e rapidez nas medidas e uso de pouca quantidade de amostra (entre 100 e 500 μg/ml em proteína).

2.2 - Atividade Óptica

Uma molécula opticamente ativa pode interagir de forma diferente com componentes opostas de luz circularmente polarizada [4]. Esta interação pode ser detectada tanto pela mudança na velocidade de propagação das duas componentes [dispersão rotatória óptica (ORD-optical rotatory dispersion) e birrefringência], como pela diferença na absorção [dicroísmo circular (CD) e elipticidade]. Estes efeitos podem ser vistos experimentalmente com a luz linearmente polarizada. A figura 2.1 representa a direção de propagação de uma onda luminosa. Se a luz for plano polarizada, figura 2.1.a, o observador verá o vetor elétrico $\vec{E}$ oscilar senoidalmente em um plano: $\vec{E} = \hat{i}\, E_0 sen\omega t$ (2.1), onde $\hat{i}$ é um versor na direção x, e $\omega=2\pi\nu$ é a frequência angular da luz. Depois de passar através de uma amostra opticamente ativa, a luz estará modificada em dois aspectos. Um dos aspectos é que a amplitude de $\vec{E}$ não está mais confinada a um plano. Ao invés disso, o vetor elétrico $\vec{E}$ traça uma elipse (figura 2.1.b).

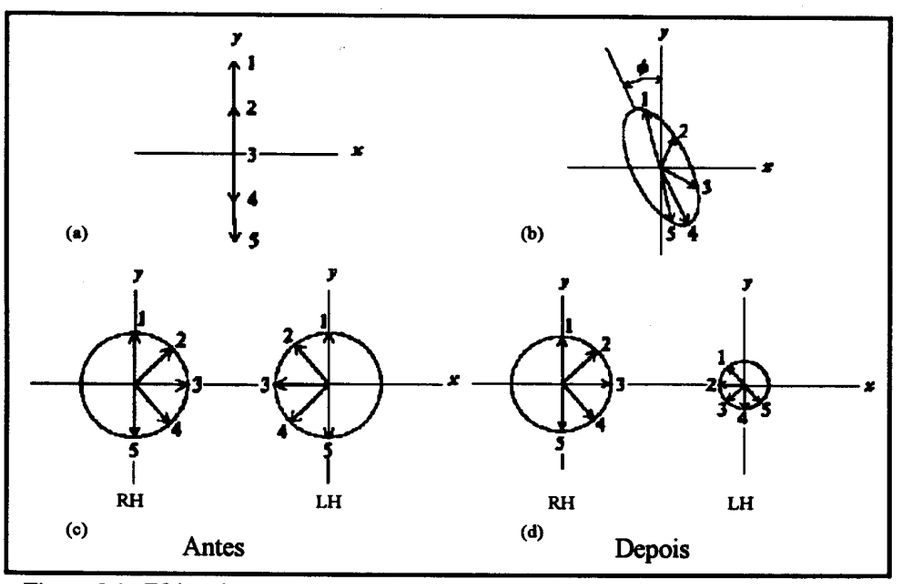


Figura 2.1 - Efeitos de uma amostra opticamente ativa sobre a luz linearmente polarizada. (a) luz incidente linearmente polarizada; (b) luz emergente elipticamente polarizada; (c) resolução da luz linearmente polarizada em componentes polarizadas circularmente à esquerda e à direita; (d) efeito de uma amostra opticamente ativa sobre as duas componentes circularmente polarizadas. [4].

A elipticidade da luz é uma medida da atividade óptica. O outro aspecto é que o plano de polarização da luz foi rodado e, portanto, a orientação da elipse corresponde a uma rotação óptica (ORD). Ao invés de considerar a luz plano polarizada, pode-se dividir $\vec{E}$ em duas componentes opostas de polarização circular:

$$\vec{E}_R = \frac{1}{2}(\hat{i}\, E_0 sen\omega t + \hat{j}\, E_0 cos\omega t) \qquad (2.2)$$

$$\vec{E}_L = \frac{1}{2}(\hat{i}\, E_0 sen\, \omega t - \hat{j}\, E_0 cos\, \omega t) \qquad (2.3)$$

onde $\hat{j}$ é o versor na direção y (figura 2.1.c). A resultante da soma destas duas componentes é a luz plano polarizada. Examinando o efeito de um meio opticamente ativo em cada componente separadamente, nota-se que em tal meio a absorbância da luz circularmente polarizada à esquerda (A_L) é diferente da absorbância da luz polarizada à direita (A_R) portanto depois de passar pela amostra, cada componente é ainda circularmente polarizada, mas os raios dos círculos traçados pelo vetor elétrico de cada uma são agora diferentes. Este fenômeno é chamado de dicroísmo circular (CD). Quando estas duas componentes de polarização circular opostas são combinadas, o resultado será luz elipticamente polarizada porque as duas componentes têm amplitudes diferentes (figura 2.1.d). Portanto, CD é equivalente à elipticidade.

Por outro lado, se as duas componentes circularmente polarizadas são absorvidas diferentemente em qualquer comprimento de onda, a amostra deverá ter diferentes índices de refração n para as duas componentes em todos comprimentos de onda, em outras palavras uma componente se propagará mais rapidamente que a outra no meio, o que acarretará uma diferença de fase entre elas, proporcional à diferença dos índices de refração, n_L - n_R. Este efeito é chamado birrefringência circular. Quando as duas componentes são combinadas, a diferença de fase produz uma rotação permanente ao longo do eixo da luz elipticamente polarizada. Deste modo, a birrefringência circular é equivalente à rotação óptica.

IFSC — SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO

As expressões que relacionam CD e elipticidade (θ), e birrefringência circular e ORD (ϕ) para uma amostra de caminho óptico *l* são:

$$\phi = 180l(n_L - n_R)/\lambda \text{ graus} \qquad (2.4)$$

$$\theta = 2.303(A_L - A_R)/4\pi \text{ graus} \qquad (2.5)$$

Essas duas manifestações da atividade óptica não são independentes uma da outra e relacionam-se por um grupo de integrais denominadas transformadas de Kronig-Kramers [4].

Para comparar resultados de amostras diferentes, é necessário calcular a atividade óptica em molaridade ou em bases residuais. As seguintes equações definem elipticidade molar ([θ]) e rotação molar ([ϕ]) em termos das quantidades medidas, a concentração da amostra (*C*) em moles/litro, e o caminho óptico *l* da cubeta.

$$[\phi] = 100\phi/Cl \qquad (2.6)$$

$$[\theta] = 100\theta/Cl \qquad (2.7)$$

Como é usual para macromoléculas, se *C* for expresso em moles de resíduos, então estas duas equações definem também a elipticidade por resíduo e a rotação por resíduo.

2.2.1 - Origens físicas

Uma banda de CD tem geralmente uma forma semelhante a da banda de absorção correspondente. Empiricamente, pode-se representar a atividade óptica de uma molécula introduzindo o conceito de força rotacional [4]. A força rotacional de uma banda de absorção $0 \rightarrow i$ é definida como a área do espectro CD correspondente:

$$R_{0i} = \frac{3hc}{8\pi^3 N}\int \frac{[\theta(\lambda)]}{\lambda} d\lambda \qquad (2.8)$$

onde [θ](λ) é a elipticidade, h é a constante de Planck, c é a velocidade da luz e N é o número de Avogadro. A integral é feita somente sobre o CD produzido pela transição eletrônica do estado 0 para o estado i. Rosenfeld mostrou como a força rotacional pode ser calculada a partir das funções de onda do estado fundamental (ψ_0) e excitado (ψ_i) de uma molécula assimétrica:

$$R_{0i} = imag(<\psi_0|\tilde{\mu}|\psi_i> \cdot <\psi_i|\tilde{m}|\psi_0>) \qquad (2.9)$$

onde $\tilde{\mu}$ é um operador dipolo elétrico e $\tilde{m}$ é o operador dipolo magnético. Para cada elétron, $\tilde{m}$ pode ser escrito como:

$$\tilde{m} = (e/2mc)(\tilde{r} \times \tilde{p}) \qquad (2.10)$$

onde e é a carga e m é a massa do elétron, $\tilde{p}$ é o operador momento linear e $\tilde{r}$ é o operador posição do elétron. O termo $\tilde{r} \times \tilde{p}$ é o momento angular orbital de um elétron, assim o operador momento de dipolo magnético corresponde de fato a uma circulação de carga. Fisicamente, o dipolo de transição magnética de $<\psi_i|\tilde{m}|\psi_0>$ pode ser considerada como um anel de corrente induzido por luz, do mesmo modo que o dipolo de transição elétrica $<\psi_0|\tilde{\mu}|\psi_i>$ pode ser visto como o deslocamento linear da carga eletrônica induzido por luz (figura 2.2.a e 2.2.b). Porém, uma transição envolve ou o deslocamento linear da carga ou a rotação da mesma [2]. Esta observação constitui a base das regras de seleção para a espectroscopia de absorção:

- $\tilde{\mu} \neq 0$ e $\tilde{m} = 0$, eletricamente permitida (magneticamente proibida)
- $\tilde{\mu} = 0$ e $\tilde{m} \neq 0$, magneticamente permitida (eletricamente proibida)

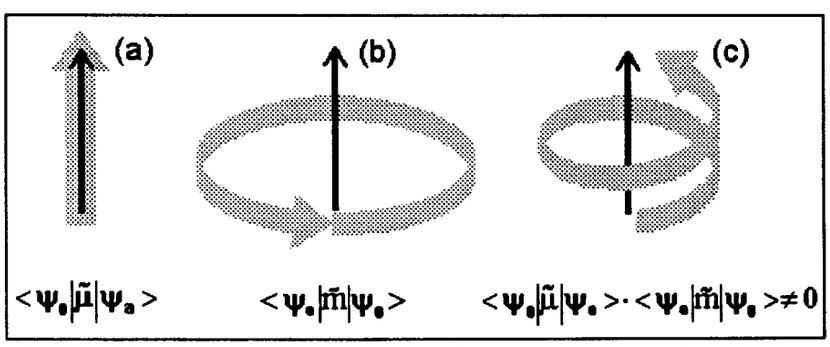


Figura 2.2 - Diagrama do deslocamento de carga induzida por luz em uma molécula. (a) Absorção eletrônica; (b) Absorção magnética; (c) Atividade óptica. [4]

Um bom exemplo das transições eletricamente permitidas, $\pi \rightarrow \pi^*$, são feitas pelo cromóforo peptídeo em 190 nm. O exemplo clássico das transições magneticamente permitidas é a transição $n \rightarrow \pi^*$ das cetonas e peptídeos. Ambas transições são opticamente inativas, pois de acordo com a eq. 2.9, para uma transição apresentar atividade óptica deverá envolver interações elétricas e magnéticas combinadas. Além disso, devido ao produto escalar, $< \psi_i | \tilde{m} | \psi_0 >$ deverá ter uma componente paralela a $< \psi_0 | \tilde{\mu} | \psi_i >$ produzindo assim uma circulação helicoidal de carga, induzida por luz, em torno da direção de $< \psi_0 | \tilde{\mu} | \psi_i >$, figura 2.2. Como anteriormente observado, as transições elétrica e magneticamente permitidas são fenômenos mutuamente exclusivos. Esta exclusão é quebrada, isto é, pode-se observar a existência simultânea de $\tilde{\mu}$ e $\tilde{m}$ não nulos, sob condições adequadas de assimetria, a qual é a característica comum dos cromóforos opticamente ativos. Para cromóforos simples pode-se fazer uma distinção útil em termos de: *cromóforos que são intrinsecamente simétricos* mas assimetricamente perturbados pelo meio ambiente (grupo fenol da tirosina), e *cromóforos que são intrinsecamente assimétricos* (isômeros do tipo hélice da molécula do hexaheliceno, no qual o próprio cromóforo tem um sentido helicoidal), nos quais a atividade óptica é maior de várias ordens de magnitude em comparação com os cromóforos intrinsicamente siméticos.

Os biopolímeros (proteínas, ácidos nucleícos e polissacarídeos) são opticamente ativos devido à assimetria dos átomos de carbono de suas unidades. Pórem a atividade óptica dos biopolímeros difere daquela de seus produtos hidrolisados, isto é, sua atividade não é simplesmente a soma das atividades de suas unidades assimétricas. A fonte da atividade óptica adicional está na assimetria da conformação. Portanto, a ocorrência das interações cromóforo-cromóforo em uma conformação assimétrica dá origem à atividade óptica por mecanismos diferentes daqueles descritos para cromóforos simples. Este fato faz da polarimetria uma ferramenta apropriada para o estudo da conformação molecular.

Uma molécula assimétrica, por exemplo, uma molécula helicoidal, com um passo definido, apresenta um sentido preferencial de polarização, o sentido de seu passo. Deste modo, interage diferentemente com a luz polarizada circularmente à esquerda e à direita. Pode-se então entender porque moléculas assimétricas mostram propriedades diferentes para a luz circularmente polarizada à esquerda e à direita. Essas polarizações tem simetria helicoidal. Se a molécula é não helicoidal, a polarizabilidade terá um sentido definido, porém menos óbvio. O mecanismo para geração de $\tilde{\mu}$ e $\tilde{m}$ para uma hélice é mostrado na figura 2.3. Assim, sistemas helicoidais são os modelos mais simples para a atividade óptica. Porém, são raros os casos em que tanto o estado fundamental, como o excitado, encontram-se sobre um caminho helicoidal, onde os valores da força rotacional são muito altos (hexaheliceno), quando comparados com a força rotacional das α-hélices em proteínas, por exemplo.

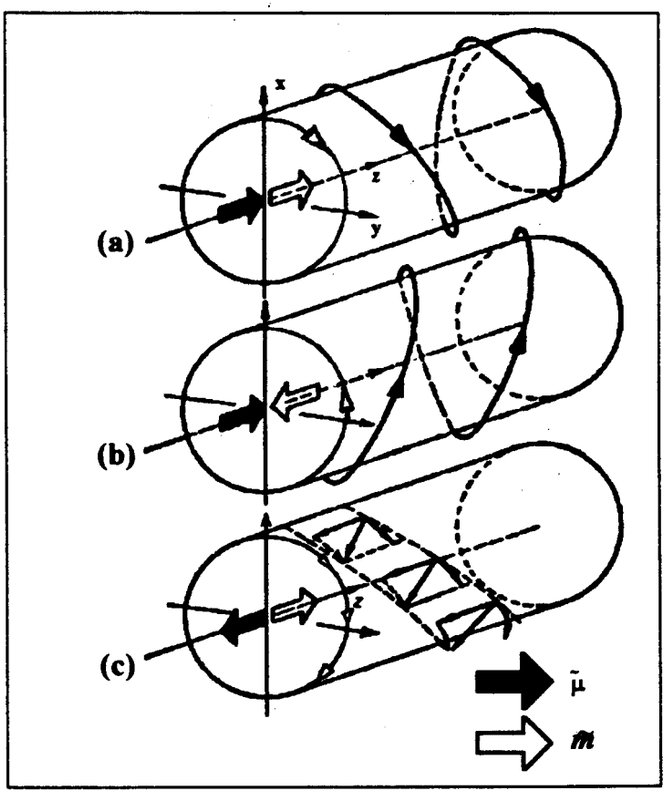


Figura 2.3 - Excitações helicoidais. A geração de $\tilde{\mu}$ e $\tilde{m}$ por um elétron percorrendo: (a) uma hélice com passo à direita; (b) uma hélice com passo à esquerda. O operador $\tilde{m}$ obtém-se com a da aplicação da "regra da mão direita" e o operador $\tilde{\mu}$ da translação ao longo do eixo. $R = \tilde{\mu} \cdot \tilde{m}$ é (a) positiva, (b) negativa; (c) estrutura helicoidal com passo à direita. A orientação relativa de $\tilde{\mu}$ do monômero acoplado fornece ao polímero - $\tilde{\mu}$ e $+\tilde{m}$ ambos no eixo z na transição em fase. Por esta razão, $R = \tilde{\mu} \cdot \tilde{m}$ é negativa.

O caso mais geral de estruturas helicoidais envolve cromóforos os quais não estão conjugados, mas arranjados em um modelo helicoidal (por exemplo, α-hélice em

proteínas). Esta geometria confere valores não nulos a $\tilde{\mu}$ e $\tilde{m}$ simultaneamente, gerando uma alta atividade óptica, comparada com outras conformações de proteínas

De acordo com a teoria de Rosenfeld, a força rotacional de cromóforos que têm um centro ou um plano de simetria é zero. Por outro lado, casos onde a atividade óptica origina-se de cromóforos simétricos não são raros. Por exemplo, a maioria dos cromóforos em proteínas pode ser considerado como tendo uma simetria planar. A explicação para este fato é que o cromóforo é assimetricamente perturbado por seu ambiente molecular. Em sistemas simples, envolvendo um pequeno número de cromóforos simétricos (geralmente planares), orientados numa estrutura assimétrica, existem dois modos principais de gerar $\tilde{\mu}$ e $\tilde{m}$ simultaneamente: (i) a interação dos estados em um cromóforo e (ii) o acoplamento das transições entre cromóforos.

i) a interação de estados em um cromóforo

Para o cromóforo peptídeo, a transição $n \rightarrow \pi^*$ (210 nm) e a transição $\pi \rightarrow \pi^*$ (190 nm) correspondem as transições do estado fundamental $|0\rangle$ para os estados excitados $|\alpha\rangle$ e $|\beta\rangle$, respectivamente. As autofunções correspondentes a esses estados são ψ_0, ψ_α e ψ_β. As orientações do dipolo magnético $\tilde{m}$ da transicão $n \rightarrow \pi^*$, e do dipolo elétrico $\tilde{\mu}$, das transição $\pi \rightarrow \pi^*$, são mostradas na figura 2.4.a e as energias relativas encontram-se na figura 2.4.b.

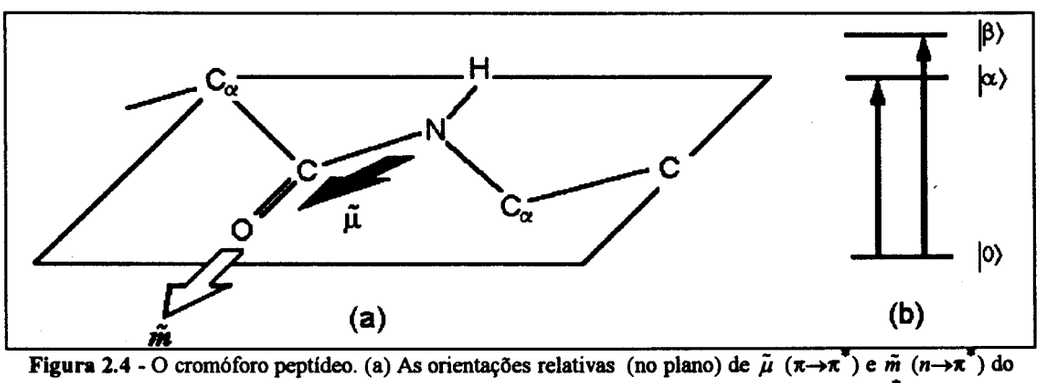


Figura 2.4 - O cromóforo peptídeo. (a) As orientações relativas (no plano) de $\tilde{\mu}$ ($\pi \rightarrow \pi^*$) e $\tilde{m}$ ($n \rightarrow \pi^*$) do monômero; (b) Energias relativas dos estados $|0\rangle$, $|\alpha\rangle$ e $|\beta\rangle$, onde $|0\rangle \rightarrow |\alpha\rangle$ é a transição $n \rightarrow \pi^*$ e $|0\rangle \rightarrow |\beta\rangle$ é a transição $\pi \rightarrow \pi^*$ [2].

A interação de estados pode ocorrer na presença de um campo eletrostático assimétrico. Portanto, nos peptídeos, na presença de uma distribuição assimétrica de ligantes ou ainda de grupos ionizáveis os estados excitados $|\alpha\rangle$ e $|\beta\rangle$ sofrem interação. Novas transições $|\phi\rangle$- $|\phi_1\rangle$ e $|\phi\rangle$-$|\phi_2\rangle$ são produzidas:

$$|\phi_1> = C_1\Psi_\alpha + C_2\Psi_\beta \qquad (2.11)$$

$$|\phi_2> = -C_2\Psi_\alpha + C_1\Psi_\beta \qquad (2.12)$$

Os coeficientes são provenientes da diagonalização da matriz:

$$\begin{vmatrix} E_\alpha & V_{\alpha\beta} \\ V_{\alpha\beta} & E_\beta \end{vmatrix}$$

eqüivalentes a solução das equações simultâneas:

$$C_1(E_\alpha - \lambda) + C_2V_{\alpha\beta} = 0$$

$$-C_2V_{\alpha\beta} + C_1(E_\beta - \lambda) = 0$$

onde E_α e E_β são as energias dos estados $|\alpha\rangle$ e $|\beta\rangle$ relativas ao estado $|0\rangle$ e $V_{\alpha\beta}$ representa a interação entre os estados $|\alpha\rangle$ e $|\beta\rangle$ no campo eletrostático assimétrico. Em geral, $V_{\alpha\beta} \ll E_\alpha, E_\beta$ e C_2 é pequeno. Os autovalores são $\lambda_1 \sim E_\alpha$ e $\lambda_2 \sim E_\beta$. $|\phi_1\rangle$ é predominantemente $|\alpha\rangle$, assim como $|\phi_2\rangle$ é predominantemente $|\beta\rangle$. Os valores não nulos de C_1 e C_2 indicam que $|\phi_1\rangle$ também contém algumas características de $|\beta\rangle$ e $|\phi_2\rangle$ possui algumas características de $|\alpha\rangle$. Lembrando que os estados $|\alpha\rangle$ e $|\beta\rangle$ têm $\tilde{m}$ e $\tilde{\mu}$ associados a eles, os estados $|\phi_1\rangle$ e $|\phi_2\rangle$ satisfazem as condições para a atividade óptica. Esses resultados são resumidos na seguinte tabela:

Tabela 2.1 - Geração da Força Rotacional pela Interação dos Estados $|\alpha\rangle$ e $|\beta\rangle$ [2].

Estado	Autofunção	Transição de Dipolo	Força Rotacional
ϕ_1	$C_1\Psi_\alpha + C_2\Psi_\beta$	Magnético $C_1\tilde{m}$ Elétrico $C_2\tilde{\mu}\cdot$	$R_1 = C_2\tilde{\mu}\cdot C_1\tilde{m}$ $= C_1C_2\tilde{\mu}\cdot\tilde{m}$
ϕ_2	$-C_2\Psi_\alpha + C_1\Psi_\beta$	Magnético $-C_2\tilde{m}$ Elétrico $C_1\tilde{\mu}\cdot$	$R_2 = C_1\tilde{\mu} - C_2\tilde{m}$ $= -C_1C_2\tilde{\mu}\cdot\tilde{m}$

Observa-se que R_2=-R_1, portanto: $\sum_{i=1}^{2} R_i = 0$. A característica única deste mecanismo é envolver a transição de um elétron n na presença de um campo assimétrico. Este mecanismo é conhecido pela denominação "one-electron". Porém, por envolver mais que um estado, $|\phi_1\rangle$ e $|\phi_2\rangle$, esta denominação não deve ser interpretada literalmente. Devem ser ressaltados dois fatos: a) o desenvolvimento da força rotacional R_1 no estado $|\phi_1\rangle$, que é principalmente devida à transição $n \rightarrow \pi^*$ (C_1~1), é acompanhado pelo desenvolvimento simult o de R_2 (=-R_1) em $|\phi_2\rangle$, o estado do qual o momento de dipolo elétrico foi "emprestado" (o qual é principalmente a transição $\pi \rightarrow \pi^*$); b) se $\tilde{m}$ e $\tilde{\mu}$ forem perpendiculares, nenhuma força rotacional existirá ainda que na presença de um campo eletrostático assimétrico.

Além disso, a transição $n \rightarrow \pi^*$ pode interagir com as transições de energias mais altas do meio vizinho. Se este meio é assimétrico, alguma atividade óptica pode ser induzida. Portanto, um resíduo aromático tal como a tirosina ou o triptofano podem adquirir CD por interação com o volume assimétrico da macromolécula.

ii) O acoplamento das transições

Se dois cromóforos estão suficientemente próximos, de modo que a excitação de um seja afetada pelo estado de excitação do outro, eles são ditos acoplados. Este modelo é conhecido como modelo do "oscilador acoplado" de Born. A interação dos estados excitados leva a dois novos estados que correspondem ao acoplamento em fase ou fora de fase dos estados básicos. Para um dímero de transição eletricamente permitida, do estado fundamental $|0\rangle$ para o estado excitado $|\beta\rangle$, representado por $|\beta_1\rangle$ e $|\beta_2\rangle$, a matriz secular será dada por:

$$\begin{vmatrix} E_{\beta_1} & V_{\beta_1\beta_2} \\ V_{\beta_1\beta_2} & E_{\beta_2} \end{vmatrix}$$

da qual dois novos estados devem ser obtidos:

$$|\phi_A\rangle = C_1 \psi_{\beta 1} + C_2 \psi_{\beta 2} \qquad (2.13)$$

$$|\phi_B\rangle = -C_2 \psi_{\beta 1} + C_1 \psi_{\beta 2} \qquad (2.14)$$

Quando os cromóforos são idênticos, $E_{\beta 1} = E_{\beta 2}$, $C_1 = C_2 = 1/\sqrt{2}$, e $|\phi_A\rangle$ e $|\phi_B\rangle$ estão em fase ("in") ou fora de fase ("out"), respectivamente:

$$|\phi_{in}\rangle = \frac{1}{\sqrt{2}}(\psi_{\beta 1} + \psi_{\beta 2}) \qquad (2.15)$$

$$|\phi_{out}\rangle = \frac{1}{\sqrt{2}}(-\psi_{\beta 1} + \psi_{\beta 2}) \qquad (2.16)$$

Para o dímero, os autovalores são: $E_{in} = E_\beta + V_{\beta 1\beta 2}$ e $E_{out} = E_\beta - V_{\beta 1\beta 2}$, onde $V_{\beta 1\beta 2}$ representa a interação entre os estados $|\beta 1\rangle$ e $|\beta 2\rangle$. Quando a aproximação da transição do dipolo é usada para a transição do dipolo elétrico, isto é, $\langle 0|\vec{E}|\beta_1\rangle = \vec{\mu}_1$, a energia de interação entre os estados é dada por:

$$V_{\beta 1\beta 2} = \frac{\vec{\mu}_1 . \vec{\mu}_2}{r^3} - \frac{3(\vec{\mu}_1 . \vec{r})(\vec{\mu}_2 . \vec{r})}{r^5} \qquad (2.17)$$

onde $\vec{r}$ é a distância entre $\vec{\mu}_1$ e $\vec{\mu}_2$.

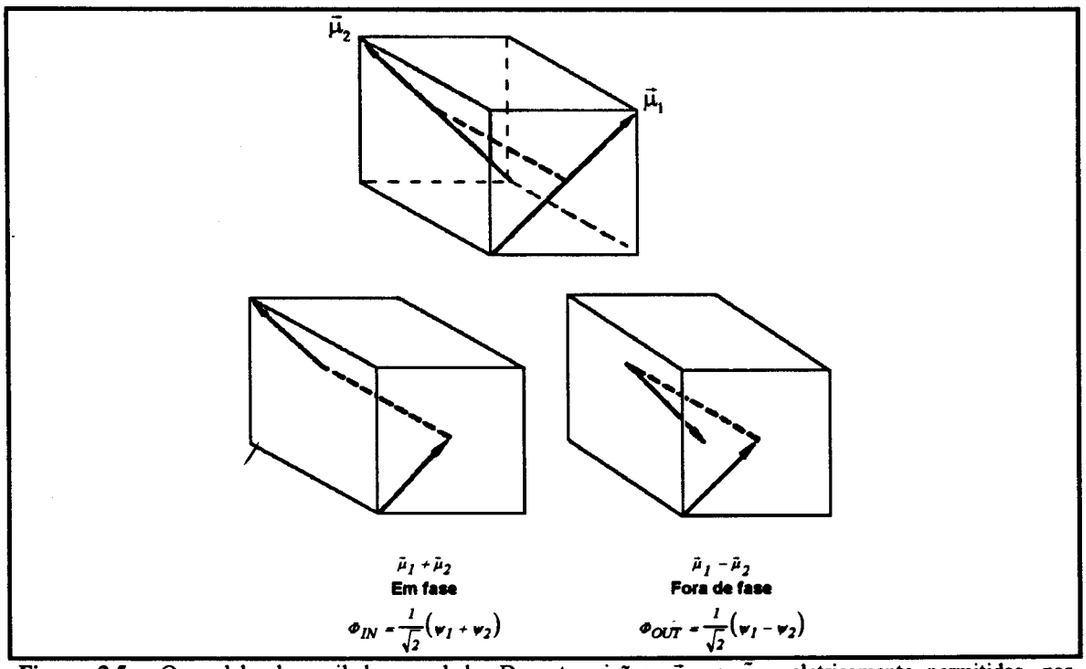


Figura 2.5 - O modelo do oscilador acoplado. Duas transições, $\vec{\mu}_1$ e $\vec{\mu}_2$, eletricamente permitidas, nas combinações dentro e fora de fase com simetria helicoidal à esquerda e à direita, respectivamente [2].

Para transições fortemente permitidas em cromóforos com orientações apropriadas $V_{\beta 1\beta 2}$ deverá ser grande o bastante para produzir uma separação significativa:

$$\sigma = E_{in} - E_{out} = 2V_{\beta 1\beta 2}$$

A forma pela qual estados em fase ou fora de fase dão origem à atividade óptica está ilustrado na figura 2.5 e 2.6. Qualitativamente $|\phi_{in}\rangle$ tem elementos de hélice com passo à esquerda e $|\phi_{out}\rangle$ tem elementos de hélice com passo à direita. A figura 2.6 mostra que a combinação $|\phi_{in}\rangle$ das componentes x de $\vec{\mu}_1$ e $\vec{\mu}_2$ resultam num dipolo de transição elétrica $\tilde{\mu}$ em x, enquanto as componentes y constituem um movimento rotacional, gerando um dipolo de transição magnética $\tilde{m}$ também em x.

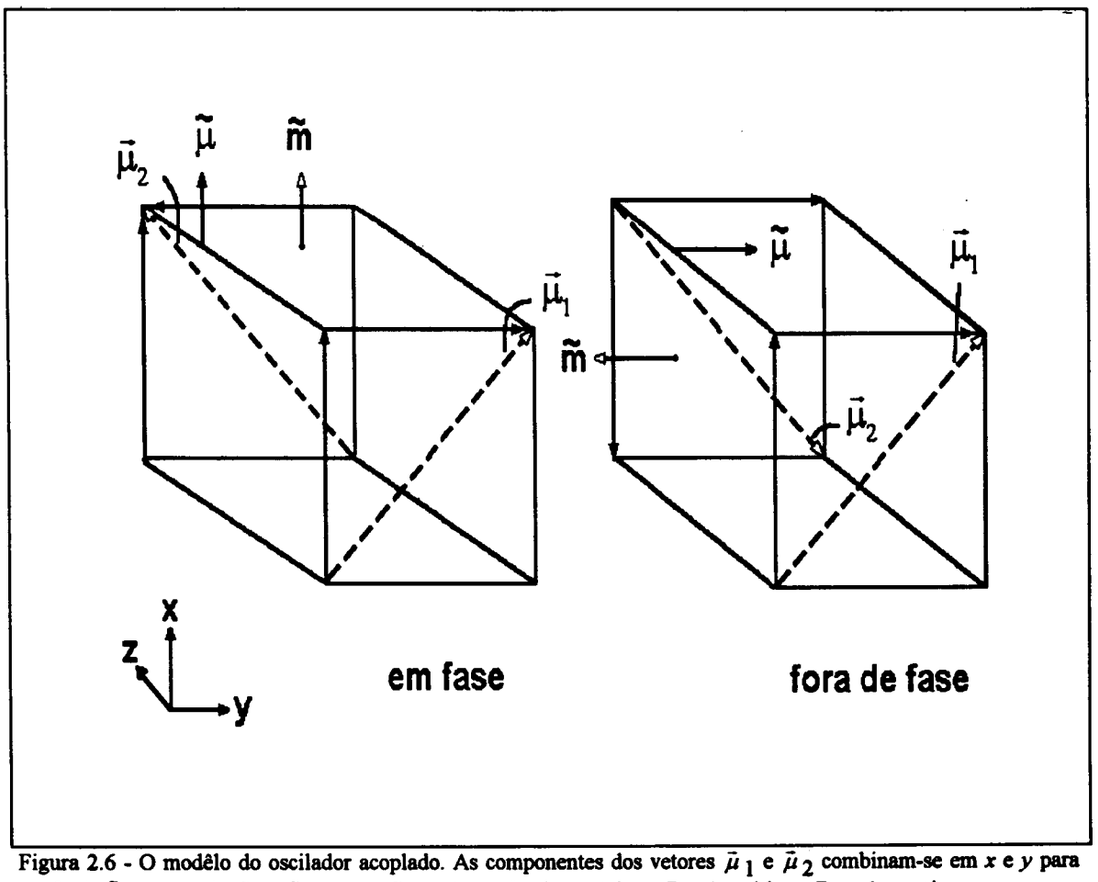


Figura 2.6 - O modêlo do oscilador acoplado. As componentes dos vetores $\vec{\mu}_1$ e $\vec{\mu}_2$ combinam-se em x e y para produzir $\tilde{\mu}$ por translação e $\tilde{m}$ por rotação em torno do eixo x, tal que R_{in} é positivo e R_{out} é negativo.

Estas resultantes $\tilde{\mu}$ e $\tilde{m}$ são paralelas portanto R_{in} é positivo e R_{out} é negativo. Por simetria, R_{in}=-R_{out}, portanto, $\sum_{i=1}^{2} R_i = 0$. Os resultados são: uma separação "exciton" $E \pm V_{\beta 1 \beta 2}$, a redistribuição da intensidade correspondente ao vetor adição de $\vec{\mu}_1$ e $\vec{\mu}_2$ nos dois modos, e o desenvolvimento de $R_{\pm}$ separados por σ. O efeito conformacional é expressado totalmente através do elemento $V_{\beta 1 \beta 2}$. A força rotacional das transições em

fase (+) e das transições fora de fase (-), devido ao acoplamento de dois dipolos $\tilde{\mu}_1$ e $\tilde{\mu}_2$, separados pela distância r_{12}, é dada por:

$$R_{\pm} = \mp \frac{\pi}{2\lambda} r_{12} \cdot \tilde{\mu}_1 \times \tilde{\mu}_2 \qquad (2.18)$$

e a separação espectroscópica:

$$\sigma = 2V = 2\tilde{\mu}_1 \cdot \tilde{\mu}_2 cos\left(\frac{\alpha}{r^3}\right) \qquad (2.19)$$

onde α é o ângulo entre os monômeros. Das equações 2.18 e 2.19, conclui-se que o sinal CD será zero quando $\tilde{\mu}_1$ e $\tilde{\mu}_2$ forem coplanares, paralelos ou perpendiculares. A amplitude terá valor máximo em $\alpha=\pi/4$, $5\pi/4$ e mínimo para $\alpha=3\pi/4$, $7\pi/4$. Os monômeros podem ter CD (usualmente pequenos), mas o termo "exciton" (eq. 2.18) usualmente domina em dímeros e polímeros. Este termo e as equações de separação determinam a força rotacional absoluta do espectro de CD. Em moléculas mais complexas como no caso de um oligômero composto de cromóforos monômeros idênticos, um trímero deveria apresentar três bandas, um tetrâmero deveria apresentar quatro bandas e assim por diante. Porém, existem simplificações, o DNA, por exemplo, mostra somente duas bandas, uma positiva e a outra negativa, correspondente à banda de absorção em 260 nm. Em proteínas, a estrutura α-hélice dá origem a um dubleto na absorção da ligação peptídica (aproximadamente 190 nm). Em alguns casos mais simples tais como poli-L-alanina, onde as cadeias laterais pouco contribuem para as propriedades ópticas, é possível fazer um cálculo. A figura 2.7 mostra o resultado de um cálculo para a poli-L-alanina, comparada com resultados experimentais. A concordância é quase total e demonstra o potencial da atividade óptica na análise conformacional.

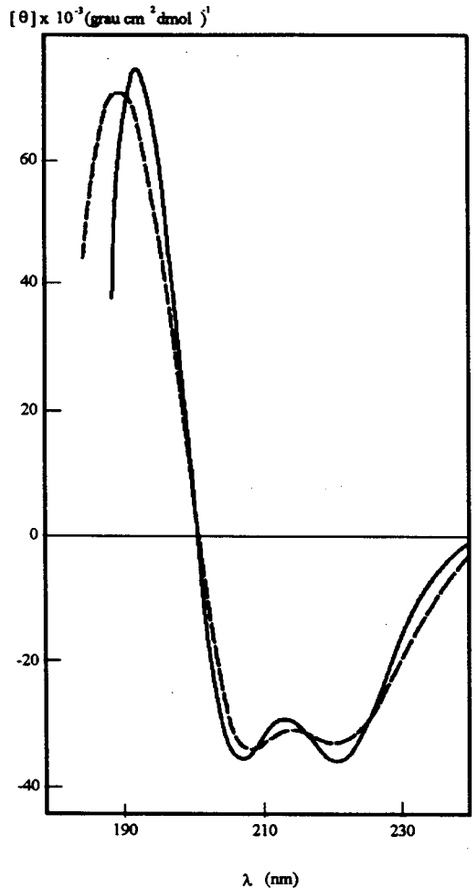


Figura 2.7 - O espectro de CD da poli-L-alanina em conformação α-hélice. O espectro calculado é representado por linha tracejada, enquanto que o observado por linha sólida [4].

Ok

2.3 - Determinação do conteúdo de estrutura secundária

Ok

Na prática o cálculo quântico do CD de uma proteína é ainda uma tarefa difícil. Cromóforos tais como ácidos nucleícos e aminoácidos aromáticos envolvem mais estados eletrônicos, e as direções de momento de transição e intensidade são na grande maioria das vezes desconhecidas. Alguns métodos tem sido desenvolvidos para usar dados de CD para predizer ou analisar as propriedades ópticas de sistemas desconhecidos [37]. Isto deve-se ao grande número de dados experimentais de atividade óptica, para polipeptídeos e proteínas, com estrutura secundária conhecida. Para as proteínas o maior objetivo tem sido deduzir a estrutura secundária média da cadeia peptídica a partir do espectro de CD. A menos que uma fração excepcional de aminoácidos aromáticos esteja presente, a atividade óptica na região do espectro entre

IFSC — SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO

190 e 230 nm é dominada pela cadeia peptídica [4]. Ao menos qualitativamente, a natureza das cadeias laterais alifáticas não afeta o espectro de CD nesta região. Portanto, como uma aproximação pode-se considerar uma proteína apenas como uma combinação linear das estruturas secundárias: α-hélice, folha pregueada ß (paralela e antiparalela), volta ß e desordenada.

O espectro de CD típico dessas estruturas pode ser obtido por homopolipeptídeos e por peptídeos sintetizados (volta ß). A α-hélice tem seu espectro bem caracterizado. Ele mostra uma forte banda positiva com máximo em 191-193 nm ($\pi \rightarrow \pi^*$) e duas bandas negativas de igual amplitude com mínimos em 208-210 ($n \rightarrow \pi^*$) e 222 nm. A folha ß antiparalela tem seu espectro caracterizado por uma banda positiva em 195 nm ($\pi \rightarrow \pi^*$) e outra negativa em 216-217 nm ($n \rightarrow \pi^*$)[5]. A intensidade das bandas é dependente do homopolímero. A estrutura desordenada geralmente tem uma acentuada banda negativa em 196-200 nm e uma fraca banda em torno de 218 nm, a qual pode ser positiva ou negativa (figura 2.8). A conformação volta ß, tem sido considerada como uma importante fonte de sinal em um espectro CD. Os estudos teóricos para predizer o comportamento desta estrutura foram feitos principalmente por Woody [36].

O CD dos elementos estruturais de uma proteína é considerado aditivo. Se forem conhecidos os espectros de CD das estruturas acima citadas, utilizando-os como uma referência, as frações correspondentes a estas conformações podem ser solucionadas utilizando o espectro de CD da proteína. Este pode ser expresso como:

$$\theta(\lambda) = \sum_{i=1}^{n} f_i \theta_i(\lambda) \qquad (2.20)$$

onde f_i é a fração da i-ésima conformação e $\theta_i(\lambda)$ é a medida de CD da conformação correspondente. Os f_i's podem ser calculados resolvendo-se um sistema de equações (uma equação para cada λ), pelo método dos mínimos quadrados. A precisão de tal cálculo depende "do quanto são linearmente independentes" os espectros base $\theta_i(\lambda)$ escolhidos e em proteínas esta independência geralmente não ocorre. Foram propostas quatro aproximações que serão mencionadas nas seções seguintes.

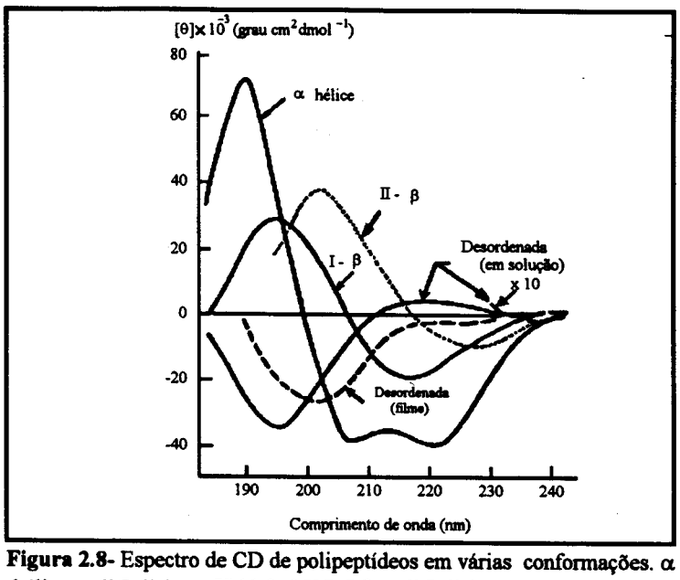


Figura 2.8- Espectro de CD de polipeptídeos em várias conformações. α -hélice: poli-L-lisina, pH 11.2, 25°C; I-β: poli-L-lisina, pH 11.2, 52°C; II-β: poli-S-carbobenzoximetil-L-cisteína (filme); desordenada (em solução): poli-L-lisina, pH 7.5; desordenada (em filme): um filme de poli-L-lisina, em pH 7.5 [5].

2.3.1 -Espectro de referência baseado no modelo de homopolipeptídeos

Neste método [11], os espectros de referência para as quatro estruturas secundárias básicas, α-hélice (α), folha pregueada ß (ß), volta ß (t) e desordenada (r) são os espectros de CD de homopolímeros. Utilizando-se quatro espectros de homopolímeros, cada um representando uma das quatro estruturas, a eq. 2.20 pode ser escrita como:

$$\theta(\lambda) = f_\alpha\, \theta_\alpha(\lambda) + f_\beta\, \theta_\beta(\lambda) + f_t\, \theta_t(\lambda) + f_r\, \theta_r(\lambda) \qquad (2.21)$$

Os valores são introduzidos na equação acima, a qual é solucionada pelo método dos mínimos quadrados, utilizando-se o vínculo $\sum f_i = 1$. A maior vantagem desta aproximação é sua simplicidade. Uma desvantagem é que o CD da hélice ou da folha pregueada ß varia com o comprimento do homopolipeptídeo. Os modelos sintéticos utilizados para compor os espectros básicos são muito maiores que hélices ou folhas em uma proteína globular. A outra desvantagem é que a estrutura terciária de uma proteína

globular consiste de regiões de estruturas secundárias individuais empacotadas próximas umas das outras, cujas interações contribuem para o CD e não podem ser adequadamente ajustadas por homopolímeros.

2.3.2 - Espectros de referência baseados em proteínas

Com o intuito de evitar as desvantagens citadas anteriormente, Donald Wetlaufer [29] utilizou um grupo de proteínas (mioglobina, lisozima e ribonuclease), para calcular os espectros básicos. Desde que as proteínas tenham a estrutura secundária conhecida, é possível determinar o espectro de referência do espectro de CD dessas proteínas utilizando-se a eq. 2.20. Neste caso, são conhecidos os f_i 's a partir dos dados cristalográficos e os $\theta(\lambda)$ que são os valores do espectro de CD das proteínas. Os valores de $\theta_i(\lambda)$ são as quantidades desconhecidas. Desse modo, têm-se aproximações para o espectro de cada tipo de estrutura secundária como realmente ocorrem em proteínas típicas. Chen e Yang [8] utilizaram cinco proteínas (mioglobina, lisozima , ribonuclease, papaína e lactato desidrogenase) para solucionar um sistema de cinco equações para cada comprimento de onda, pelo método dos mínimos quadrados, com o vínculo $\sum f_i = 1$. Eles obtiveram espectros de referência similares ao dos homopolipeptídeos. Tanto Wetlaufer quanto Chen e Yang, calcularam espectros de referência apenas para as conformações α-hélice, folha ß pregueada e desordenada. Em 1978, Chang *et. al.* [7], aumentaram o número de proteínas de referência para 15 e determinaram também o espectro de referência para a conformação volta ß. As proteínas adicionadas foram: insulina, citocromo-C, carboxipeptidase-A, termolisina, inibidor de tripsina, ribonuclease-S, concanavalina-A, parvalbumina. Eles utilizaram dois vínculos: $\sum f_i = 1$ e $0 < f_i < 1$. A introdução do vínculo $\sum f_i = 1$, reduz uma variável por substituir f_r por $(1-f_\alpha-f_ß-f_t)$. A remoção deste vínculo pode proporcionar um teste de soma. Uma análise de CD deve ser revista se falhar neste teste. O uso de proteínas para calcular o espectro de referência é mais realístico do que o uso de polipeptídeos sintéticos, porém não se pode

negligenciar algumas desvantagens que este método traz: 1ª) a arbitrariedade da escolha das proteínas de referência. Idealmente, o grupo deveria cobrir um largo intervalo de f_α, f_β e f_t. Esta condição é difícil de ser satisfeita, apesar do conhecimento de muitas proteínas de estrutura resolvida. Ainda não é claro qual seria um grupo representativo. Diferentes grupos de proteínas de referência podem mostrar diferentes intensidades e, ainda, diferentes perfis de espectros de referência. 2ª) não é trivial a determinação de estrutura secundária por difração de raio-X. 3ª) a estrutura secundária de uma proteína está, geralmente, longe da ideal, pois é freqüentemente misturada e difere de proteína para proteína.

2.3.3 - Combinação linear do espectro CD de proteínas de estrutura conhecida

a) Método de Provencher e Glökner [25]

Estes autores propuseram a análise direta do espectro de CD de uma proteína por combinação linear do espectro de CD de proteínas de referência de estrutura secundária conhecida. Este método evita a responsabilidade de se fazer uma escolha antecipada do número de proteínas que compõem o espectro de referência, pois um grande número de proteínas pode tornar o método dos mínimos quadrados instável. A instabilidade causada por muitos parâmetros na eq. 2.20 é controlada por um procedimento de regularização vinculada, com a introdução de um coeficiente γ_j para determinar e expressar $\theta(\lambda)$ na eq. 2.20 como:

$$\theta(\lambda) = \sum_{i=1}^{N_\gamma} \gamma_j R_j(\lambda) \qquad (2.22)$$

onde $R_j(\lambda)$ é o CD da j-ésima proteína de referência no comprimento de onda λ e N_γ é o número de proteínas de referência usadas. As percentagens das conformações são dadas por:

$$f_i = \sum_{j=1}^{N_\gamma} \gamma_j F_{ji} \qquad (2.23)$$

onde F_{ji} é a fração da i-ésima conformação da j-ésima proteína. Os valores de γ são determinados de forma a minimizar uma quantidade ε:

$$\sum_{K=1}^{N_\gamma}[\theta(\lambda_K)-\theta_{obs}(\lambda_K)]^2+\alpha\sum_{j=1}^{N_\gamma}\left(\gamma_j-\frac{1}{\gamma}\right)^2 \qquad (2.24)$$

obedecendo os vínculos : $\sum f_i = 1$ e $f_i \geq 0$. $\theta(\lambda)$ e $\theta_{obs}(\lambda)$ são os valores calculados e experimentais, respectivamente, N_γ é o número de pontos. Para α=0, a eq. 2.24 reduz-se a solução dos mínimos quadrados. Quando α>0, o segundo termo tende a estabilizar a solução, mantendo pequeno cada γ_j, isto é, próximo a $1/N_\gamma$, a não ser que $R_j(\gamma)$ correspondente tenha componentes que simulem bem $\theta_{obs}(\lambda)$ pois, neste caso, o termo dos mínimos quadrados, o primeiro da eq. 2.24, reduz-se significativamente. O programa automaticamente escolhe o melhor valor de α. A vantagem deste método deve-se a liberdade para definir espectros de referência característicos das classes conformacionais, isto é, a precisão do valor f para uma classe pode ser bastante independente da precisão para outras classes. Ainda assim, a determinação das percentagens são dependentes dos dados de raio-X com as desvantagens anteriormente mencionadas. Provencher e Glöckner usaram os mesmos dados de CD fornecidos por Chang *et. al.* [7], exceto que os espectros de CD da subtilisina e termolisina foram excluídos a fim de melhorar os coeficientes de correlação.

b) Método de Hennessey e Johnson [12]

Utilizaram uma aproximação similar à citada no item a), mas aplicaram um método autovetor de análise de multicomponentes. O método é baseado num cálculo matemático de espectros básicos ortogonais de CD a partir dos espectros de CD de 15 proteínas e 1 polipeptídeo helicoidal. Os autores obtiveram, utilizando uma matriz algébrica, 16 espectros básicos ortogonais. Estes 16 espectros básicos são combinações lineares dos espectros de CD das proteínas originais. Eles concluíram que apenas 5 dos espectros básicos eram necessários para reconstruir os espectros das 15 proteínas e do polipeptídeo e os 11 espectros restantes eram provavelmente ruído. Estes espectros não

são os espectros típicos das estruturas secundárias puras, mas podem ser usados para calcular a estrutura secundária de uma proteína, pois os espectros básicos de CD correspondem a uma mistura de estruturas secundárias. Em analogia a Provencher e Glöckner, Hennessey e Johnson restringiram sua análise a 15 proteínas, para reduzir a instabilidade do método. A vantagem deste método é que com o uso dos cinco espectros ortogonais básicos, a simulação para o espectro CD de uma proteína será única. Porém, o método de Provencher e Glöckner, é provalvemente mais flexível pois é menos dependente do grupo das proteínas de referência.

c) Método de Manavalan e Johnson [18]

Aperfeiçoaram os métodos acima com um novo procedimento, denominado método de seleção variável. Este método une a flexibilidade encontrada no método de Provencher e Glöckner ao método de Hennessey e Johnson. A idéia principal é remover as proteínas do grupo básico, que refletem parâmetros não encontrados no espectro de CD da proteína que está sendo analisada. Este procedimento é executado de forma sistemática removendo três proteínas de uma vez e eliminando as responsáveis por causar problemas. O procedimento é repetido até que análises satisfatórias sejam obtidas.

2.3.4 -Combinação linear do espectro de CD de proteínas

Perczel e Fasman desenvolveram um método denominado "Convex Constraint Analysis" (CCA), que utiliza diretamente os espectros de CD das proteínas, possibilitando utilizar como bases, proteínas com estrutura ainda desconhecida [21, 22, 23, 24]. O espectro de CD de uma proteína é expresso como:

$$f(\lambda) = \sum_{i=1}^{P} c_i g_i \qquad (2.25)$$

IFSC — SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO

onde c_i é o coeficiente com um determinado peso, $g_i(\lambda)$ são as componentes puras do espectro de CD e P corresponde ao número de conformações que serão utilizadas na desconvolução.

O verdadeiro problema é determinar g_i. A desconvolução da equação prévia sem qualquer vínculo em c_i é ambígua. Provencher e Glökner não extraíram qualquer espectro de componentes puras dos dados de um grupo de proteínas de referência mas avaliaram diretamente os c_i's com o auxílio dos dados da difração de raio-X. Hennessey e Johnson, para evitar esta ambigüidade, introduziram a ortogonalidade das funções básicas. Mas, na verdade, estas funções não são espectros das componentes puras. Perczel e Fasman usaram três vínculos:

a) $\sum_{i=1}^{P} c_i = 1$

b) $c_i \geq 0$

c) Os c_i's (i = 1,...,P) devem estar embutidos num "simplex" do espaço euclidiano de dimensão P (isto é, um elemento geométrico básico, como um triângulo). A minimização deste espaço conduz a uma desconvolução bem sucedida (Algoritmo de Bregman).

Deste modo, Perczel e Fasmam, encontraram os g_i's utilizando 25 espectros de CD de proteínas para o cálculo da desconvolução. Porém, quando adicionaram a proteína a ser analisada ao grupo de proteínas de referência (25+1), não obtiveram os mesmos espectros puros. Isto porque, o programa não faz distinção entre os dados da proteína a ser analisada e o grupo básico de dados. Portanto, o espectro de CD, da proteína a ser analisada, fornece sua própria contribuição à base de referência. Às vezes dependendo do grupo de dados da proteína, a forma dos "espectros puros" é bastante similar às formas dos homopolipeptídeos, mas é muito sensível às mudanças no grupo de dados. Estes espectros são portanto, apenas uma média dos componentes puros.

Os melhores resultados são obtidos com P=5. Este fato apoia a suposição de que as curvas experimentais de CD são compostas de contribuições quirais de mais de três conformações. A maior vantagem deste método é que ele não faz uso dos dados de

raios-X como em todos métodos anteriormente citados. O grupo de dados das proteínas de referência podem ser alinhados com qualquer que seja a proteína, ainda que os dados de raio-X não estejam disponíveis. Considerando que os espectros básicos encontrados com esse método possam efetivamente representar os componentes puros, então o método abre novas possibilidades neste campo, pois o fato de utilizar apenas os espectros de CD permite calcular-se os espectros básicos incluindo no grupo de proteínas de referência, proteínas similares a aquela em estudo, mesmo que não existam dados de raio-X. Uma outra interessante aplicação é a monitoração de mudanças na estrutura secundária da proteína em função de alguns agentes externos, como temperatura, pH, ligantes, ou ainda, a determinação da estrutura secundária de pequenos peptídeos. Neste caso, os espectros de referência a serem utilizados para o calculo dos espectros das estruturas básicas, seriam os próprios espectros do parâmetro que foi variado. Por exemplo, o grupo de espectros de referência para um experimento no qual a temperatura foi variada seriam os próprios espectros obtidos com a variação da temperatura.

2.4 - Comparação entre os métodos da análise do CD

Para se julgar a validade de um método deve-se, quando possível, comparar as estimativas do CD com os resultados de raios-X. As estimativas por CD para a hélice, são na maioria das vezes excelentes, independentemente do método usado. Isto ocorre devido às altas intensidades das bandas helicoidais de CD. A correlação para as outras formas é freqüentemente menos satisfatória [34]. Uma boa avaliação da correlação com os dados de raios-X é complicada pelo fato de que cada laboratório usa um método diferente para a análise dos dados de raios-X. Por exemplo, Hennessey e Johnson utilizaram um método baseado nas ligações peptídicas como unidades básicas; por sua vez, Perczel e Fasman preferiram um método baseado na fração das ligações de hidrogênio. Estes métodos de análise de raios-X, geralmente, são pobremente

correlacionados. Portanto, para uma comparação satisfatória entre métodos que utilizam espectros de CD em suas análises, é necessário levar-se em consideração, a maneira como os dados de raios-X foram tratados.

2.5 - Outras aplicações para o CD

O CD pode ser utilizado para monitorar mudanças conformacionais e vizinhanças locais. Para tais experimentos, devem ser seguidos parâmetros do sistema, tais como tempo, temperatura ou outras variáveis. Se o sistema contém diversas conformações, a atividade óptica e a absorção serão sempre uma média aritmética. Por exemplo, na equação: $\theta = \sum_{i=1}^{n} f_i\theta_i$, f_i é apenas uma fração da i-ésima conformação e θ_i é o CD da conformação correspondente. Pela escolha de um grupo de diferentes comprimentos de onda, pode-se seguir cada conformação independentemente.

O CD é essencialmente sensível a interações locais, mesmo em casos onde associações complexas estejam ocorrendo. Devido a sua sensibilidade, a monitoração de mudanças conformacionais por CD é muito utilizada. Ainda que uma interpretação estrutural detalhada não seja possível, uma mudança na estrutura refletirá em uma mudança no CD.

Outra aplicação útil é em estudos de ligações de moléculas pequenas a proteínas ou ácidos nucleícos. Este experimento será mais eficiente quando utiliza-se uma molécula pequena que absorva a luz visível. Esta, se for opticamente ativa, deverá mostrar uma mudança no CD ao se ligar a uma macromolécula, devido as interações eletrônicas com o seu sítio ligante, ou a mudanças conformacionais quando ligada a macromolécula. Essas mudanças podem ser detectadas facilmente, porque a maioria dos biopolímeros não têm CD no visível.

Se a molécula pequena for opticamente inativa, a indução do CD ocorrerá com a ligação, pelas mesmas razões acima mencionadas. De qualquer modo, medidas de CD na

banda de absorção de moléculas pequenas, devem refletir somente propriedades do material ligado. Isto facilita determinar se existe uma classe de sítios ligantes eqüivalentes e o número de ligantes neste sítio. Supondo que os sítios sejam similares, o CD induzido da pequena molécula é dado por $\theta = C_b\theta_b l/100$, onde C_b é a concentração das pequenas moléculas ligadas, θ_b é o CD das espécies ligadas (determinado pela saturação de uma amostra de moléculas pequenas com excesso de polímeros) e l é o caminho óptico da cubeta. Como θ_b é conhecido, C_b pode ser calculado da medida θ. Deste cálculo, constantes e dados termodinâmicos de ligação podem ser obtidos.

Diversos fatores contribuem para o CD induzido de uma pequena molécula quando ligada ao sítio assimétrico de um polímero. O efeito do meio ambiente deverá mostrar contribuições do tipo "one-electron". Em adição, termos do oscilador acoplado podem fornecer altos valores de CD induzidos, se os níveis de energia dos cromóforos das proteínas ou ácidos nucleícos forem similares aos níveis de energia da pequena molécula. Por exemplo, grande parte da atividade óptica dos grupos heme nas hemoglobinas, pode ser causada pelas interações com resíduos de tirosina da proteína.

Capítulo 3 - Fluorescência

3.1 - Introdução

A espectroscopia de fluorescência é uma das técnicas mais utilizadas no estudo estrutural de macromoléculas na atualidade. Isto é devido ao desenvolvimento de uma instrumentação avançada, aliada à facilidade de realizar medidas e à possibilidade de se trabalhar com amostras pouco concentradas, da ordem de 10^{-10} M para proteínas ou 10^{-15}-10^{-12} M para outros fluoróforos. Outra vantagem desta técnica é sua alta sensibilidade, que decorre do tempo relativamente longo (da ordem de *n*s a μs) em que a molécula permanece no estado excitado. Com esse tempo de vida, a molécula e o meio podem não permanecer estáticos, como ocorre com a absorção (*f*s). Assim, vários processos poderão ocorrer, entre eles:

- reações de protonação e desprotonação; de grupos funcionais
- mudanças conformacionais em proteínas;
- reorientação do cromóforo.

Além disso, com a emissão de luz, pode-se obter informações sobre as propriedades e reatividades dos estados excitados. A seletividade da técnica é uma excepcional vantagem no caso das proteínas pois estas possuem apenas três fluoróforos intrínsecos (triptofano, tirosina e fenilalanina), que podem ser monitorizados diretamente ou, ainda, podem ser acoplados a elas, covalentemente ou não, marcadores extrínsecos.

3.2 - Fluorescência estática

Quando uma molécula absorve um fóton de luz, um elétron passa do estado fundamental (S_0) ao estado excitado (S_1). Primeiramente, acontece uma desexcitação para o nível vibracional fundamental do estado excitado através de conversão interna (processo não radioativo), em seguida ocorre o retorno para o estado fundamental com emissão de luz. À emissão de luz resultante desse decaimento, dá-se o nome de fluorescência.

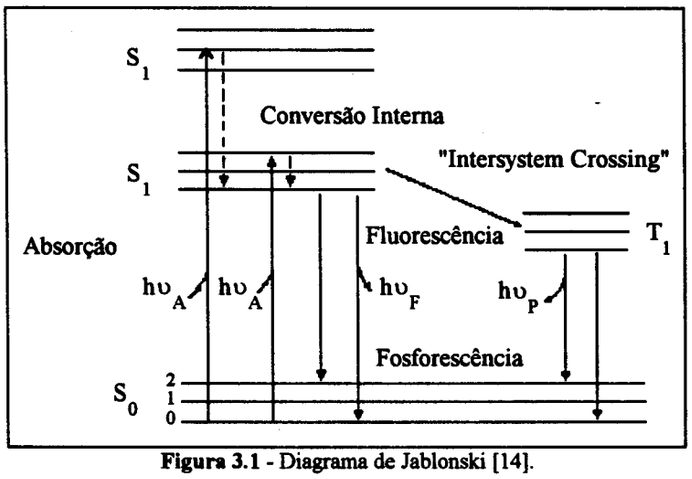


Figura 3.1 - Diagrama de Jablonski [14].

Quando a absorção ocorre, a estrutura da molécula e o meio ambiente estão em um estado de orientação fundamental. A emissão origina-se da reorientação de uma molécula, com relação ao solvente, em resposta ao estado excitado [4, 14]. Porém, a fluorescência não é o único processo pelo qual um elétron retorna ao estado fundamental (figura 3.1). Tais processos e as constantes de velocidades que os caracterizam, são: a conversão interna, k_{ic}, cruzamento intersistema, k_{is}, e outros processos de supressão, $k_q(Q)$. Todos estes processos competem diretamente para despopular o estado excitado. A fração de estados excitados que virão a ser desexcitados através da fluorescência, é denominada rendimento quântico e expressa por:

$$\phi_F = \frac{k_F}{[k_F + k_{ic} + k_{is} + k_q(Q)]} \qquad (3.1)$$

onde k_F é a constante de velocidade da fluorescência.

O rendimento quântico é, portanto, igual a razão entre os fótons emitidos e os absorvidos pelo sistema. Os processos que influenciam na intensidade de fluorescência serão comentados a seguir.

- **Conversão interna (k_{ic}):** Neste processo a energia de excitação em S_1 é perdida por colisão com o solvente, ou por dissipação através dos modos de vibração interna. Geralmente, k_{ic} aumenta com a temperatura, conseqüentemente a intensidade da fluorescência diminui com a temperatura. Este fato causa dificuldades para monitorar, com fluorescência, mudanças conformacionais induzidas por temperatura.
- **Supressão da fluorescência [$k_q(Q)$]:** Este processo resulta ou da supressão colisional por outras moléculas, ou da formação de complexos com solutos moleculares (Q) capazes de reduzir o tempo de vida do estado excitado, ou manter o complexo no estado fundamental, provocando a supressão da fluorescência.
- **Cruzamento intersistema (k_{ic}):** Neste processo, a troca de spin "proibida" converte um estado excitado singleto (S_1) em um estado excitado tripleto (T_1). Este estado pode, por sua vez, decair ao estado singleto fundamental (S_0) por fosforescência ou por conversão interna. O estado tripleto T_1 geralmente tem menor energia que o estado singleto excitado S_1 e, portanto, a fosforescência ocorre em comprimentos de onda maiores. Deste modo, a banda da fosforescência pode ser separada da banda da fluorescência.

A figura 3.2 mostra o efeito de outros níveis eletrônicos e vibracionais. A conversão interna entre singletos de energia mais alta como por exemplo $S_2 \rightarrow S_1$, é mais rápida do que as taxas até agora consideradas. Do mesmo modo, a relaxação vibracional dos níveis vibracionais excitados, de cada estado eletrônico, para o nível vibracional fundamental, é muito mais rápida do que a emissão de um fóton. O resultado é que toda a fluorescência observada origina-se do menor nível vibracional do estado singleto menos excitado. Esta afirmação traz implicações importantes:

- a forma da banda de emissão deverá ser uma imagem especular da banda de absorção dos maiores comprimentos de onda (figura 3.2b), evidenciando que as estruturas vibracionais de S_1 e S_0 são muito similares.
- o espectro de emissão deverá ser independente do comprimento de onda de excitação;
- todos os espectros de fluorescência deverão ser deslocados para energias menores (comprimentos de onda maiores) do que as da banda de absorção (deslocamento de Stoke);

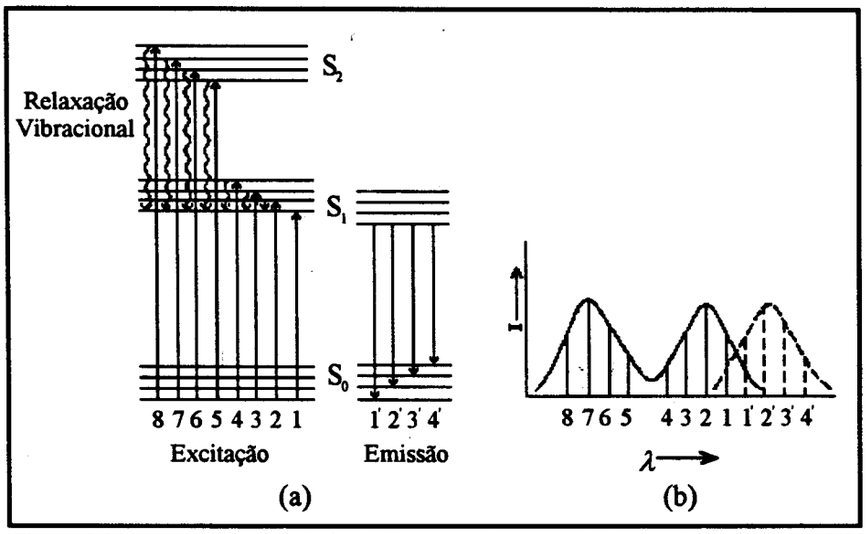


Figura 3.2 - A excitação e a emissão de fluorescência. a) Níveis de energia. b) Espectros [4].

3.3 - Medidas de fluorescência

3.3.1 - Espectro de emissão e excitação da fluorescência

O espectro de excitação é obtido quando a emissão é monitorada em um único comprimento de onda, enquanto a luz excitadora é variada. No caso de uma solução pura com uma única espécie de cromóforo, depois de apropriadas correções, a forma deste espectro seria eqüivalente à forma do espectro de absorção. Porém, se a energia potencial do estado excitado, relativa ao estado fundamental, for alterada por modificações químicas da molécula ou por perturbação do solvente, estes espectros não serão mais similares. Isto ocorre porque, se de algum modo as moléculas excitadas forem

dissociadas antes que a conversão interna possa ocorrer, a fluorescência será influenciada, despopulando o estado excitado. O espectro de excitação representaria o rendimento quântico relativo em cada comprimento de onda de excitação [14].

O espectro de emissão é obtido quando a amostra é excitada em um único comprimento de onda e a intensidade da fluorescência é monitorada como função do comprimento de onda. Idealmente, o espectro de emissão registrado, representaria o fluxo de fótons emitidos em cada comprimento de onda, dentro de um determinado intervalo de comprimento de onda. Se existir apenas uma espécie de fluoróforo, a forma do espectro de emissão será independente da escolha do comprimento de excitação. Este espectro é particularmente interessante, pois é sensível às reações químicas ou perturbações dos solventes durante o tempo de vida do estado excitado.

3.3.2 - Rendimento quântico da fluorescência

Outro parâmetro de interesse na fluorescência é o rendimento quântico: "a fração dos singletos excitados que decaem por fluorescência". Este depende das taxas de vários processos de desexcitação, expressos pela eq. 3.1. Reunindo-se as constantes de velocidade dos fenômenos não radioativos da eq. 3.1 obtém-se:

$$\phi_F = \frac{k_F}{k_F + \sum_i k_i + \sum_j k_j [Q_j]} \qquad (3.2)$$

onde k_F é a constante de velocidade para a emissão da fluorescência, k_i são as constantes de velocidade para os processos não radioativos e k_j são as constantes de supressão pelas substâncias Q. Devido a estas várias formas de desexcitação, o rendimento quântico é sensível ao meio e aos grupos estruturais vizinhos ao cromóforo. Porém, medidas absolutas do rendimento quântico são difíceis. Um caminho alternativo é a medida do tempo de vida, pois o rendimento quântico também pode ser obtido por:

$$\phi_F = \frac{\tau}{\tau_0} \qquad (3.3)$$

IFSC — SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO

onde τ é o tempo de vida e τ_0 é o tempo de vida intrínseco da molécula, isto é, na ausência de processos não radioativos.

3.3.3 - Tempo de vida da fluorescência

O tempo de vida do estado excitado é definido pelo tempo médio que a molécula permanece no estado excitado antes de retornar ao estado fundamental. Esta quantidade é um valor essencial na discussão da supressão e polarização da fluorescência. Os estudos do tempo de vida do estado excitado podem oferecer informações sobre reações intermoleculares tais como: formação de dímeros e "excimers", trânsferencia de energia e distâncias moleculares e difusão rotacional intermolecular. Na tabela 3.1 estão apresentados valores típicos das constantes de velocidades ($1/\tau_0$) e dos tempos de vida envolvidos nos processos relacionados às transições eletrônicas:

Tabela 3.1- Valores típicos de parâmetros fotofisicos de moléculas orgânicas [9].

Processo	cte de velocidade $k(s^{-1})$	τ_0 (s)
$S_2 \rightarrow S_1$	10^{11} - 10^{14}	10^{-14} - 10^{-11}
$S_1 \rightarrow S_0$	10^{5} - 10^{8}	10^{-8} - 10^{-5}
$S_1 \rightarrow T_1$	10^{7} - 10^{8}	10^{-8} - 10^{-7}
$T_1 \rightarrow S_0$	10^{-1} - 10^{4}	10^{-4} - 10

Como pode-se observar, enquanto o tempo requerido para absorver um fóton ultravioleta é de aproximadamente 10^{-15}s, o tempo de relaxação para moléculas em solventes orgânicos comuns é de aproximadamente 10^{-11}s, enquanto na fosforescência encontram-se tempos de vida mais longos, os quais variam desde 10^{-7}s até valores na faixa de 10^{-3}s. Por envolver transições de multiplicidades distintas, a emissão de fluorescência, como em um processo de decaimento, é de primeira ordem e pode ser descrita por uma função exponencial:

$$A^* = A_0 e^{-t/\tau_0} \qquad (3.4)$$

Quando t = τ_0: $\frac{A^*}{A_0} = e^{-1}$, portanto $A^* = \frac{A_0}{e}$, onde A_0 é o número de moléculas excitadas no instante que a luz excitadora é desligada e A^* é o número de moléculas que permanecem excitadas em um instante t, após a luz excitadora ser desligada. Este tempo t no qual A^* decaiu de 1/e de A_0 é definido como o tempo de vida da fluorescência τ_0.

3.4 - Sensibilidade da fluorescência ao meio ambiente

Por ser uma técnica mais sensível ao meio ambiente em que se encontra o cromóforo do que a absorção, a fluorescência é mais eficaz para acompanhar mudanças conformacionais e interações com ligantes [4]. Esta sensibilidade deve-se ao longo tempo que uma molécula permanece no estado excitado. Nesta escala de tempo, a molécula e o meio ambiente não serão estáticos, poderão ocorrer vários processos, alterando a natureza química ou a coordenada de ligação, afetando-se assim as características da emissão, enquanto que na absorção, devido ao seu tempo de vida, a molécula e o meio são estáticos.

Algumas moléculas fluorescentes têm uma propriedade muito conveniente: em solução aquosa sua fluorescência é fortemente suprimida, mas em um meio rígido ou não polar um grande aumento é observado. Se um marcador for ligado a um sítio rígido ou não polar de uma proteína, o espectro de fluorescência será dominado pela espécie ligada, como é o caso do brometo de etídeo, mostrado na figura 3.3, muito utilizado para marcar ácidos nucleícos.

Outro efeito ambiental é a acessibilidade de um cromóforo fluorescente à supressão colisional por solutos moleculares. O oxigênio está em um estado tripleto fundamental e ao colidir-se com alguma molécula no estado singleto excitado promove o cruzamento entre sistemas, aumentando a velocidade de conversão singleto-tripleto, suprimindo a fluorescência.

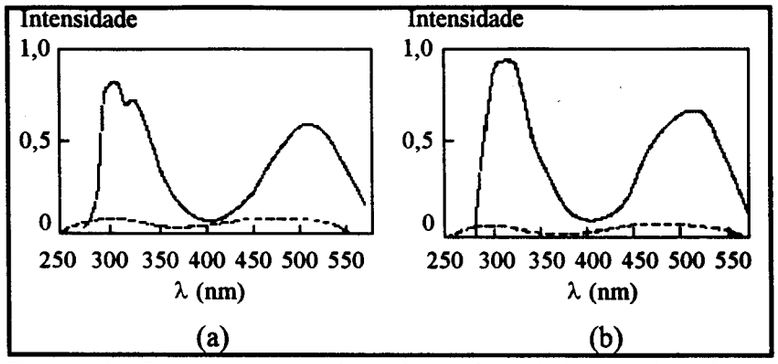


Figura 3.3 - Espectros de excitação da fluorescência do brometo de etídeo em solução aquosa (linha tracejada) ou ligado (linha sólida), nas seguintes formas: a) DNA ou b) RNA [4].

Átomos pesados, como íons de iodeto e césio, têm um efeito similar, porém por mecanismos diferentes. Um cromóforo livre em solução aquosa é bastante sensível a tal supressão, porém quando incorporado a uma macromolécula, ele deverá ser protegido pela mesma, diminuindo a eficácia da supressão. As medidas de fluorescência em função da concentração do supressor permitem distinguir os resíduos que estão na superfície daqueles mais internos.

3.5 - Supressão da fluorescência

Supressão da fluorescência é qualquer processo que diminui a fluorescência de uma dada substância. Alguns processos que podem resultar em uma supressão são: reações de estado excitado, transferência de energia, formação de complexos e supressão colisional [14].

Denomina-se supressão colisional ou dinâmica aquela que é devido às colisões entre fluoróforos e supressores, e a supressão estática é aquela devido à formação de complexos.

A supressão da fluorescência tem sido utilizada como uma ferramenta em aplicações a problemas bioquímicos, principalmente pela característica de ser necessário um contato entre o fluoróforo e o supressor, fornecendo assim informações sobre o

fluoróforo. No caso da supressão estática um complexo não fluorescente é formado entre o fluoróforo e o supressor. Na supressão colisional o supressor deverá aproximar-se do fluoróforo durante o tempo de vida do estado excitado. Então, com o contato, o fluoróforo retorna ao estado fundamental sem a emissão de um fóton. Seja qual for o tipo de supressão o fluoróforo e o supressor devem estar em contato. Desta característica decorrem as várias aplicações da supressão como, por exemplo, mostrar a acessibilidade dos fluoróforos ao supressores, ou ainda revelar as velocidades de difusão dos supressores. Além disso, considerando um fluoróforo em uma proteína, se a proteína for impermeável ao supressor e o fluoróforo estiver em seu interior, nenhum tipo de supressão ocorrerá. Deste modo, estudos de supressão podem ser utilizados para revelar a localização dos fluoróforos em proteínas ou membranas e sua permeabilidade ao supressor.

3.5.1 - Supressão colisional

A supressão colisional é descrita pela equação de Stern-Volmer:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + k_D [Q] \qquad (3.6)$$

onde, F_0 e F são as intensidades de fluorescência na ausência e na presença do supressor, respectivamente, k_q a constante de supressão bimolecular, τ_0 é o tempo de vida do fluoróforo na ausência do supressor, $[Q]$ é a concentração do supressor e k_D é a constante de supressão de Stern-Volmer. Os dados de supressão são freqüentemente representados como um gráfico de F_0/F contra $[Q]$, e espera-se uma dependência linear destas quantidades. O eixo y será interceptado em 1 com uma inclinação igual a k_D e quando tivermos uma concentração do supressor igual a $1/k_D$ teremos $F_0/F = 2$, isto é, 50% da intensidade será suprimida. Um gráfico linear de Stern-Volmer indica, geralmente, uma única classe de fluoróforos ou igual acessibilidade ao supressor para todos os fluoróforos. Se existir mais de uma classe de fluoróforos com acessibilidades ao

supressor distintas, o gráfico de Stern-Volmer não será mais linear. Isto ocorre com a supressão da fluorescência de triptofanos em proteínas, por supressores polares. Estes supressores não penetram na região apolar das proteínas, e apenas os resíduos de triptofano em contato com o solvente têm sua fluorescência suprimida. Porém, é importante observar que um gráfico linear de Stern-Volmer não prova a ocorrência da supressão colisional, pois a supressão estática também fornece um gráfico linear de Stern-Volmer. A distinção entre estas duas formas de supressão pode ser feita através de sua dependência com a temperatura e viscosidade ou por medidas de tempo de vida.

3.5.2 - Supressão estática

Esta supressão resulta da formação de um complexo não fluorescente entre o fluoróforo e o supressor. Quando este complexo absorve luz, ele volta ao estado fundamental sem emitir fótons.

Através da constante de associação da formação do complexo, podemos relacionar a intensidade de fluorescência com a concentração do supressor. Esta constante é dada por:

$$k_s = \frac{[F-Q]}{[F][Q]} \qquad (3.7)$$

onde $[F\text{-}Q]$ é a concentração do complexo, $[F]$ e $[Q]$ são, respectivamente, as concentrações do fluoróforo e do supressor livres. Se o complexo não fluoresce, então a fração de fluorescência que permanece (F_0/F) é dada pela fração dos fluoróforos que permanecem livres ($\mathbf{f} = F/F_0$). A concentração total dos fluoróforos $[F_0]$ é dada por:

$$[F_0] = [F] + [F-Q] \qquad (3.8)$$

substituindo na equação (3.8), obtém-se:

$$k_s = \frac{[F_0]-F}{[F][Q]} = \frac{[F_0]}{[F][Q]} - \frac{1}{[Q]} \qquad (3.9)$$

IFSC — SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO

Pode-se substituir a razão de concentração de fluoróforos ($[F_0]/F$) pela razão entre as intensidades de fluorescência (F_0/F), pois são equivalentes e, assim, obtém-se:

$$k_s = \frac{F_0}{F[Q]} - \frac{1}{[Q]} = \frac{1}{[Q]}\left(\frac{F_0}{F} - 1\right) \qquad (3.10)$$

Note que a dependência de F_0/F sobre $[Q]$ é idêntica à observada na supressão dinâmica, com a diferença que a constante de supressão é agora uma constante de associação. Os dados de supressão de [illegible]escência podem ser explicados por processos colisionais ou estáticos, a não ser que informações adicionais sejam proporcionadas.

3.5.3 - Comparação entre supressão dinâmica e estática

As medidas de tempo de vida ou a dependência da supressão com a temperatura e a viscosidade podem ser usadas para distinguir a supressão estática da dinâmica. A medida de tempo de vida é a melhor maneira para esta distinção. A supressão estática, pela formação de complexos, subtrai alguns fluoróforos de observação. Assim, observa-se a fluorescência apenas dos fluoróforos livres. A fração livre não é perturbada e, sendo assim, o tempo de vida é τ_0. Portanto, para a supressão estática $\tau/\tau_0 = 1$ e na supressão dinâmica $\tau/\tau_0 = F_0/F$.

A supressão dinâmica depende da difusão e um aumento da temperatura resulta no aumento do coeficiente de difusão. Logo, espera-se um aumento na constante de supressão bimolecular. Pelo contrário, um aumento de temperatura desestabiliza os complexos provocando um decréscimo das constantes de supressão estáticas.

Outro método para a distinção é a observação dos espectros de absorção do fluoróforo. Como a supressão colisional só afeta os estados excitados, ela não produz mudanças no espectro de absorção. Ao contrário, a supressão estática por formar complexos no estado fundamental dá origem a mudanças no espectro de absorção.

3.5.4 - Transferência de energia

O processo de transferência de energia, do estado excitado de um doador (D) para um aceitador (A), também implica em supressão da fluorescência. Esta transferência é resultante da interação dipolo-dipolo entre o doador e o aceitador. A taxa de transferência de energia depende dos seguintes fatores:

- superposição dos espectros de emissão do doador e de absorção do aceitador;
- orientação relativa do doador e aceitador;
- distância entre as moléculas que pode ser medida a partir da transferência de energia. Tais medidas podem ser feitas somente se doador e aceitador forem separados por uma distância, e que esta permaneça fixa durante o tempo de vida do estado excitado do doador.

Considere um doador e um aceitador separados por uma distância fixa R. A teoria de Theodore Förster estabelece que, a taxa de transferência de energia é dada por:

$$k_T = \left(\frac{1}{\tau_D}\right)\left(\frac{R_0}{R}\right)^{-6} \qquad (3.11)$$

onde, τ_D é o tempo de vida do doador, na ausência do aceitador, e R_0 é a distância de Förster, dada pela equação (3.12):

$$R_0 = 9{,}7x10^3\left(Jk^2n^{-4}\phi_D\right)^{1/6} cm \qquad (3.12)$$

onde, $J = \int \varepsilon_A(\nu) f_D(\nu)\, \nu^{-4} d\nu$ é a superposição entre as bandas de emissão do doador e de absorção do aceitador, f_D é a fluorescência normalizada do doador, n é o índice de refração do meio que separa o doador do aceitador, k^2 é um fator geométrico complexo que depende da orientação relativa do doador para o aceitador, ϕ_D é o rendimento quântico do doador na ausência do aceitador e $\varepsilon_{A(\lambda)}$ é o coeficiente de extinção do aceitador, no comprimento de onda de excitação.

Um parâmetro que é medido freqüentemente é a eficiência de transferência de energia (E). Este parâmetro é a fração de doadores excitados que são desexcitados pela transferência de energia para os aceitadores, que será determinado pela equação (3.13)

$$E = \frac{k_T}{\tau_D^{-1} + k_T} \qquad (3.13)$$

Substituindo (3.11) em (3.13) tem-se :

$$E = \frac{R^6}{R_0^6 + R^6} \qquad (3.14)$$

Portanto, a eficiência de transferência de energia pode ser diretamente relacionada com as distâncias entre um doador e um aceitador.

3.6 - Fluorescência de proteínas

A grande maioria das proteínas possuem fluoróforos intrínsecos daí o grande número de dados existentes em fluorescência de proteínas. Proteínas contém três resíduos de aminoácidos que contribuem para sua fluorescência no ultravioleta: tirosina (Tyr), triptofano (Trp) e fenilalanina (Phe). A fluorescência das proteínas é dominada pelos resíduos de triptofano, o indol desses resíduos de aminoácidos é um fluoróforo muito sensível e complexo. O indol, o triptofano e seus derivados são muito sensíveis à polaridade do solvente e sentem seus efeitos gerais e específicos. Portanto, o espectro de emissão dos resíduos de triptofano reflete a polaridade de seu meio ambiente. O espectro de emissão de proteínas é sensível à ligação de substratos, reações de asssociação e à desnaturação. O triptofano é muito sensível à supressão por várias substâncias: iodetos, acrilamida, peróxido de hidrogênio, dicloroacetamida, Cs^{2+}, Cu^{2+}, Pb^{2+}, Cd^{2+}, Mn^{2+}, NO^{3-}, IO^{3-}. Esta sensibilidade vem do fato do indol poder doar elétrons enquanto permanecer no estado excitado. Pode-se determinar a acessibilidade dos resíduos de triptofano nas proteínas por medidas de supressão. A maior vantagem do uso da fluorescência intrínseca da proteína não é a de apenas se evitar alguma modificação química, mas também o risco de uma perturbação estrutural decorrente dessa modificação. Porém, existe uma desvantagem, pois a maioria das proteínas contém mais que um resíduo de triptofano ou tirosina e, desde que cada resíduo tem seu meio ambiente, as propriedades espectrais de cada um serão diferentes. O espectro de emissão

seria uma sobreposição da emissão de cada resíduo. Portanto, torna-se uma tarefa difícil separar a contribuição espectral de cada triptofano [14].

Para contornar estes problemas, podem ser feitas algumas modificações químicas a fim de eliminar a fluorescência de alguns resíduos ou, se a estrutura terciária da proteína for conhecida, resíduos específicos podem ser envolvidos por sua proximidade aos sítios ligantes.

3.6.1 -Propriedades espectrais dos aminoácidos aromáticos

O espectro de absorção dos aminoácidos que contribuem para a fluorescência das proteínas são mostrados na figura 3.4. A tabela 3.2 fornece alguns de seus parâmetros espectroscópicos. A fluorescência da proteína é geralmente medida excitando-se no máximo da absorção, próximo de 280 nm, ou em comprimentos de onda maiores. Como consequência, a fenilalanina não é excitada e, além disso, por apresentar um rendimento quântico menor sua emissão é raramente observada.

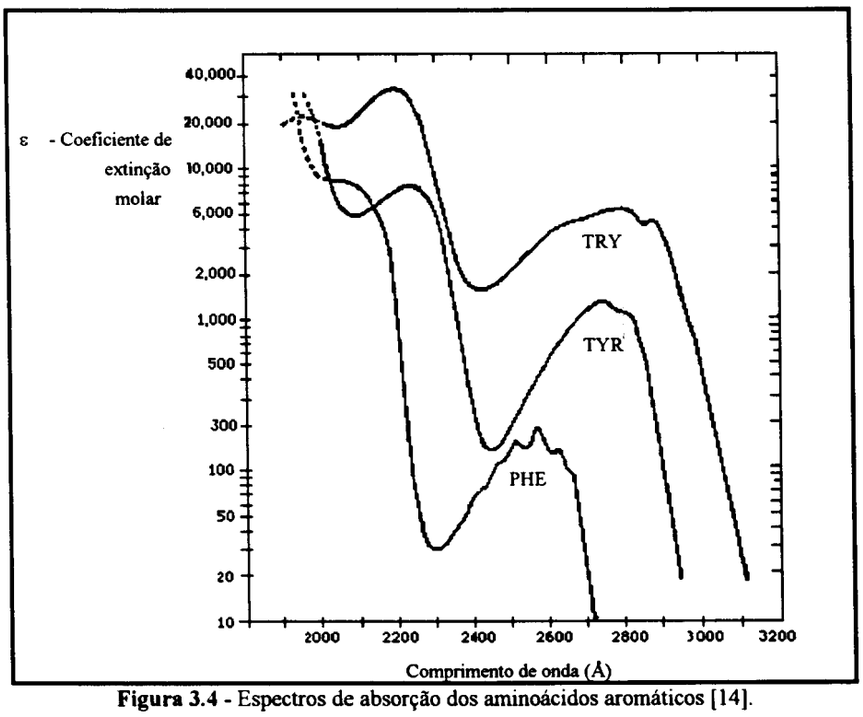


Figura 3.4 - Espectros de absorção dos aminoácidos aromáticos [14].

A absorção em proteínas em 280 nm é, portanto, devida aos resíduos de triptofano e tirosina. Em comprimentos de onda maiores que 295 nm, a absorção é devida principalmente ao triptofano, de modo que o triptofano pode ser excitado seletivamente (295 - 305 nm).

Tabela 3.2. Propriedades espectroscópicas dos aminoácidos aromáticos [33].

aminoácidos	λ_{max} (nm)	ε ($M^{-1}cm^{-1}$)	ϕ_F	$\lambda_{emissão}$ (nm)
fenilalanina	258	193	0,06	282
tirosina	275	1045	0,14	304
triptofano	275 290	5580 3935	0,14	348

onde, ε é o coeficiente de extinção molar e ϕ_F é o rendimento quântico.

Os espectros de emissão destes aminoácidos aromáticos estão apresentados na figura 3.5. A emissão máxima do triptofano, em água, ocorre em 348 nm e é altamente dependente da polaridade. A emissão máxima da tirosina, em água, ocorre em 303 nm e é relativamente insensível a polaridade do solvente. Finalmente, a emissão máxima da fenilalanina, em água, ocorre em 282 nm.

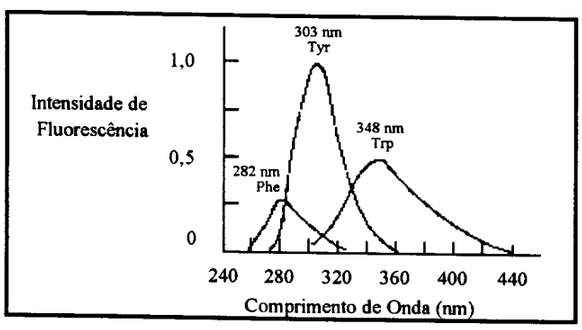


Figura 3.5 - Os espectros de emissão de fluorescência dos aminoácidos aromáticos [14].

A figura 3.6 ilustra que em comprimentos de onda de excitação maiores que 280 nm, a emissão de fluorescência é devida aos resíduos de triptofano. Ela mostra o espectro de emissão da soro albumina humana (HSA-human serum albumin), do triptofano e de uma mistura de tirosina e triptofano na razão molar 18:1, respectivamente. Devido à proteção do triptofano pela proteína em relação a água, a

emissão do triptofano da HSA ocorre em comprimentos de onda menores. Embora exista um número maior de resíduos de tirosina do que de triptofano na HSA (18:1), a emissão da HSA é predominantemente devida ao triptofano. Ao contrário, no espectro da mistura, a emissão da tirosina é predominante. Apesar de seu alto rendimento quântico e sua alta absorção em 280 nm, a emissão da tirosina em proteínas é muito pequena e quase sempre não detectável.

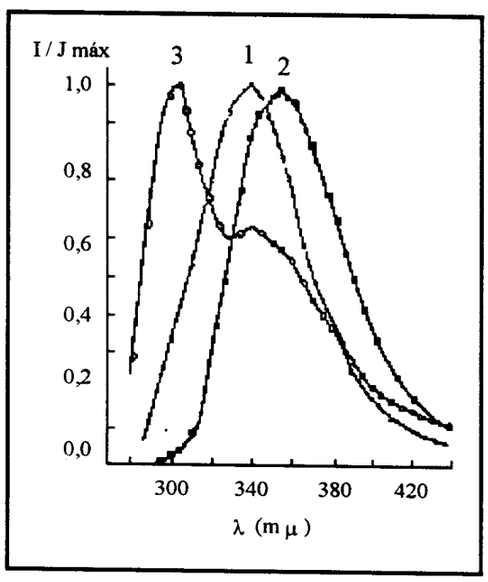


Figura 3.6 - Os espectros da emissão de fluorescência da albumina humana e de aminoácidos aromáticos. São mostrados os espectros de emissão da HSA (1), triptofano (2) e uma mistura de tirosina e triptofano em proporções iguais as encontradas na HSA [14].

Uma das possíveis causas para este fenômeno seria a transferência de energia interna para os resíduos de triptofano, a qual é eficiente desde que a distância de Förster para a transferência entre triptofano e tirosina seja, aproximadamente, de 14 Å, uma distância comparável ao diâmetro de muitas proteínas. Porém, quando se destroem os triptofanos da HSA por foto-oxidação, isto é, destroem-se os aceitadores, não é observado um aumento da emissão da tirosina [14]. Isto indica que a transferência de energia não é a única causa da supressão da fluorescência da tirosina.

Outra razão possível seria a supressão por grupos próximos na própria cadeia peptídica (grupos carboxílicos carregados ou grupos aminos não carregados). A supressão seria devida à transferência de um próton para os aceitadores, durante o tempo de vida do estado excitado. Além disso, a fluorescência da tirosina é também suprimida

por grupos aminos carregados e por grupos carboxilatos neutros. O mecanismo envolve transferência de prótons do fenol no estado fundamental ou excitado. E, adicionalmente, a formação de ligações peptídicas com grupos carboxílicos ou aminos da tirosina diminuem seu rendimento quântico. Em proteínas, o grupo hidroxila poderia estar ligado aos hidrogênios das ligações peptídicas e tais hidrogênios, ligados a fenóis, não são fluorescentes [14].

3.6.2 - Fatores que influenciam o espectro de emissão de proteínas

3.6.2.1 - Estrutura tridimensional

Devido à sensibilidade do triptofano e seus derivados à polaridade do solvente, e às interações específicas entre o solvente e o indol, a emissão máxima de fluorescência de uma proteína depende de fatores que afetam a exposição dos resíduos de triptofano ao solvente. Por exemplo, o máximo do espectro de emissão da albumina deslocado para o azul (343 nm) quando comparado com o espectro do triptofano em água, é devido à blindagem do triptofano ao solvente. Um outro exemplo é o máximo da emissão do glucagon em 352 nm, sendo este um peptídeo pequeno não se observa o efeito protetor permitindo o contato do triptofano com o solvente [14].

A desnaturação de proteínas, por hidrocloreto de guanidina ou uréia, resulta em deslocamento do máximo de emissão das proteínas para o vermelho, sendo o comprimento de onda, da emissão máxima, aproximadamente igual para todas as proteínas. A monelina será agora utilizada para ilustrar os efeitos de desnaturação no espectro de emissão das proteínas. Esta proteína tem peso molecular de 11.000 daltons, é composta por duas subunidades, um resíduo de triptofano e sete de tirosinas. As figuras 3.7 e 3.8 mostram os espectros da emissão de fluorescência da monelina nativa e desnaturada, respectivamente. O espectro da monelina nativa foram obtidos excitando-se

em 260 e 295 nm. Com excitação em 260 nm, nota-se uma banda de pouco intensa em 300 nm, caracterizada por um pequeno ombro, a qual é típica de resíduos de tirosina em proteínas. Quando o comprimento de onda de excitação é 295 nm, observa-se a emissão somente de resíduos de triptofano.

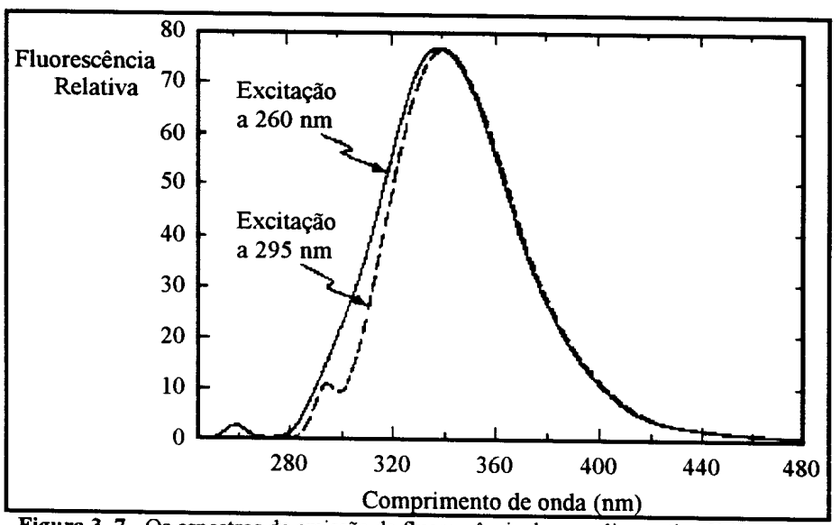


Figura 3. 7 - Os espectros de emissão da fluorescência da monelina nativa [14]

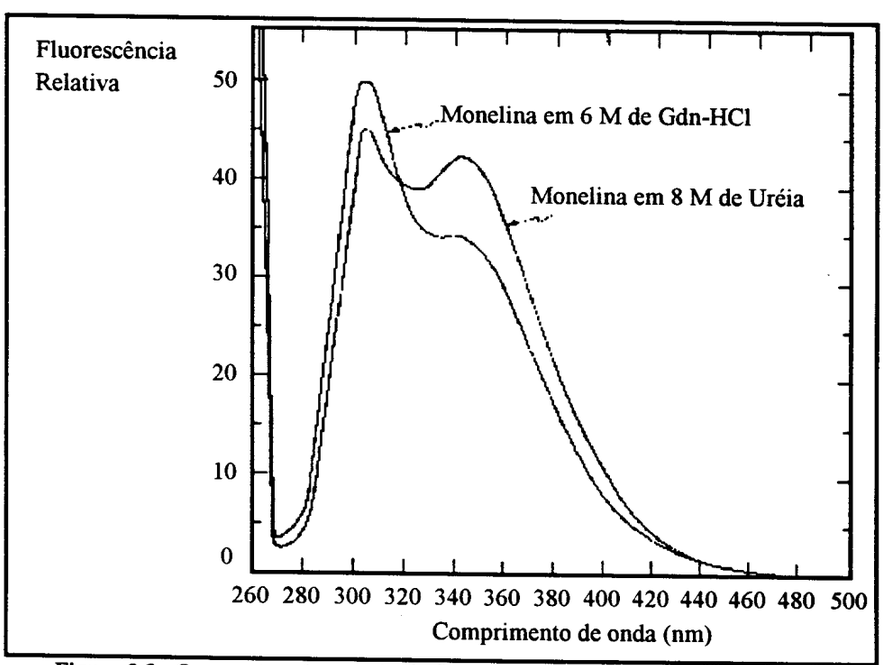


Figura 3.8 - Os espectros de emissão da fluorescência da monelina desnaturada [14]

IFSC — SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO

Por outro lado, quando a monelina é desnaturada por GdnHCl ou Uréia (figura 3.8), observa-se um aumento da contribuição da tirosina no espectro de emissão. Os máximos de emissão da tirosina e do triptofano praticamente não variam com a concentração de guanidina. Porém, como os espectros se interceptam, estes máximos não necessariamente representam os máximos reais dos resíduos de tirosina e triptofanos.

3.6.2.2 - Associação de proteínas com substratos e outras macromoléculas

Em muitos casos, a associação de proteínas com substratos resulta em deslocamentos de seus espectros de emissão. Estes deslocamentos originam-se da blindagem dos resíduos de triptofano, que estão no sítio ativo, que restringe o contato destes resíduos com o solvente.

Outros fatores, além de substratos, podem causar mudanças nas propriedades espectrais do triptofano, como a agregação entre moléculas de proteínas ou peptídeos e a associação de proteínas com membranas. Seja qual for o fator, a sensibilidade dos resíduos de triptofano à polaridade do meio ambiente ou ao tamanho da molécula, proporciona um bom parâmetro para quantificação da associação entre proteínas e macromoléculas.

Capítulo 4 - Material e métodos

4.1 - Material

4.1.1 - Reagentes, drogas e materiais utilizados

Os reagentes químicos utilizados durante a purificação de KM+ foram todos de grau P.A. A água utilizada na preparação dos reagentes foi a destilada e/ou desionizada (Milli-Q). As resinas de Sepharose D-Galactose (Selectin 16) e Sepharose D-Manose foram da Pierce Chemical Co. (Rockford, Illinois, USA). Coluna Superdex-75 (Pharmacia, 1,6cm/60cm, pressão máxima de 3 bar). A ultrafiltração foi realizada com membrana YM10 (pressão máxima de 6,7 atm) e a centrífugo-filtração foi realizada com Centricon 10 (Amicon Corp, rpm 6000). Cubetas de quartzo retangulares (1,0 e 3,0 ml) com caminho óptico de 1 cm e cílindricas (0,5 ml) com caminho óptico de 1 mm.

4.1.2 -Equipamentos

- espectrofotômetro Hitachi (mod. U-2000)
- espectrofluorímetro Jasco (mod. FP-777)
- espectropolarímetro Jasco (mod. J-720)
- centrífuga refrigerada Sorvall (mod. RC-5B)
- pH-metro Micronal (mod. B-374)

4.1.3. - Soluções tampões

- Tampão sódio fosfato (PBS) pH 7,4:
  Cloreto de sódio..... 0,15 M
  Fosfato de sódio bibásico ..... 0,06 M

Os pH's foram ajustados com fosfato de sódio monobásico 0.15 M.

- Acetato de amônio 0,01 M, pH 4,0-6,0, contendo cloreto de sódio 0,15 M.

  Os pH's foram ajustados com ácido acético.

- Tris 0,01 M, pH 7,0-9,0, contendo cloreto de sódio 0,15 M.

  Os pH's foram ajustados com HCl concentrado.

- CAPS 0,01M, pH 9,0-10,5, contendo cloreto de sódio 0,15 M.

  Os pH's foram ajustados com NaOH 1 M.

- Tampão acetato-fosfato-borato, pH 4,0-12,0
  Acetato de sódio..... 0,02 M
  Fosfato ..... 0,02 M
  Borato ..... 0,02 M

  Os pH's foram ajustados com NaOH ou HCl 1M.

4.2 - Métodos

4.2.1 -Purificação da lectina

4.2.1.1 - Obtenção do extrato bruto

O extrato bruto da *Artocarpus integrifolia* foi preparado como descrito por Bunn-Moreno & Campos-Neto [3]. Resumidamente, sementes secas eram trituradas e suspensas em 10 mM de PBS, por 24h a 4°C. A suspensão foi centrifugada a 2000 g, por 20 min, a 40°C. O sobrenadante foi dialisado contra PBS por 24h, a 4°C. O extrato foi armazenado a -20°C.

4.2.1.2 - Procedimentos cromatográficos

a) Cromatografia de afinidade em Sepharose D-Galactose

Uma coluna, contendo 15 ml de Sepharose D-Galactose, foi equilibrada com 80 ml de PBS. Amostras num volume de 10 ml de extrato bruto, contendo 8mg/ml de proteína determinada pelo método de Lowry *et. al.* [17], previamente centrifugadas, foram aplicadas na coluna e eluídas com 40 ml de PBS. A fração não retida foi denominada K. A coluna foi lavada com 50 ml de PBS e, em seguida, eluída com 30 ml de D-Galactose 0,4M; esta fração foi denominada J e contém a jacalina [27]. A fração K foi recromatografada nas mesmas condições. Após 5 recromatografias as frações K foram reunidas e concentradas/dialisadas por ultrafiltração.

A monitoração do efluente da coluna foi realizada pela medida da absorbância em 220 (pico de absorbância da fração K) e/ou 280 nm (pico de absorbância da jacalina).

b) Cromatografia de afinidade em Sepharose D-Manose.

Uma coluna, contendo 10 ml de Sepharose D-Manose, foi equilibrada com 80 ml de PBS. A fração K, obtida como descrito acima, foi aplicada na coluna e eluída com 40 ml de PBS. A coluna foi lavada com 50 ml de PBS. O material D-Manose ligante foi eluído com 30 ml de D-Manose 0,1 M e frações de 2 ml foram coletadas. O "pool", denominado KM+, foi concentrado/dialisado por ultrafiltração e o volume ajustado de modo a conter entre 10 e 20 mg/ml de proteína. As frações assim purificadas foram estocadas a -20°C. Estas frações foram caracterizadas por eletroforese e análise de aminoácidos.

A observação do efluente da coluna foi realizada por medida de absorbância em 220 nm.

c) Filtração em Superdex 75

A coluna foi equilibrada com PBS e a fração KM+ foi aplicada na coluna num volume de 3,0 ml e eluída num fluxo de 1,0 ml/min. O efluente foi monitorado pela absorbância em 280 nm. As frações eluídas no pico principal foram reunidas, concentradas/dialisadas por ultrafiltração e denominadas fKM+. Os volumes foram ajustados de modo que a concentração em proteínas ficasse entre 10 e 20 mg/ml. Em seguida fKM+ foi analisada por eletroforese e análise de aminoácidos.

4.2.2 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS - Page)

A eletroforese foi feita segundo o método de Laemmli [13], com gel de acrilamida a 15%. As amostras foram submetidas a eletroforese em condições desnaturantes (SDS) e redutoras (beta-mercaptoetanol), além de serem submetidas ou não a fervura.

4.2.3 - Determinação da composição em aminoácidos da KM+

A composição em aminoácidos foi determinada pela hidrólise de 10 nMol de proteína, em fase líquida, com HCl 6N por 22h a 110°C, exceto para o triptofano, para o qual foi utilizada a hidrólise com LiOH 6N por 24h, seguida em ambos os casos por cromatografia de troca iônica em analisador automatizado de aminoácidos.

4.2.4 -Medidas fluorimétricas

Os espectros foram registrados de 290 a 450 nm com excitação das amostras em 280 nm. As cubetas utilizadas tinham 1 cm de caminho óptico, em volumes de 1,0 ou 3,0 ml. As concentrações das amostras eram ajustadas de modo a fornecerem D.O. entre 0,6 e 0,8. As amostras continham entre $1,7 \times 10^{-5}$ a $4,2 \times 10^{-5}$M de proteína. O espalhamento Raman foi subtraído usando-se os espectros dos solventes.

Foram variados os seguintes parâmetros: pH, temperatura e concentrações de D-Manose, SDS (duodecil sulfato de sódio), GdnHCl (cloreto de guanidina), acrilamida e iodeto de potássio.

O pH foi variado de 2,0 a 12,0.

Nas medidas que envolviam variação de concentração foram adicionadas a uma mesma amostra pequenas alíquotas de alguma das substâncias acima mencionadas e quando necessário foram feitas correções no volume. As variações foram feitas nos seguintes intervalos:

SDS .....0 - 52 mM em PBS pH 7,2
D-manose.....0 - 25 μM em PBS pH 7,2
acrilamida.....0 - 112 mM em PBS pH 7,2 e acetato de amônio pH 4,0
iodeto de potássio ...0 - 112 mM em PBS pH 7,2 e acetato de amônio pH 4,0
cloreto de guanidina 0 - 3,5 M em PBS pH 7,2.

4.2.5 - Medidas de dicroísmo circular

As medidas foram feitas em um espectropolarímetro num intervalo de 185 a 260 nm. As amostras continham de 0,12 a 0,18 mg/ml em proteína e utilizou-se uma cubeta cilíndrica de 0,1 cm. de caminho óptico.

Os parâmetros variados foram: pH, temperatura, força iônica, D-Manose, SDS e GdnHCl.

Variações de pH foram realizadas na faixa de 4,0-10,5; utilizando-se tampões descritos em 4.1.3.

Para a variação da temperatura, as amostras em água ou PBS, foram incubadas durante 15 min em cada temperatura e logo após o espectro foi registrado. A amostra foi submetida a uma variação de temperatura de 25 a 80 °C. Para a verificação da temperatura da amostra foi utilizado um termopar.

Pequenas alíquotas foram adicionadas a uma mesma amostra, e foram feitas correções de volume quando necessário. Os parâmetros, os intervalos e os solventes utilizados foram:

SDS .....0 - 10 mM em água
D-Manose ..... 0 - 25 μM em água
GndHCl.....0 - 3,5 M em água

As estimativas da estrutura secundária foram feitas empregando-se os seguintes programas:

a) Protein Secondary Structure Estimation (SSE) fornecido por Japan Spectroscopic Co., Ltd., originalmente desenvolvido para o espectropolarímetro mod. J-600. Os arquivos gerados pelo espectropolarímetro mod. J-720 necessitaram de algumas modificações para serem utilizados no programa SSE. Além disso em nosso laboratório foram adicionadas 15 proteínas no grupo de referência a aquelas cinco proteínas já existentes. O programa SSE utiliza para construção da base os dados cristalográficos de estrutura secundária de no mínimo 4 e no máximo 15 proteínas, utilizando o método de Donald Wetlaufer [29]. Os valores de

comprimento de onda utilizados no SSE variam de 190 a 240 nm, com intervalo de 2 nm.

b) Convex Constraint Analysis (CCA) fornecido por Perczel *et. al.* [24]. Este programa utiliza para sua base os espectros de CD, de no máximo 25 proteínas. A desconvolução que fornece os espectros básicos é feita utilizando-se o algoritmo simplex. As estimativas das frações da estrutura secundária foram realizadas utilizando-se o programa Lincomb. O intervalo de comprimento de onda utilizado é de 195 a 240 nm, com intervalo de 1 nm.

IFSC — SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO

Capítulo 5 - Resultados e Discussões

5.1 - Purificação da lectina KM+

A purificação da KM+ por cromatografia de afinidade em Sepharose D-Galactose, Sepharose D-Manose e Superdex 75 HL, em grande escala, revelou-se um bom método para purificação da mesma com uma recuperação de aproximadamente 2% em relação ao conteúdo de proteína do extrato bruto, como descrito por Santos-Oliveira *et. al.* [28], para escala analítica. As amostras obtidas após as cromatografias de afinidade, em Sepharose D-manose (KM+) e Superdex 75 (fKM+), foram analisadas por eletroforese em SDS-PAGE e sob condições redutoras. Ambas apresentaram uma banda larga na faixa de P.M. entre 55-76 kDa. Entretanto, quando as amostras foram submetidas à fervura por 3 minutos, antes de serem aplicadas no gel, foi observada apenas uma banda com P.M. estimado por volta de 13 kDa. As amostras (KM+ e fKM+) também foram analisadas quanto ao conteúdo em aminoácidos e os resultados apresentados na tabela 5.1, referentes à fração KM+, são semelhantes aos descritos na referência 28, que expressam o conteúdo em aminoácidos da fração fKM+. Os valores obtidos para os resíduos mostrados na tabela 5.1, praticamente integrais, indicam homogeneidade. A lectina KM+ possui 38% de aminoácidos hidrofóbicos, 9% de prolina,1 resíduo de triptofano por monômero e 2% de carboidratos.

A atividade biológica das amostras, após a purificação e antes das medidas espectroscópicas, foram testadas por hemoaglutinação. As amostras KM+ e fKM+ foram previamente analisadas por espectroscopia de fluorescência e CD, e não foram observadas diferenças em seus espectros.

Tabela 5.1 Composição em aminoácidos de KM+.

Aminoácidos	Resíduos (mol/mol)
Triptofano	0,97 (1)
Lisina	4,84 (5)
Histidina	1,85 (2)
Arginina	4,10 (4)
Ácido Aspartico	12,00 (12)
Treonina	10,31 (10)
Serina	9,78 (10)
Ácido Glutâmico	9,78 (10)
Prolina	11,90 (12)
Glicina	18,90 (19)
Alanina	6,58 (7)
1/2 Cistina	< 0,2 (0)
Valina	4,94 (5)
Metionina	0,96 (1)
Isoleucina	5,69 (6)
Leucina	10,31 (10)
Tirosina	6,62 (7)
Fenilalanina	6,95 (7)

Os resultados estão expressos como mol de aminoácido/mol de monômero (13000 daltons) após hidrólise com HCl 6N por 22 h a 110°C, exceto para o triptofano, que foi determinado após hidrólise com hidróxido de lítio por 24h. O conteúdo de 1/2 cistina foi estimado baseado na sensibilidade do analisador e quantidade de hidrolisado nele aplicado. O peso molecular de 13193 daltons/monômero foi calculado com base nos valores integrais.

Com base nestas comparações, os resultados aqui apresentados foram todos obtidos com a amostra KM+ (eluída da resina de Sepharose D-manose).

A lectina KM+ foi analisada por CD e fluorescência, que são métodos utilizados para acompanhar mudanças conformacionais induzidas pela ação de agentes físicos, químicos, ligantes específicos e não específicos. Além de acompanhar mudanças conformacionais, os estudos de CD permitiram estimar o conteúdo de estrutura secundária.

5.2 - Estrutura secundária de KM+ estimada por CD

A figura 5.1 mostra o espectro de CD da KM+ em água (13×10^{-4}M). Este espectro é caracterizado por duas bandas negativas, com mínimos em 196 e 216 nm e por uma banda positiva em 187 nm. A banda, com mínimo em 196 nm, é uma das bandas características da estrutura desordenada. Por outro lado, o mínimo em 216 nm é o mínimo característico da estrutura folha pregueada β [5].

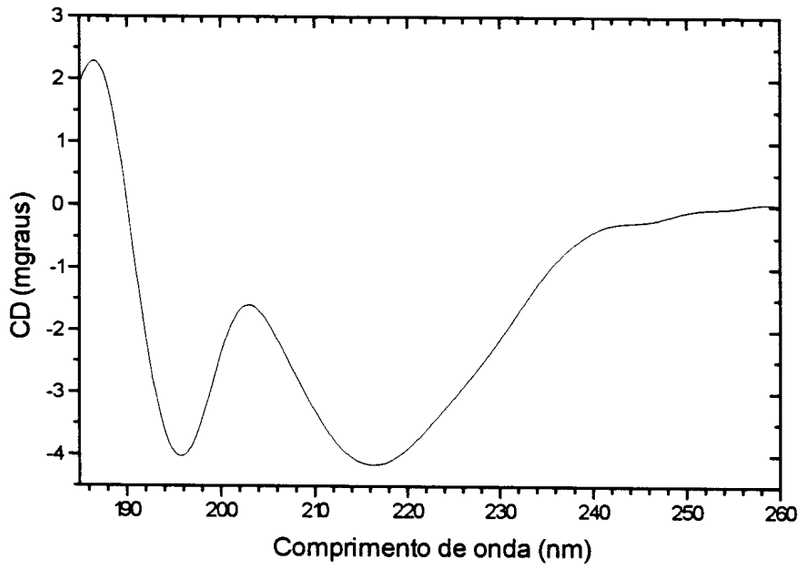


Figura 5.1 - O espectro de CD da KM+ nativa (13 x 10^{-4}), em água. O espectro foi registrado de 185 a 260 nm, com uma média de oito varreduras, em uma cubeta cilíndrica de 0,1 cm de caminho óptico, a uma temperatura de 25 °C. Os conteúdos de estrutura secundária calculados pelos programas: SSE - 0% de α-hélice; 41% de folha pregueada ß; 27% de volta ß; 32% de desordenada, com RMS de 12%. CCA - 1% de α-hélice; 35% de folha ß anti-paralela; 21% de volta ß e/ou folha ß paralela; 15% de contribuições de aromáticos e/ou dissulfetos; 28% de desordenada e/ou volta γ, com RMS de 1%.

O conteúdo de estrutura secundária da KM+, em água, calculado pelo programa SSE foi: 0% de α-hélice; 41% de folha pregueada ß; 26% de volta ß; 32% de desordenada. O conteúdo de estrutura secundária, calculado pelo programa CCA foi: 1% de α-hélice; 35% de folha ß anti-paralela; 21% de volta ß e/ou folha ß paralela; 15% de contribuições de aromáticos e/ou ligações dissulfetos; 28% de desordenada e/ou volta γ. As proteínas de referência, utilizadas para estes cálculos, estão indicadas nas legendas das figuras 5.3 e 5.4. Os RMS obtidos pelos programas SSE e CCA foram de 12% e 1%, respectivamente. Portanto, em água o RMS (desvio médio quadrático) obtido, quando emprega-se o programa CCA é 12 vezes menor que o RMS quando utiliza-se o programa SSE.

Porém, as funções biológicas da KM+ acontecem em meio fisiológico por isso foram realizados experimentos também em tampão PBS. A figura 5.2 mostra o espectro de CD da KM+ (9 x 10^{-4}M), em PBS pH 7,2. Este espectro apresenta uma banda negativa com um mínimo em 217 nm. Esta banda é uma das bandas características da

estrutura folha pregueada ß [5]. Não foi possível observar-se a banda correspondente a estrutura desordenada neste tampão, pois o PBS tem grande absorção para comprimentos de onda menores que 200 nm, o que causa considerável ruído abaixo deste comprimento de onda. O conteúdo de estrutura secundária da KM+, em PBS pH 7,2, calculado pelo programa SSE foi de 4% de α-hélice, 38% de folha pregueada ß, 25% de volta ß, 33% de desordenada. O conteúdo de estrutura secundária, calculado pelo programa CCA foi de 4% de α-hélice, 49% de folha ß anti-paralela, 14% de volta ß e/ou folha ß paralela, 15% de contribuições de aromáticos e/ou ligações dissulfeto, 18% de desordenada e/ou volta γ.

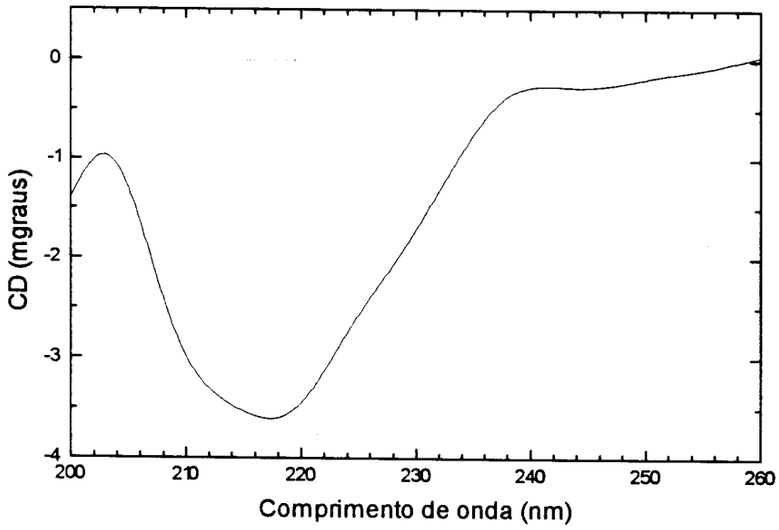


Figura 5.2 - Espectro de CD da KM+ nativa (9,0 x 10^{-4} M), em PBS, pH 7,2. O espectro foi registrado de 200 a 260 nm, com uma média de oito varreduras, em uma cubeta cilíndrica de 0,1 cm de caminho óptico, à temperatura de 25 °C. Os conteúdos de estrutura secundária, calculados pelos programas: SSE - 4% de α-hélice; 38% de folha pregueada ß; 25% de volta ß; 32% de desordenada. CCA - 4% de α-hélice; 49% de folha ß anti-paralela; 14% de volta ß e/ou folha ß paralela; 15% de contribuições de aromáticos e/ou ligações dissulfetos; 18% de desordenada e/ou volta γ. Os desvios médios quadráticos (RMS) para os programas SSE e CCA foram de 9% e 0,5%, respetivamente.

Os desvios médios quadráticos (RMS) obtidos pelos programas SSE e CCA foram de 9% e de 0,5%, respectivamente, o que equivale a um RMS para o CCA 18 vezes menor que para o SSE. Portanto, também em PBS o RMS quando emprega-se o programa SSE é maior que quando utiliza-se o programa CCA. Como ilustração são

mostradas as figuras 5.3 e 5.4. A figura 5.3 mostra as curvas observada e calculada de KM+ (painel A), em PBS, pelo programa SSE e a base construída pelo mesmo (painel B). A figura 5.4 (painel A) mostra a curva experimental e a calculada da KM+, em PBS, pelo programa CCA e no painel B são ilustradas os espectros das cinco componentes básicas calculados pelo mesmo programa. As proteínas utilizadas nos cálculos dos espectros básicos estão indicadas nas legendas das figuras 5.3 e 5.4.

Os dados de estrutura secundária de KM+ em água são mais confiaveis, pois nos dados em PBS existe a omissão de uma componente de estrutura secundária: a estrutura desordenada.

A julgar pelos valores dos RMS obtidos para os dois programas, observa-se um resultado mais aceitável para o programa CCA, indicando-o como mais adequado para a simulação desta lectina, ainda que a melhor simulação de um espectro de CD não seja prova completa para a melhor análise. Porém, como esta lectina não tem estrutura resolvida podemos comparar apenas os RMS das simulações entre os vários programas. Além disso, os demais programas mostram, geralmente, um bom coeficiente de correlação e RMS com os dados cristalográficos para proteínas com alto conteúdo de α-hélice, que apresentam valores altos de força rotária. Além da KM+ ser uma mistura de estrutura folha pregueada β e desordenada, e não possuir espectro semelhante ao das proteínas de referência, a base dos dados dos demais programas contém poucas estruturas predominantemente β ou desordenada, a não ser o programa CCA, no qual foram adicionados espectros de proteínas com estrutura predominantemente β, o que melhora a estimativa.

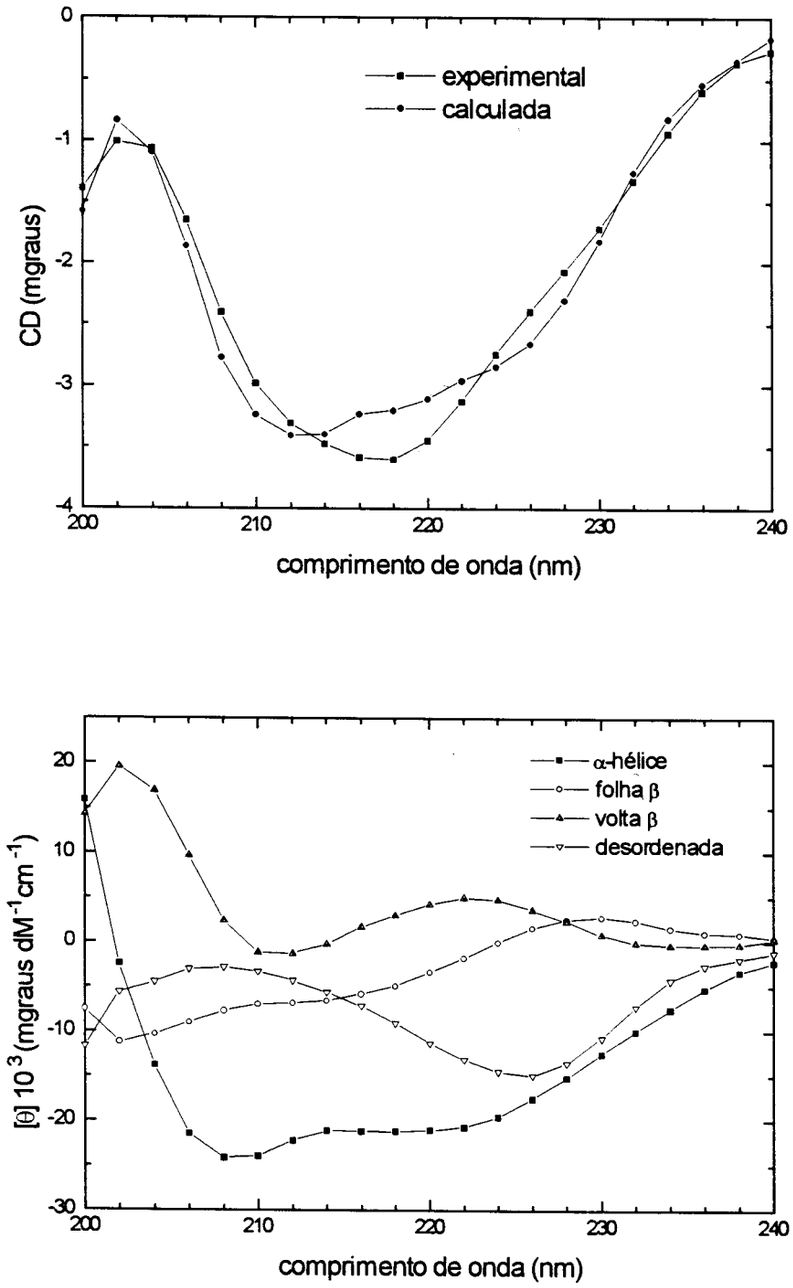


Figura 5.3 - Simulação do espectro de CD da KM+, em PBS, pelo programa SSE. A simulação foi feita de 190 a 240 nm em intervalos de 2 nm. Painel A: O espectro experimental e o calculado. Painel B: Os espectros básicos calculados pelo SSE utilizando 11 proteínas como referência: elastase, papaína, termolisina, ribonucleases A e S, inibidor tripsina, concanavalina A, lactato desidrogenase, carboxipeptidase A, citocromo C, parvalbumina.

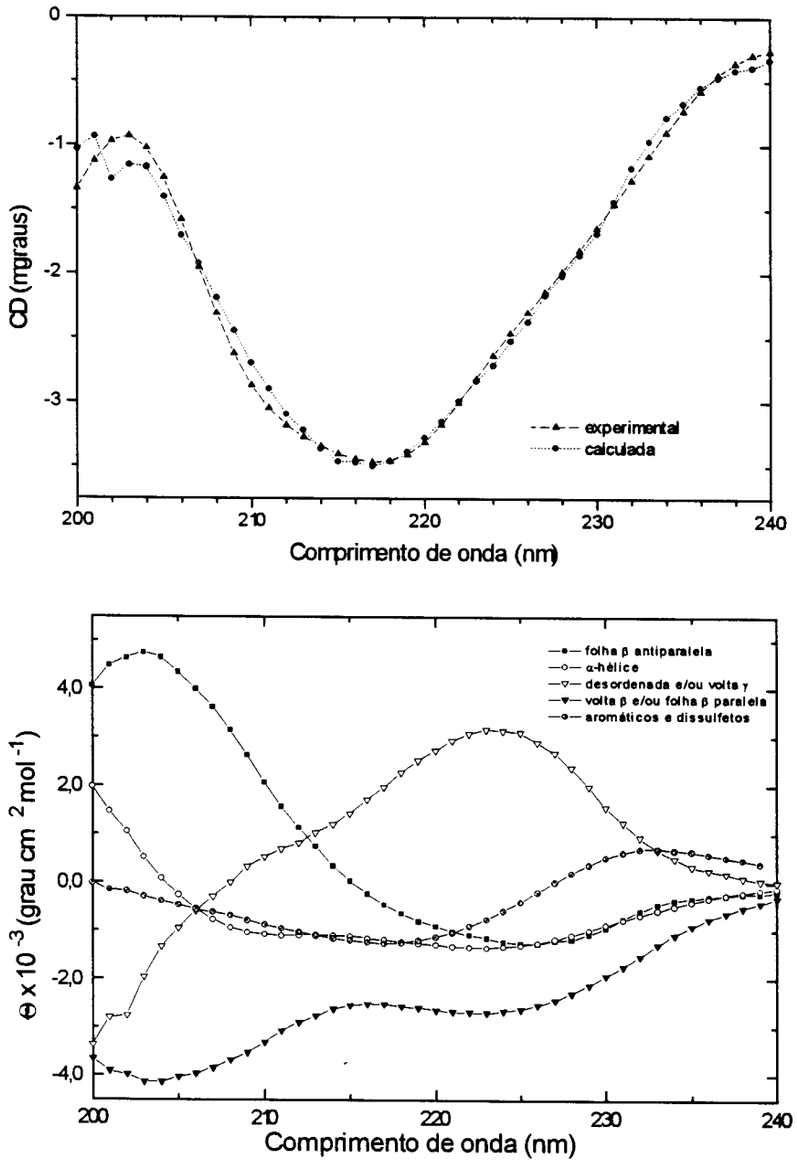


Figura 5.4 - Simulação do espectro de CD da KM+, em PBS e a base calculada pelo programa CCA. A: a curva experimental e a calculada da lectina KM+. A simulação foi realizada no intervalo de 200 a 240 nm, com intervalos de 1 nm. B: Os espectros puros calculados pelo programa CCA para a simulação do espectro de CD da proteína KM+. As 26 proteínas utilizadas para a desconvulação do espectro foram: mioglobina, parvalbumina ligante de cálcio, lisosima, adenilato kinase, insulina, lactato desidrogenase, citocromo C, carboxipeptidase, termolisina, subtilisina, papaína, inibidor tripsina, ribonucleases A e S, nuclease de estafilococos, α-quimotripsina, elastase, pepsinogêneo, γ - II cristalina, imunogobulina G de camundongo, proteína Che Y, concanavalina, ácido proteinase, imunoglobulina λ FAB e KM+.

5.3 - Alterações conformacionais induzidas por agentes químicos e físicos monitoradas por CD e Fluorescência

5.3.1 -A estabilidade conformacional da KM+ com a temperatura

CD foi utilizado para acompanhar mudanças conformacionais da KM+, em função da temperatura. Os espectros foram obtidos variando-se a temperatura da amostra de 25 a 80°C, em intervalos de 5 graus. A figura 5.5 mostra os espectros de CD da KM+ (9×10^{-4}M), em PBS, pH 7,2; em função da temperatura.

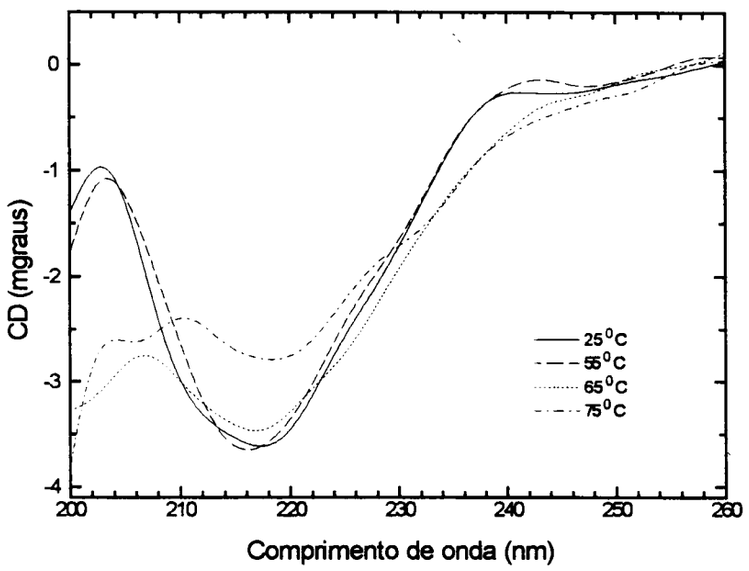


Figura 5.5 - Mudanças conformacionais da KM+, em PBS pH 7,2; em função da temperatura. Os espectros foram registrados de 200 a 260 nm, com uma média de quatro varreduras, em uma cubeta cilíndrica de 0,1 cm de caminho óptico, em banho térmico acoplado ao aparelho. A amostra continha $9,0 \times 10^{-4}$ M de proteína e foi incubada por 5 min em cada temperatura, após o equilíbrio térmico ser atingido.

As alterações dos espectros, indicando mudanças conformacionais, iniciaram-se após 55°C. Aos 70°C ocorre a perda máxima da intensidade na região de 217 nm. Na região de 203 nm observa-se uma tendência para valores negativos, caracterizando a

desnaturação da proteína. Dois comprimentos de onda, 203 e 217 nm, os pontos de "máximo" e "mínimo" dos espectros da figura 5.5, foram utilizados para seguir estas alterações. A figura 5.6 mostra a desnaturação acompanhada nestes dois comprimentos de onda.

Os espectros de CD da KM+ (13 x 10^{-4} M), obtidos em água, em função da temperatura, são mostrados na figura 5.7. Estes foram medidos de 25 a 80°C, em intervalos de 5 graus. Na região de 216 nm, observa-se poucas alterações até 55°C, similarmente à KM+ em PBS. Após 55°C, estes espectros mostram um comportamento curioso, pois a 65°C, a intensidade na região de 216 nm, não diminui, como ocorre em PBS. Além disso, na região de 204 nm, os espectros assumem valores cada vez mais negativos, com o aparecimento de uma nova banda neste comprimento de onda.

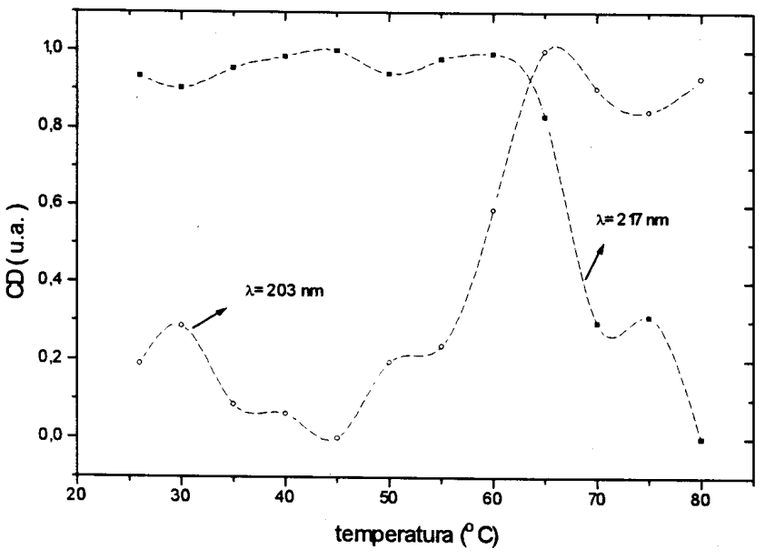


Figura 5.6 - Mudanças conformacionais da KM+ em PBS, induzidas por temperatura, acompanhadas em 203 e 217 nm. (Dados retirados do experimento correspondente à Figura 5.5).

Outro fato é a diminuição da intensidade na região de 195 nm, que passa a assumir valores positivos. Infelizmente, as mudanças em 195 nm, observadas com KM+ em água, não podem ser comparadas com a proteína em PBS, devido ao excessivo ruído que este tampão apresenta nesta região. Provavelmente, as diferenças dos espectros de KM+

IFSC — SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO

quando registrados em PBS e água, em função da temperatura, observadas em 204 e 216 nm, talvez possam ser explicadas pela ausência da força iônica. Dois comprimentos de onda, 195 nm e 204 nm, correspondentes às regiões das mudanças espectrais, foram utilizados para acompanhar as mudanças conformacionais.

A figura 5.8 mostra as mudanças conformacionais monitoradas nos dois comprimentos de onda acima citados. A estrutura desordenada (195 nm) tem o máximo em 25°C e o mínimo em 80°C. Ao contrário, a região de 204 nm possui o mínimo em 25°C e o máximo em 80°C, o que sugere uma transformação da estrutura desordenada (195 nm) numa nova banda em 204 nm. Portanto, supondo que existam apenas duas formas, observa-se pela figura 5.8 que a 64°C metade da mudança conformacional ocorreu.

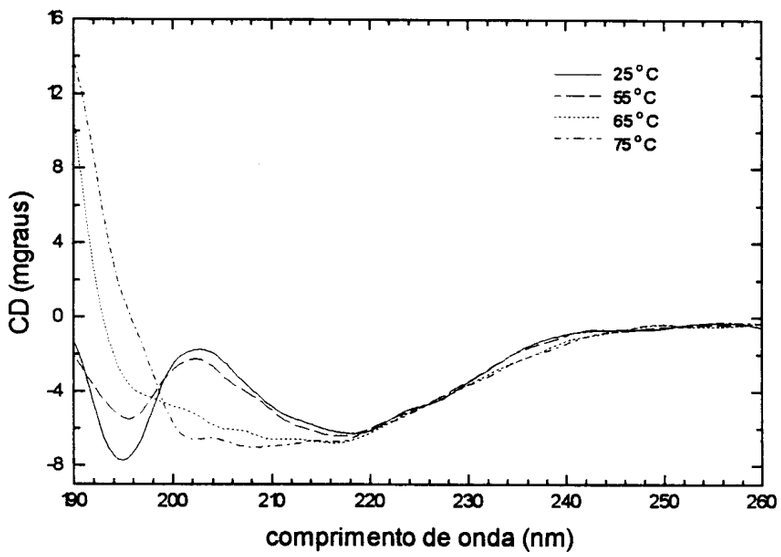


Figura 5.7 - Mudanças conformacionais da KM+, em água, em função da temperatura. Os espectros foram registrados de 190 a 260 nm, com uma média de quatro varreduras, em uma cubeta cilíndrica de 0,1 cm de caminho óptico, em banho térmico acoplado ao aparelho. A amostra continha 13 x 10^{-4} M de proteína e foi incubada por 5 min em cada temperatura, após o equilíbrio térmico ser atingido.

Observou-se portanto que ocorreram mudanças estruturais, tanto em água quanto em PBS. Porém, o comportamento para estas mudanças foram diferentes (figura 5.9). As amostras anteriormente aquecidas, KM+ em água e em PBS, foram deixadas à

temperatura ambiente para que atingissem 25°C. Os espectros foram novamente registrados e não apresentaram alterações em relação aos espectros das amostras aquecidos a 75°C, isto é, as alterações conformacionais desta lectina, induzidas por temperatura são irreversíveis.

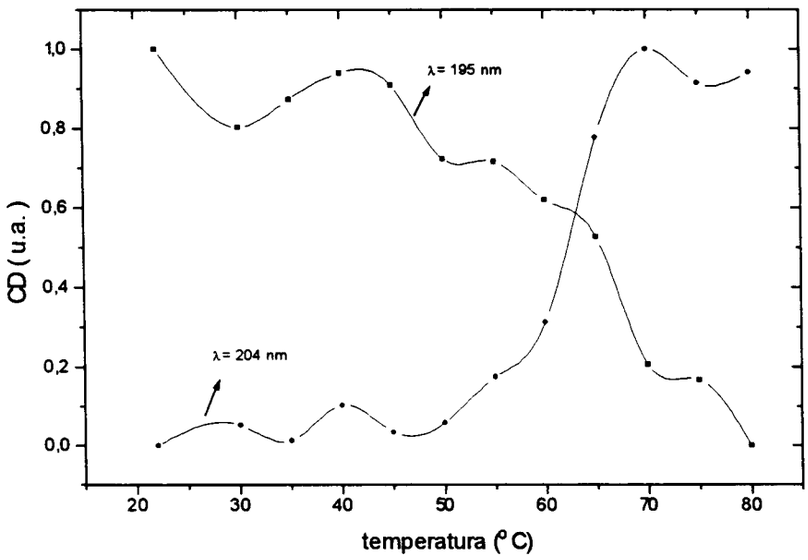


Figura 5.8 - Mudanças conformacionais da KM+, em água, monitoradas em 195 e 204 nm. (Dados retirados do experimento correspondente à figura 5.7).

A utilização do programa CCA para acompanhar a mudança conformacional induzida pela temperatura, em água, forneceu os resultados da tabela 5.2:

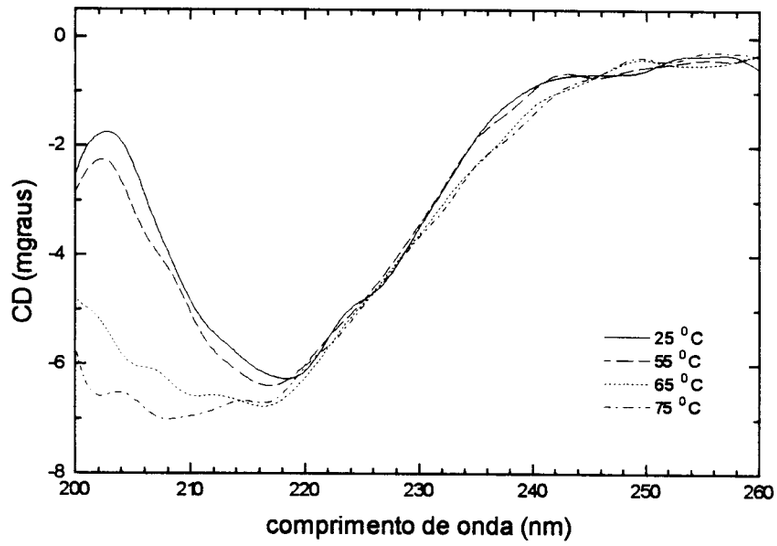
Tabela 5.2[1] - Quantificação da mudança conformacional, da KM+, induzida por temperatura.

Solvente	T (°C)	α (%)	β_a (%)	$\beta_{t/p}$ (%)	r (%)	c.a. (%)	RMS (%)
H_2O	25	1	35	21	28	15	1
	75	11	12	31	38	9	6

No programa CCA, é adicionado ao grupo dos espectros de proteínas de referência (25 proteínas), o espectro da proteína a ser analisado. O resultado deste fato é

[1] α-hélice (α); folha β-antiparalela (β_a); volta β e/ou folha β-paralela ($\beta_{t/p}$); desordenada e/ou volta γ (r); contribuições de aromáticos e ligações dissulfeto (c.a.) e desvio médio quadrático (RMS).

No programa CCA, é adicionado ao grupo dos espectros de proteínas de referência (25 proteínas), o espectro da proteína a ser analisado. O resultado deste fato é que o espectro em análise acaba por contribuir no cálculo dos espectros básicos, gerando espectros básicos "diferentes", ainda que as 25 proteínas sejam sempre utilizadas. Quando adiciona-se o espectro em análise, este programa faz a desconvolução dos componentes "puros" adequar-se a este espectro, melhorando a simulação. Se, por um lado foram comparados conteúdos de estrutura secundária, calculados utilizando-se bases diferentes, por outro lado, quando foi utilizado o programa SSE, foi impossível tal comparação. Neste programa, se for conservada a mesma base, isto é, não se faça uma adequação do grupo de proteínas de referência, a cada espectro a ser analisado, o RMS aumenta consideravelmente. Por exemplo, o RMS para a simulação da proteína nativa a 25°C foi de 9% e o da proteína a 75°C aumentou para 20%. O programa CCA permite ao menos uma comparação qualitativa para as estimativas das estrutura secundárias, quando forem induzidas mudanças conformacionais.



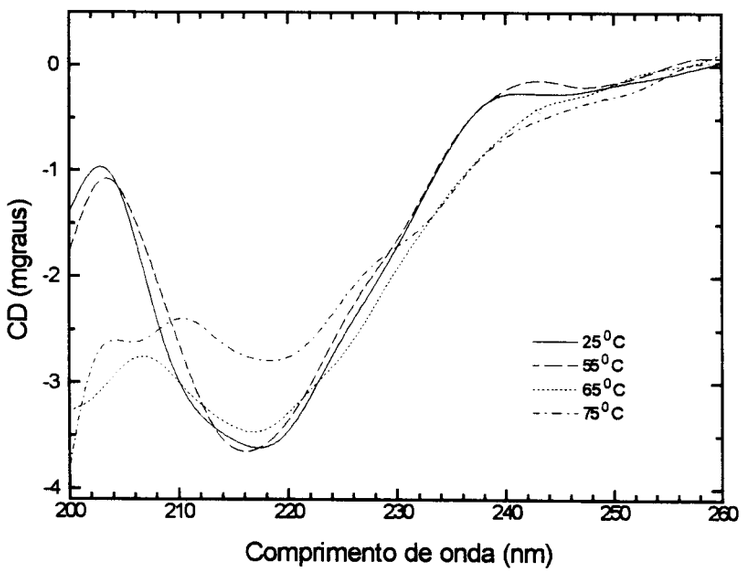


Figura 5.9 - Mudanças conformacionais da KM+: A: em água; B: em PBS. Os dados foram retirados das figuras 5.5 e 5.7. Os espectros da KM+ em água foram cortados em 200 nm para melhor compará-los.

5.3.2 - Modificações conformacionais induzidas por agentes químicos

5.3.2.1 - Estabilidade conformacional da KM+ em função do pH

Foram investigadas as alterações da KM+ em função do pH, acompanhadas por CD e fluorescência. Os espectros de emissão de fluorescência da KM+ (18×10^{-4} M), em PBS pH 7,2; com a excitação fixada em 280 e 295 nm, estão ilustrados na figura 5.10. Estes espectros foram registrados de 290-450 nm, quando a excitação foi em 280 nm, e de 305-450 quando a excitação foi em 295 nm e foram normalizados para uma mesma absorbância. Não foram verificadas diferenças entre os espectros, sugerindo que a banda dos resíduos de tirosina (7 por monômero) esteja encoberta pela banda dos resíduos de triptofano (1 por monômero). Estes espectros caracterizam-se por uma banda com comprimento de onda de emissão máxima em 328 nm, típico de resíduos de triptofanos não expostos ao solvente [14]. O rendimento quântico dos resíduos de triptofano da KM+, relativo aos resíduos de triptofano em água [35], foram calculados para os espectros com excitação em 280 e 295 nm e foram 0,06 e 0,07 respectivamente, sugerindo que mesmo excitando-se em 280 nm, apenas os resíduos de triptofano contribuem para a emissão de fluorescência da KM+, apesar da proporção 1 : 7 entre triptofano e tirosina. Este fato é comum em proteínas como descrito anteriormente no capítulo 3, página 46.

Uma mistura tamponante de acetato/fosfato/borato foi utilizada para variação do pH de 4,0-12,0, em intervalos de 0,5. A figura 5.11 ilustra a dependência das áreas dos espectros de emissão da KM+ em função do pH. Estas áreas foram normalizadas para uma mesma absorbância. Foi observado um aumento de fluorescência em pH 7,0; um fraco decréscimo para pH's baixos e um acentuado decréscimo na faixa de pH's altos.

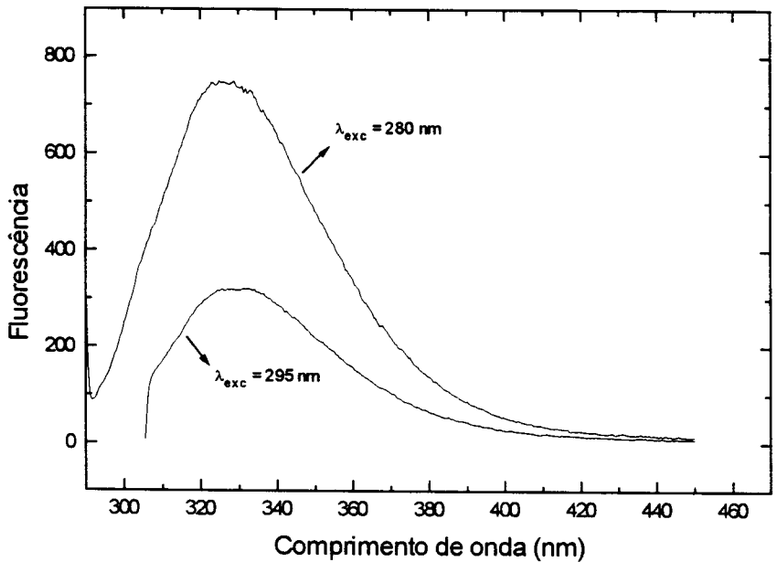


Figura 5.10 - O espectro de emissão de fluorescência da KM+ (18 x 10^{-4} M) em PBS pH 7,2. O espectro foi registrado de 290 a 450 nm, com excitação em 280 nm, em cubeta retangular de 1 cm de caminho óptico.

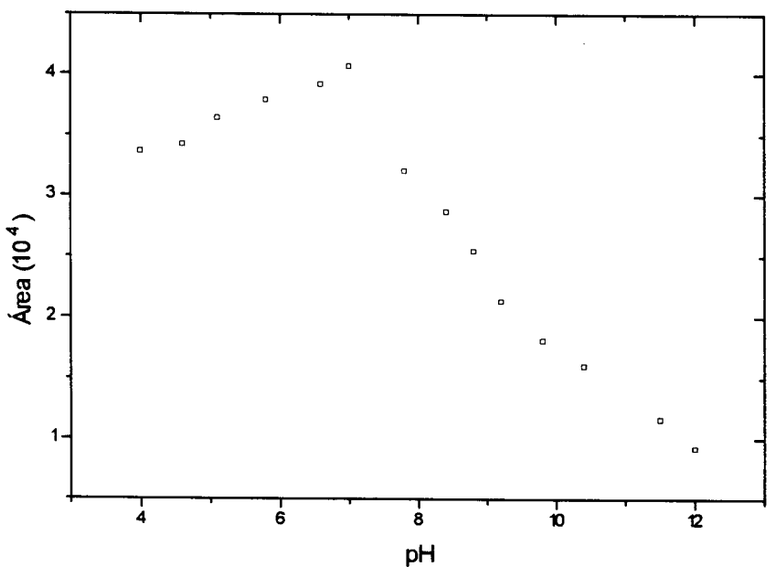


Figura 5.11 - O comportamento das áreas dos espectros de emissão da KM+ (18 x 10^{-4} M), como função do pH. Os espectros foram registrados de 290 a 450 nm, com excitação em 280 nm, utilizando-se uma cubeta retangular de 1 cm de caminho óptico e uma mistura tamponante (acetato/ fosfato/ borato).

O deslocamento do comprimento de onda da emissão máxima como função do pH é mostrado na figura 5.12. Não foram observadas alterações no comprimento de onda da emissão máxima na faixa de pH 4,0-10,0; portanto, não ocorreram mudanças significativas na vizinhança dos resíduos de triptofano. Entretanto, na faixa de pH 10,5-12,0 houve um deslocamento do espectro de emissão para a região do vermelho (340 nm). Este deslocamento indica alterações no ambiente químico do triptofano nesta faixa de pH, provavelmente expondo mais ao solvente a região dos resíduos de triptofano. Os resultados observados quando foram utilizados os tampões acetato de amônio (pH 4,0-6,0), PBS (pH 6,5-7,5), Tris (pH 8,0-9,5), Caps (pH 9,5-10,5) foram semelhantes aos obtidos com a mistura tamponante acetato/fosfato/borato. Os espectros de CD de KM+ em função do pH não foram alterados na faixa de pH 4,0-12,0.

As alterações detectadas por fluorescência são a níveis terciários e as dectectados por CD a níveis secundários. Pode-se especular que a KM+ em pH's mais altos, não estaria mais em sua forma tetramérica, mas as unidades básicas ainda conservariam sua estrutura secundária. As alterações, se ocorreram, não foram detectáveis por CD. Na faixa de pH de 2,0-4,0 ocorreu precipitação da KM+, observada pela diminuição da absorbância da amostra em 280 nm, apesar de seu pI estar entre 4,0-5,2.

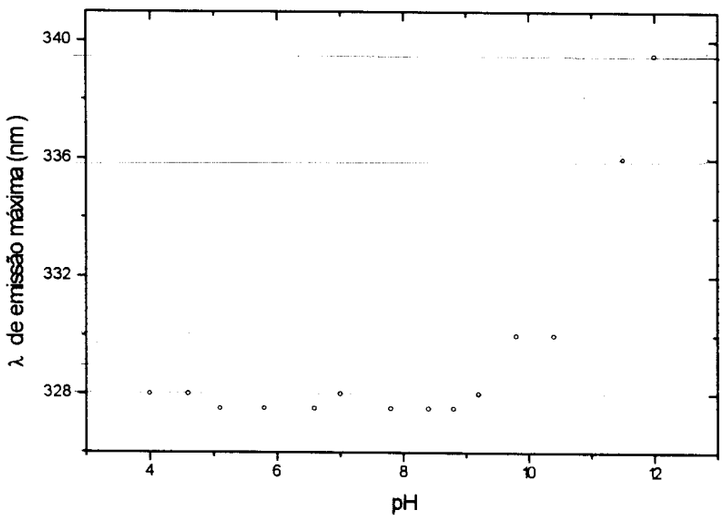


Figura 5.12 - O deslocamento do máximo de emissão de fluorescência como função do pH, utilizando-se a mistura tamponante, acetato/ fosfato/ borato.

IFSC — SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO

5.3.2.2 - "Unfolding" da KM+ por agentes desnaturantes

Para estudar as alterações da KM+, frente a ação de agentes desnaturantes, foram utilizados hidrocloreto de guanidina (GdnHCl) e duodecil sulfato de sódio (SDS). As alterações induzidas por estes agentes foram monitoradas por CD e fluorescência. Pequenas alíquotas da solução de um ou outro agente foram adicionadas a uma mesma amostra e correções no volume final foram feitas, quando necessário.

A concentração da amostra, para o CD, foi de 13 x 10^{-4} M de KM+ em água, a concentração de GdnHCl e SDS variaram de 0,1 a 3,0 M (em intervalos de 0,25 M) e de 0,1 a 50 mM, respectivamente. Os espectros foram registrados de 190 a 260 nm. Na figura 5.13 estão os espectros de CD da KM+ como função da concentração de GdnHCl. A banda correspondente a estrutura β sofre diminuição na intensidade a partir de 0.05 M e diminui com o aumento da concentração. O máximo da desnaturação ocorre em 1,75 M de GdnHCl, não mostrado no gráfico abaixo, pois tem uma curva muito próxima à concentração de 3,0 M.

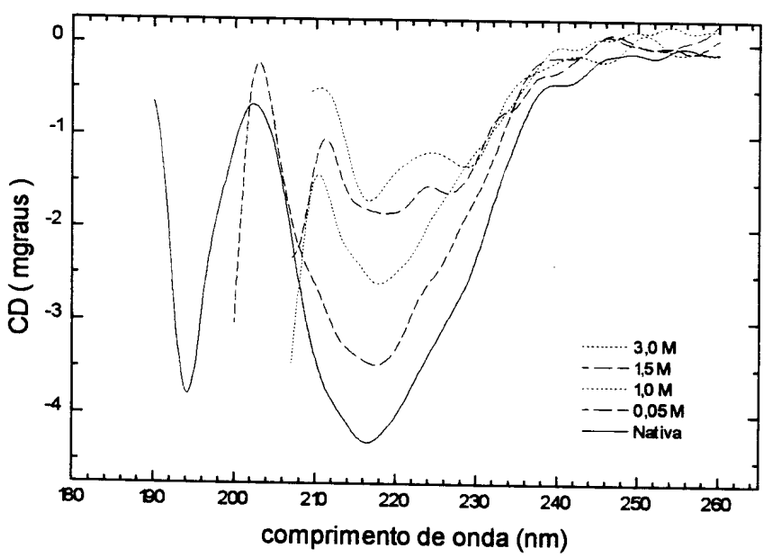


Figura 5.13 - Mudanças conformacionais da KM+ (13 x 10^{-4} M), em água, em função da concentração de cloreto de guanidina. Os espectros foram registrados de 190 a 260 nm, com uma média de oito varreduras, em uma cubeta cilíndrica de 0,1 cm de caminho óptico. Devido ao ruído excessivo causado pelo cloreto de guanidina em comprimentos de onda mais baixos, foi necessário cortar alguns espectros em determinados comprimentos de onda.

A figura 5.14 mostra os espectros de KM+ incubada com SDS. A região do espectro entre 202-206 nm, a partir de 10 mM, diminui de intensidade, e com 50 mM a banda correspondente à estrutura ß é fortemente alterada. O GdnHCl é mais indicado como agente desnaturante, para a monitorização no CD, pois, ao menos na região de 205 -225, não influencia o espectro de CD, mesmo em concentrações altas, por absorver pouco ou nada nesta faixa do espectro. Ao contrário, o SDS mesmo em concentrações mais baixas tem considerável absorção na região de 190 a 260 nm. Espectros de soluções dos desnaturantes, em água, foram registrados para cada concentração utilizada e, posteriormente, subtraídos dos espectros das soluções de proteínas e desnaturantes.

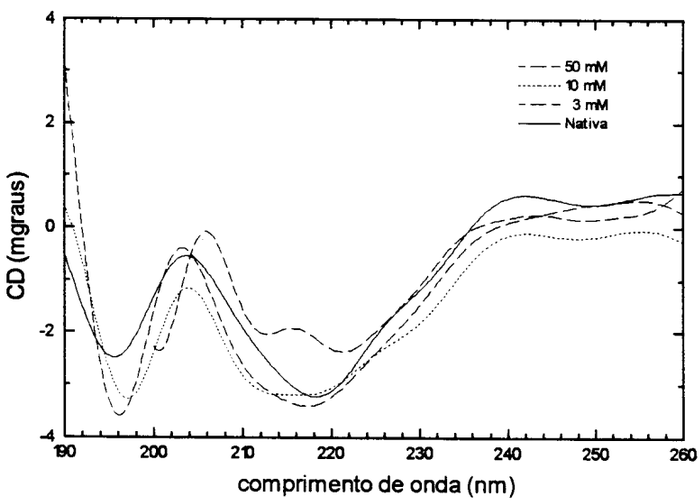


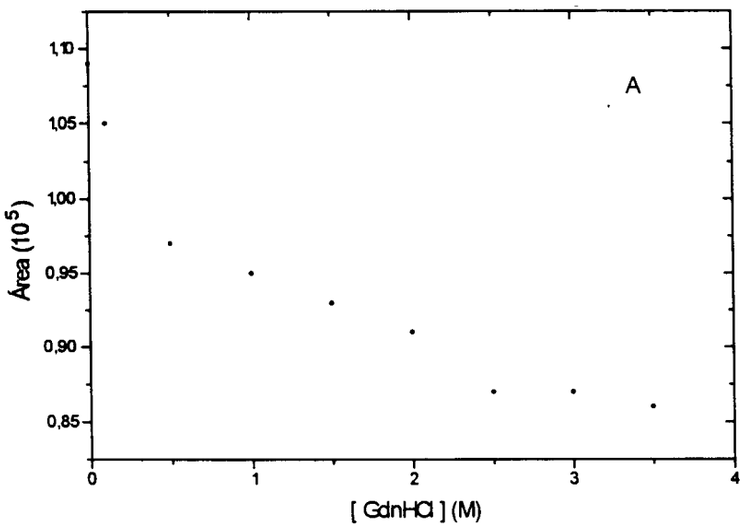
Figura 5.14 - Mudanças conformacionais da KM+ (13 x 10^{-4} M), em água, em função da concentração de SDS. Os espectros foram registrados de 190 a 260 nm, com uma média de oito varreduras, em uma cubeta cilíndrica de 0,1 cm de caminho óptico. Devido ao ruído excessivo causado pelo SDS em comprimentos de onda mais baixos, foi necessário cortar alguns espectros em determinados comprimentos de onda.

A monitorização das alterações conformacionais de KM+, por fluorescência, induzidas por GdnHCl e SDS foram realizadas com amostras na concentração de 13 x 10^{-4} M de KM+ em PBS, pH 7,2. As concentrações utilizadas de GdnHCl e de SDS foram de 0,1 - 2,75 M (intervalos de 0,25 M) e de 2-52 mM (em intervalos de 0,2 e 0,4 mM), respectivamente.

Foram realizados também experimentos aliando-se temperatura à guanidina. Foi observado que a diminuição da intensidade na região de 205 - 225 nm ocorreu com menor temperatura e menor concentração de guanidina.

A figura 5.15 ilustra a supressão de fluorescência induzida por GdnHCl, painel A, e SDS, painel B, através da variação da área dos espectros de emissão. O máximo da supressão da fluorescência por GdnHCl e por SDS foi atingido nas concentrações de 1,25 M e 45 mM, respectivamente. Os gráficos de Stern-Volmer da figura 5.16 não são lineares e pela teoria de supressão isto sugere que existem duas populações de fluoróforos: com acessibilidades diferentes. O modo de tratar uma supressão desse tipo é com o gráfico de Stern-Volmer.

As constantes de supressão (K_{SV}) e as frações acessíveis aos supressores (*f*) foram calculadas a partir dos gráficos de Stern-Volmer modificados (figura 5.16, painel A-GdnHCl; painel B-SDS). Os gráficos de Stern-Volmer modificados forneceram K_{SV}=2,10 M^{-1} e 1,44 x 10^2 M^{-1} para GdnHCl e SDS, respectivamente. Estes resultados demonstram que o SDS foi mais eficaz em suprimir a fluorescência da KM+, pois a constante de supressão do GdnHCl foi muito baixa, sugerindo uma fraca supressão. As frações dos fluoróforos acessíveis, ao GdnHCl (0,22) e ao SDS (0,36), revelam que estes foram mais acessíveis ao SDS. Em ambos os casos, não foi observado deslocamento no máximo de emissão para o vermelho, o que indicaria desnaturação e/ou alteração conformacional da proteína como descrito no capítulo 3, página 47. Este fato, já foi descrito para outras proteínas, isto é, que mesmo desnaturadas não tiveram seus espectros deslocados, porém estes espectros mostraram a banda da tirosina [14]. No caso da KM+ o espectro se mantém inalterado a não ser pela supressão da intensidade de fluorescência, que no caso da GdnHCl é fraca. Este resultado, principalmente com GdnHCl, quando comparado ao resultado do CD, que mostra o desarranjo da estrutura secundária induzida por GdnHCl, sugere que os resíduos de triptofano da KM+, mesmo após a perda de sua estrutura secundária continuem "escondidos" em um ambiente hidrofóbico, de forma a não sentirem o desarranjo estrutural. Quanto ao SDS, devido à



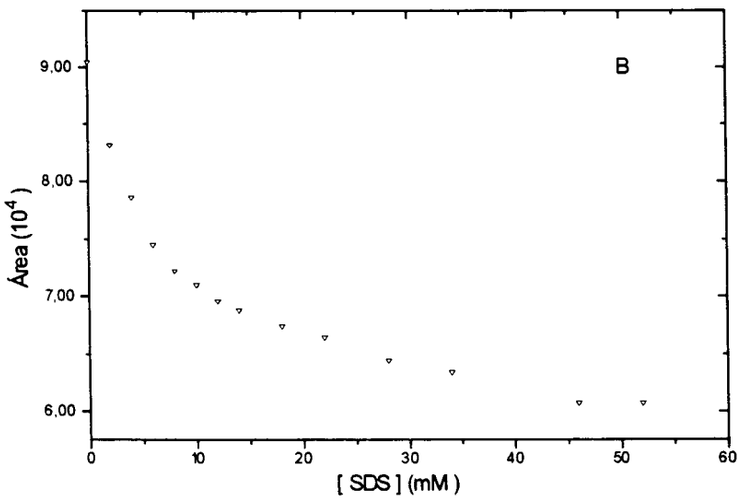
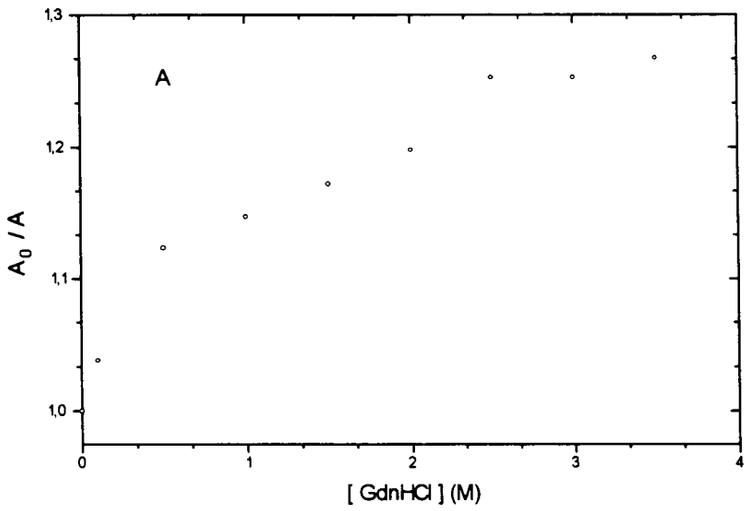


Figura 5.15 - A supressão da fluorescência da KM+ (13 x 10^{-4} M), em PBS pH 7,2, ilustrada através das variações das áreas dos espectros de emissão. A: GdnHCl; B: SDS. Os espectros foram registrados de 290 a 450 nm, com excitação em 280 nm, utilizando-se uma cubeta retangular de 1 cm de caminho óptico.



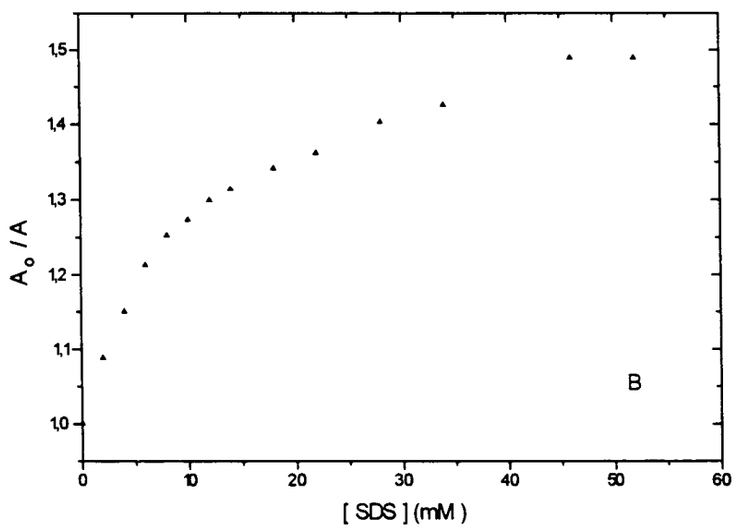


Figura 5.16 - Os gráficos de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência da KM+ induzida por cloreto de guanidina (painel A) e SDS (painel B). Estes gráficos foram construídos a partir de dados retirados da figura 5.15.

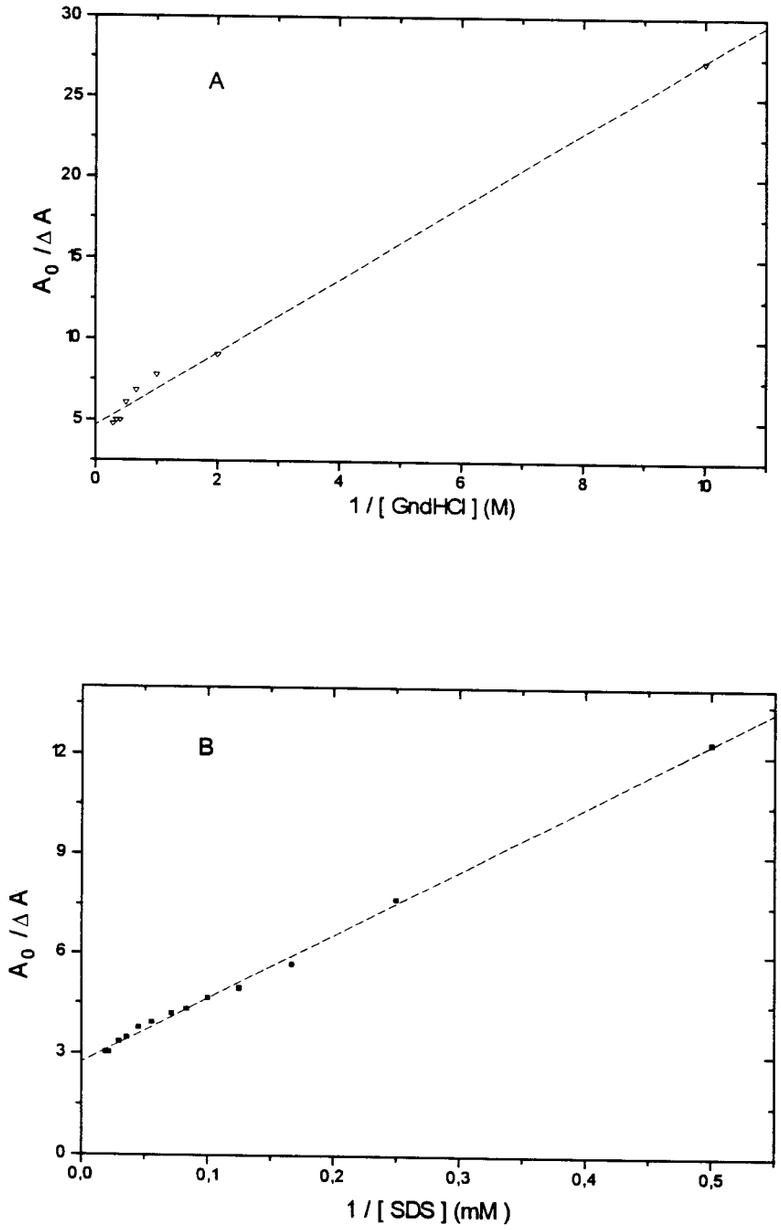


Figura 5.17 - Os gráficos de Stern-Volmer modificados para a supressão de fluorescência da KM+ por cloreto de guanidina (painel A) e por SDS (painel B). As constantes de Stern-Volmer e as frações de fluoróforos acessíveis encontradas para GdnHCl e SDS foram, respectivamente: K_{SV}=2,10 M^{-1} e 1,44×10^2 M^{-1}; f = 0,22 e 0,36, respectivamente. Os gráficos forma construídos a partir dos dados retirados da figura 5.15.

dificuldade causada nas medidas, pelo fato deste absorver na região de 190 - 260 nm, a desnaturação da proteína não foi observada no CD, apenas foi visto um início de desarranjo estrutural. Porém, como a absorção do SDS é muito intensa, não foi aumentada a concentração do mesmo, pois poderia "mascarar" os resultados.

5.3.2.3 - Supressão da emissão de fluorescência por acrilamida e iodeto de potássio

Para confirmar a posição dos resíduos de triptofano na molécula de KM+, foi realizada a supressão da fluorescência com dois reagentes: iodeto de potássio (KI) e acrilamida, nos pH's 4,0 (acetato de amônio), 7,2 (PBS) e 9,0 (Tris-HCl) em concentrações que variaram de 4 a 112 mM; as amostras continham 18 x 10^{-4} M de KM+. A acrilamida não suprimiu a fluorescência da KM+. Os gráficos de Stern-Volmer para o iodeto de potássio nos pHs 4,0 e 7,0 são lineares (f_{KI} =1) e estão na figura 5.18 e fornecem K_{SV}=0,8 M^{-1} (pH 4,0) e 0,9 M^{-1} (pH 7,2). A linearidade dos gráficos indica que todos os triptofanos são igualmente acessíveis a este supressor. As constantes de Stern-Volmer dos dois pH's, praticamente iguais, indicam que a polaridade do meio não influencia a supressão pelo iodeto de potássio. Os baixos valores das constantes de Stern-Volmer evidenciam uma fraca supressão. Estes fatores sugerem que os resíduos de triptofano da KM+ encontram-se em uma região hidrofóbica da proteína. Porém, o fato inexplicável é que a acrilamida deveria ser mais eficaz na supressão de cromóforos protegidos.

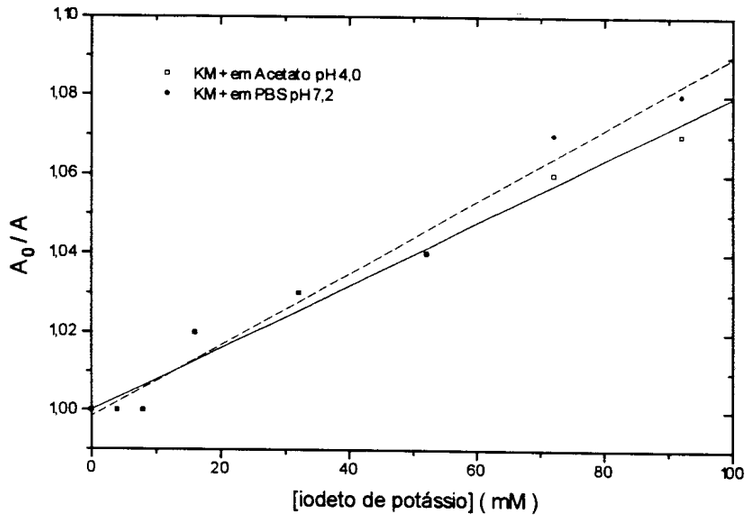


Figura 5.18 - Os gráficos de Stern-Volmer da supressão da emissão de fluorescência da KM+ (18 x 10^{-4} M) por iodeto de potássio. Os espectros foram registrados de 290 a 450 nm, com excitação em 280 nm, utilizando-se uma cubeta retangular de 1 cm de caminho óptico, nos pHs: 4,0 (acetato de amônio); 7,2 (PBS). As constantes de Stern-Volmer (K_{SV}) para os pH's 4,0 e 7,2 foram 0,8 M^{-1} e 0,9 M^{-1}, respectivamente.

5.4 - Afinidade de KM+ por D-manose

Para averiguar a estequiometria da ligação de KM+/D-manose foi utilizada a fluorescência. Neste experimento pequenas alíquotas de D-manose eram adicionadas a uma mesma amostra de KM+ (4,5 x 10^{-4} M), começando com a razão molar de 1:1 e finalizando com a razão de 4:1 entre o açúcar e a proteína, respectivamente. O aumento da concentração de D-manose implica na supressão da fluorescência, figura 5.19.

A supressão máxima da fluorescência ocorreu com 2 moles de D-manose. Se todos os sítios de ligação do açucar fossem próximos dos resíduos de triptofano poderia-se deduzir que a estequiometria de ligação foi de 2 moles de D-manose para 1 mol de KM+, sugerindo com isso 2 sítios de ligação para esse monossacarídeo na molécula. O gráfico de Stern-Volmer é apresentado na figura 5.20 (painel A). A linearidade do gráfico é observada apenas na região de concentrações mais baixas de D-manose (entre barras no

gráfico). O painel B da figura 5.21 demonstra a linearidade desta região e nos fornece K_{SV}=1,25.10^3 M^{-1}.

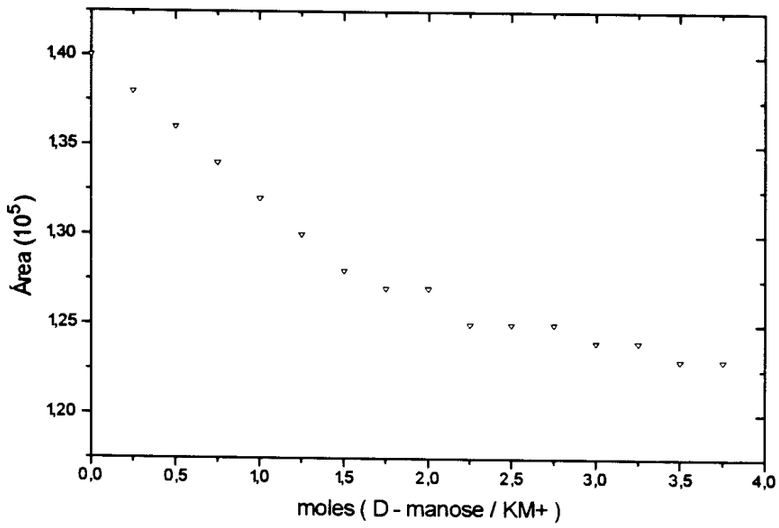


Figura 5.19 - A supressão da fluorescência da KM+ (4,5 x 10^{-4} M), em PBS pH 7,2; induzida por D-manose, representada pela variação das áreas dos espectros de emissão. Os espectros foram registrados de 290 a 450 nm, com excitação em 280nm, utilizando-se cubeta retangular de 1cm de caminho óptico. As medidas foram realizadas adicionando-se alíquotas de D-manose a uma mesma solução de proteína.

O gráfico de Stern-Volmer, da figura 5.20 (painel A), não é linear e pela teoria de supressão isto sugere que existem duas populações de fluoróforos com acessibilidades diferentes. Utilizando o gráfico de Stern-Volmer modificado, ilustrado na figura 5.21, obtem-se K_{SV}=1.25.10^3 M^{-1} , que é a constante de associação da fração acessível, e f=0,39, que é a fração acessível ao supressor. As constantes de associação calculadas foram as mesmas pelos dois modos de tratamento, figuras 5.19 e 5.20, visto que têm o mesmo significado. Sendo KM+ um tetrâmero, existe 1 triptofano por monômero, e a estequiometria determinada neste experimento sugere um sítio de ligação por dímero. Porém, os resultados indicam que nem todos os resíduos de triptofano são suprimidos pela ligação do açúcar. Apenas dois deles relacionam-se com esta associação e a fluorescência dos outros dois triptofanos não seria afetada pela ligação do açúcar.

A monitoração da associação da KM+/D-manose foi também realizada por CD. A variação da concentração de D-manose foi estabelecida a partir da razão molar de 1:1 entre açúcar/proteína até a razão 4:1. Os espectros de CD da KM+ em função do aumento da concentração de D-manose não foram alterados. Isto implica que a interação KM+/D-manose não induz mudanças em sua estrutura secundária, aos níveis detectáveis por esta metodologia. Este fato não causa surpresa, pois o sítio de ligação de açúcar numa lectina é externo e não é esperado que a ligação do açúcar afete a estrutura secundária da proteína.

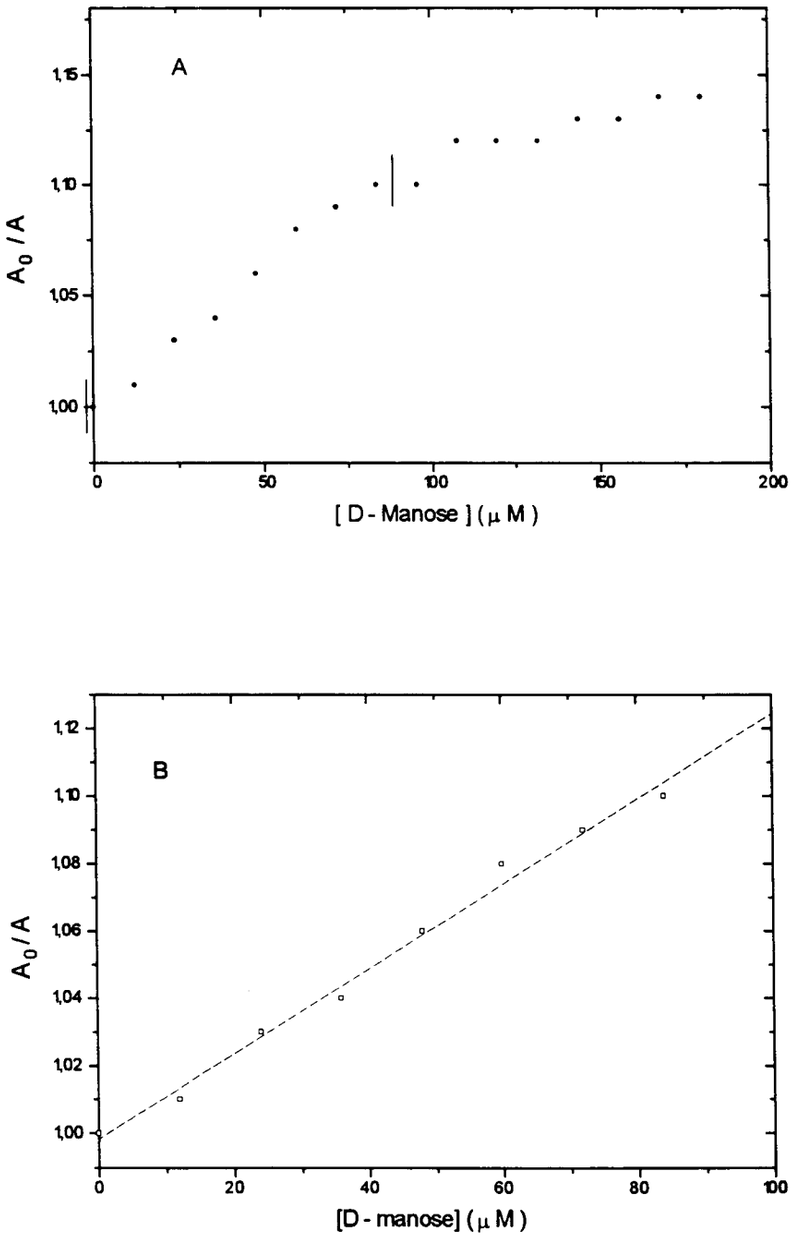


Figura 5.20 - No painel A está representado o gráfico de Stern-Volmer da supressão da KM+, em PBS pH 7,2; induzido por D-manose e construído a partir dos dados de supressão da fig 5.19. No painel B estão representados apenas os dados da região linear do painel A (indicada por barras). Os dados desta região fornecem a constante de associação K_{SV}=1,25.10^3 M^{-1}.

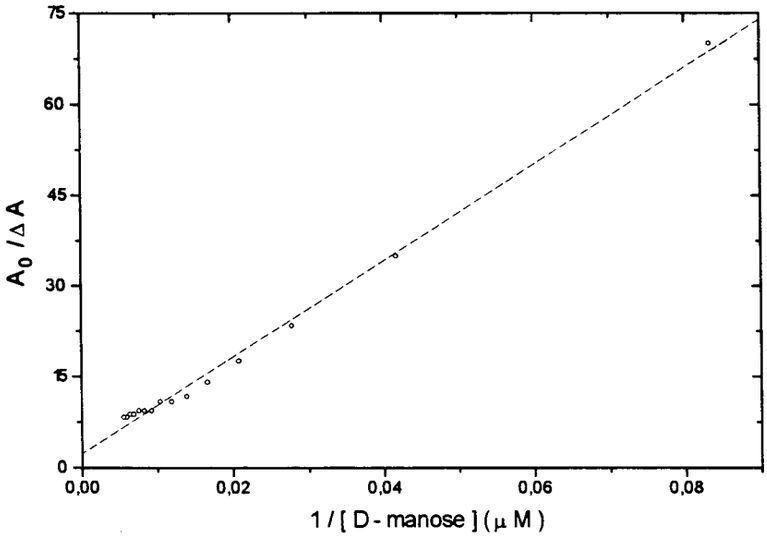


Figura 5.21 - O gráfico de Stern-Volmer modificado da supressão da KM+ em PBS pH 7,2; por D-manose. Este gráfico foi construído com os dados de supressão da figura 5.19 e fornece a constante de associação K_{SV}=1,25.10^3 M^{-1}.

Conclusões

A espectropolarimetria (CD) permitiu explorar aspectos da estrutura secundária, enquanto a espectrofluorimetria permitiu monitorar mudanças a níveis de estrutura terciária e/ou quaternária da lectina KM+.

A lectina KM+ tem uma estrutura secundária peculiar, pois seu espectro não é semelhante aos espectros de outras lectinas e/ou proteínas descritos na literatura. Talvez este espectro tão característico seja devido ao alto conteúdo de prolina que poderia "deformar" sua estrutura secundária.

As análises que permitiram estimar o conteúdo em estrutura secundária de KM+ foram realizadas por dois programas: o SSE e o CCA, este último descrito recentemente na literatura. O SSE forneceu: 0% de α-hélice, 41% de folha pregueada β, 27% de volta β, 32% de desordenada e um RMS (desvio médio quadrático) de 12%. O CCA forneceu: 1% de α-hélice, 35% de folha β antiparalela, 21% de volta β e/ou folha β paralela, 15% de contribuições adicionais (representadas pelas contribuições dos aminoácidos aromáticos e pontes S-S entre os resíduos de cisteína), 28% de estrutura desordenada e/ou volta γ e o RMS de 1%. Estes programas permitiram deduzir que esta lectina é formada por estruturas tipo folhas β e estruturas tipo desordenadas.

O método CCA, já discutido em capítulos anteriores, foi mais conveniente para a análise de KM+, pois além do RSM ser 12 vezes menor que no programa SSE, todas as modificações, detectáveis pelo espectro de CD, são analisadas individualmente, uma vez que a decomposição é adequada a cada espectro de CD a ser analisado. Caso

contrário, pode-se observar as modificações do espectro, porém nenhuma quantificação é possível.

A região de 216 nm, correspondente à estrutura β, do espectro de CD de KM+ mostrou-se resistente à temperatura de até 55°C, permanecendo inalterada. As alterações, provocadas pela temperatura são permanentes e dependentes de força iônica, uma vez que comportamentos diferentes foram observados em suas mudanças conformacionais, quando dissolvida em água ou PBS.

Esta lectina mostrou-se estável em ampla faixa de pH (4,0-10,5). A máxima emissão de fluorescência, em pH 7,0, ocorreu a 328 nm, típica de resíduos de triptofano que se encontram protegidos do solvente. Observou-se um fraco decréscimo para pH's ácidos e um acentuado decréscimo na faixa de pH's básicos. O deslocamento do comprimento de onda da emissão máxima, como função do pH, para a região do vermelho (340 nm), ocorreu acima de 10,5. Este deslocamento indica alterações no ambiente dos resíduos de triptofano, provavelmente expondo mais a região dos resíduos de triptofano ao solvente.

Provavelmente, esta estabilidade observada para KM+ venha do fato que uma maneira eficiente de empacotamento de folhas β seja a superposição das mesmas, de modo a formarem um núcleo hidrofóbico e um envoltório hidrofílico. A soma das energias de interação seriam altas nesse núcleo hidrofóbico, tornando sua estrutura mais estável.

Supondo que todos os sítios ligantes de D-manose estejam próximos aos resíduos de triptofano, estequiometria de ligação D-manose:KM+ é de 2:1, ou seja 2 moles de açúcar/mol de proteína, confirmando dois sítios de ligação para este monossacarídeo, como proposto por Oliveira e col. [27]. Estes sítios estariam próximos de dois triptofanos, sendo que a fluorescência dos outros dois triptofanos estaria livre da influência da ligação do açúcar.

A desnaturação por agentes dissociantes foi mais efetiva quando associados a temperatura, pois a desnaturação ocorreu com menor concentração do dissociante e menor temperatura também.

Perspectivas

A continuidade destes estudos será objeto da tese de doutorado e os esforços serão concentrados no sentido de melhor compreeender as características físico-químicas, bem como a estrutura desta lectina, para que estes estudos possam auxiliar na viabilização do desenvolvimento de compostos, partes da própria lectina e/ou açúcares, que possam ser úteis como drogas, interferindo em mecanismos onde a presença de neutrófilos e/ou linfócitos possa ser estimulada ou inibida. As principais etapas, já estabelecidas, serão:

1 - Estudar as mudanças conformacionais de KM+, induzidas pela temperatura, na presença de D-manose, para verificar sua estabilidade na presença do açúcar;

2 - Averiguar se com a retirada do cloreto de guanidina, KM+ retoma sua conformação nativa e recupera sua atividade biológica;

3 - Estudar o comportamento de KM+ em tampões livres de cloreto e em solventes orgânicos como etanol e dimetilsulfóxido;

4 - Separar as formas nativas das desnaturadas, por cromatografia líqüida de alta resolução (HPLC), monitorando-as por CD (dicroísmo circular). Estas duas técnicas permitirão identificar espécies intermediárias, desde a proteína nativa até a desnaturada;

5 - Acompanhar mudanças estruturais pela técnica de RPE (ressonância paramagnética eletrônica), utilizando marcadores de spins apropriados como sondas paramagnéticas, com o objetivo de detectar mudanças conformacionais pela ação de agentes desnaturantes e de ligantes específicos e não específicos. A técnica de RPE também será utilizada na determinação dos vários tempos de correlação rotacional por simulação espectral;

6 - Estudar a anisotropia da KM+ através de medidas de fluorescência polarizada e/ou resolvida no tempo, determinando suas constantes de ligação em função de ligantes específicos e não específicos.

Bibliografia

[1] Agrawal, B.B.L. e Goldestein, I.J. (1965) *Biochem. J.*, 96, 230.
[2] Bayley, P.M.; Nielsen, E.B. e Schellman, J.A.(1969) J. Phys.Chem.
[3] Bunn-Moreno, M.M. e Campos-Neto, A. (1981) *J. Immunol.*, 127, 427-429.
[4] Cantor, C.R. e Schimmel, P. R. (1980), *Biophysical Chemistry* - Part II. W.H. Freeman and Company, New York.
[5] Cantor, C.R. e Timasheff, S.N. (1982) *The Proteins*, 5, 145-301, Academic Press. New York.
[6] Chait, B.T.; Hunt, D.F. e Reinhold, V.N. - "Mass Spectroscopy Symposium", *Resumos da XXII Reunião Anual da SBBQ*, Caxambú, MG, 1993.
[7] Chang, C.T.; Wu, C.S.C. e Yang, J.T. (1978) *Anal. Biochemistry*, 91, 12.
[8] Chen, Y.H. e Yang, J.T. (1971) *Biochemistry Biophysical Res. Commun.*, 44, 1285.
[9] Dwaine, O.C.; Drisco, R.L. (1976) *Elemments of Organic Photochemistry*, Plenum Press, New York.
[10] Goldestein, I.J.; Hughes, R.C.; Monsigny, M.; Ozawa, T. e Sharon, N. (1980) *Nature*, 285, 66.
[11] Greenfiel, N. e Fasman, G.D. (1969) *Biochemistry*, 8, 4108.
[12] Hennssey, J.P. Jr. e Johnson, W.C. (1981) *Biochemistry*, 20, 1085.
[13] Laemli, V.K. (1970) *Nature*, 227, 680.
[14] Lakowicz, J.R. (1983) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum Press, New York.
[15] Lasky, C.A. (1992) *Science*, 258, 964-969.
[16] Lis, H. e Sharon, N. (1986). *Annu Rev. Biochem*, 55, 35-67.
[17] Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. e Randall, R.J. (1951) *J. Bio. Chem.*, 193, 265-275.
[18] Manavalan, P. e Johnson, W.C. Jr. (1987) *Analytical Biochemistry*, 167, 76.
[19] Moreira, R.A.; Cavada, B.S.; De Oliveira, J.T.A. e Arnouz, I.L., *Proc. of the first Brazilian Congress on Proteins*, Campinas SP, março, 1990.
[20] Oliveira, P.S.L.(1994) Dissertação apresentada ao Instituto de Física e Química de São Carlos para a obtencão de título de Mestre em Química Analítica.
[21] Park, K.; Perczel, A. e Fasman, G.D. (1992) *Protein Science*, 1, 1032.
[22] Perczel, A.; Park, K. e Fasman, G.D. (1992) *Analytical Biochemistry*, 203, 83-93.
[23] Perczel, A.; Park, K. e Fasman, G.D. (1992) *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 13, 57.
[24] Perczel, A.; Hollósi, M.; Tusnády, G. e Fasmam, G.D. (1991) *Protein Engineering*, 4, nº 6, 669-679.
[25] Provencher, S.W. e Glöckner, J. (1981) *Biochemistry*, 20, 33.

[26] Roque-Barreira, M.C.; Praz, F.; Halbwachs-Mecarelli, L.; Greene, L.J. e Campos-Neto,

A. (1986) *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 196, 149-157.
[27] Roque-Barreira, M.C. e Campos-Neto, A. (1984) *Brazilian J. Immunol.*, 134, 1740-1743.
[28] Santos-Oliveira, R.; Thomaz, S.M.O.; Beltramini, L.M. e Roque-Barreira, M.C. , (1994) *J. of Immun*ol., 153, 1798-1807.
[29] Saxena, V.P. e Wetlaufer, D.B. (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 68, 969.
[30] Sharon, N. (1989) *Biochemistry Society Transaction*,17, 11-12.
[31] Sharon, N. e Lis, H. (1993) *Scientific American*, Janeiro, 82-88.
[32] Stillmark H. (1888) T*hesis Univ. Dorpat*, quoted by Kocourek em 1986.
[33] Szabo, A.G. (1989) *The Enzime Catalysis Process*, Plenum Plub Corporation.
[34] Vemyaminov, S.Yu.; Baykalov, I.A.; Chuen-Shang, C.Wu. e Yang, J.T. (1991) *Analytical Biochemistry*, 198, 250-255.
[35] Wiget, P.; Tuisi, P.L. (1978) *Biopolymers*, 167-180.
[36] Woody, R.W. et. al. (1982) *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 19, 187.
[37] Yang, J.T.; Wu, C.S.C. e Martinez, H.M. (1986) *Methods in Enzymology*, 130, 208-269.