UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE FÍSICA E INFORMÁTICA

"DESNATURAÇÃO E REENOVELAMENTO DA FRUTALINA,UMA LECTINA LIGANTE DE D-GALACTOSE"

PATRICIA TARGON CAMPANA

USP / IFQSC / SBI
8-2-001193

Dissertação apresentada ao Instituto de Física de São Carlos, da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências "Física Aplicada".

Orientadora: Profa. Dra. Leila Maria Beltramini

São Carlos – São Paulo
1998

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA

CAMPANA, PATRICIA TARGON
Desnaturação e Reenovelamento da Frutalina, uma lectina ligante de D-galactose/ Campana Patricia Targon.—São Carlos, 1998.
90 p.

Dissertação (Mestrado)—Instituto de Física de São Carlos, 1998.

Orientador(a): Profª Dra. Leila Maria Beltramini

1.Dicroísmo Circular. 2.Reenovelamento de proteínas. 3.Lectina I.Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Instituto de Física de São Carlos

Av. Dr. Carlos botelho, 1465
CEP 13560-250 - São Carlos - SP
Brasil

Fone (016) 274-3444
Fax (016) 272-2218

MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE PATRICIA TARGON CAMPANA APRESENTADA AO INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS, DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, EM 01 DE ABRIL DE 1998.

COMISSÃO JULGADORA:

Profa. Dra. Leila Maria Beltramini/IFSC-USP

Prof. Dr. Richard Charles Garratt/IFSC-USP

Dr. Vitor Barbanti Pereira Leite/IFSC-USP

À MINHA PEQUENA HEIDI,
AOS MEUS PAIS EDSON E NANCI,
E AOS MENINOS, DUDU E EDSINHO
COM TODO O MEU AMOR

AGRADECIMENTOS

Agradeço à todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, e em particular às pessoas que fizeram com que este aprendizado se tornasse uma tarefa muito agradável.

Ao Amaro, pelo amor, paciência, carinho e por tudo

À prof. Dra. Leila M. Beltramini, pela orientação neste trabalho, pela paciência e pela amizade

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

À prof. Dra Ana Paula U. Araújo, pela ajuda na elaboração final deste trabalho, pelas sugestões e pela amizade

À prof. Dra Rosemary Sanches pelas sugestões e amizade

Aos professores do Grupo de Cristalografia: prof. Dr. Glaucius Oliva, prof. Dra. Yvonne P. Mascarenhas pelas sugestões, incentivo e amizade e ao prof. Dr. Richard C. Garratt pelas correções dos inúmeros resumos, pelas sugestões, pelo incentivo, e pela amizade

Aos profs. Dr. Marcel Tabak e Dr. Hidetake pelas sugestões e por colocarem seu laboratório à disposição

Ao prof. Dr. Renato A. Moreira pelas interessantes e valiosas discussões, e pela amizade

À Cris (do Renato) pela amizade e por nos ensinar seus práticos "truques" no laboratório

À minha amiga de sempre, Rose, pela amizade e pela força

Ao povo da biofísica: Nilva e Nalva (nossa dupla sertaneja predileta), nosso presidente da sala de micros: Marcelo, Jô, Cris Nordi, Marli, Cicinho, Carol, Cefise, Emanuel e Vitor, pelo carinho e pela divertida convivência de todos os dias, esquecendo o ar condicionado, é claro!

Ao Jabah, à Ciça e ao Zac, pela amizade, carinho e pela paciência na correção desse trabalho

À Sueli , ao Beto, à Bel pela amizade e auxílio na realização deste trabalho

Aos colegas Benê, Bianca, Wanda, João, Sr. Toninho, Amanda e Mané pela convivência

Ao pessoal do Grupo de Cristalografia, Andressa, Suzana, Cris (do Jabáh), Stéfano, Diet, Frank, Bia e PH pela amizade

Ao Paulão pela amizade, discussões, e ajuda na confecção deste trabalho

À minha amiga Eva, pelo carinho, amizade e pela força

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

SC-USP

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS I

LISTA DE TABELAS II

LISTA DE ABREVIATURAS III

RESUMO IV

ABSTRACT V

I - INTRODUÇÃO

I.1 O ENOVELAMENTO E REENOVELAMENTO DAS PROTEÍNAS 1
I.2 AS LECTINAS 12
I.3 ESPECTROSCOPIA DE DICROÍSMO CIRCULAR 20
I.3.1 MÉTODOS UTILIZADOS PARA O CÁLCULO DAS FRAÇÕES DE ESTRUTURA SECUNDÁRIA A PARTIR DOS ESPECTROS DE CD 34
I.4 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA 40

II - MATERIAIS

II.1 REAGENTES E SOLUÇÕES TAMPÕES 47
II.2 RESINAS CROMATOGRÁFICAS UTILIZADAS 47
II.3 MEMBRANAS E CUBETAS 47
II.4 ENSAIOS DE HEMAGLUTINAÇÃO 48
II.5 EQUIPAMENTOS 48

III - MÉTODOS

III.1 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA FRUTALINA..... 49

III.2 DESNATURAÇÃO DA FRUTALINA POR TEMPERATURA..... 49

III.3 REENOVELAMENTO DA FRUTALINA POR CONGELAMENTO E CENTRIFUGAÇÃO..... 50

III.4 MEDIDAS DE DICROÍSMO CIRCULAR..... 50

III.5 MEDIDAS DE FLUORESCÊNCIA..... 51

III.6 ENSAIOS DE HEMAGLUTINAÇÃO..... 51

IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1 MEDIDAS DE DICROÍSMO CIRCULAR DA FRUTALINA NATIVA E DESNATURADA..... 53

IV.2 CINÉTICA DE DESNATURAÇÃO DA FRUTALINA POR TEMPERATURA..... 55

IV.3 PROCESSO DE REENOVELAMENTO..... 57

IV.4 FLUORESCÊNCIA..... 61

IV.5 ATIVIDADE BIOLÓGICA (HEMAGLUTINAÇÃO) PRESENTE NAS FRAÇÕES NATIVA E REENOVELADA..... 65

IV.6 REENOVELAMENTO DA FRUTALINA QUANDO CONGELADA COM OUTROS MONOSSACARÍDEOS..... 67

IV.7 ESTIMATIVA DE CONTEÚDO DE ESTRUTURA SECUNDÁRIA POR CCA... 74

V - CONCLUSÕES..... 81

VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 83

LISTA DE FIGURAS

I- INTRODUÇÃO

I.3 - ESPECTROSCOPIA DE DICROÍSMO CIRCULAR

FIGURA I.3.1: Luz polarizada à direita.....21

FIGURA I.3.2: luz polarizada linearmente resolvida em duas componentes circulares à direita e à esquerda.....22

FIGURA I.3.3: luz plano polarizada ao passar pela amostra que absorve diferentemente duas componentes circulares à direita e à esquerda.....23

FIGURA I.3.4: Dicroísmo Circular e Dispersão Rotatória Ótica.....24

FIGURA I.3.5: Espectro de CD do polipeptídeo GLU na conformação de hélice alfa.....27

FIGURA I.3.6: Espectros de CD de polipeptídeos em folhas beta.....29

FIGURA I.3.7: Dicroísmo Circular de polipeptídeos desordenados 31

I.4 - ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

FIGURA I.4.1: Diagrama de Jablonski.....41

IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO

FIGURA IV.1: Espectro de CD de frutalina nativa e desnaturada.....54

FIGURA IV.2: Gráfico do tempo de estocagem da frutalina contra o tempo de desnaturação.....56

FIGURA IV.3: Espectro de CD das frações nativa, desnaturada, primeiro reenovelamento, segundo reenovelamento e terceiro reenovelamento da frutalina em solução contendo 0,1 M de D-galactose em PBS.....58

FIGURA IV.4 : Intensidade dos máximos das curvas de CD em 203 nm obtidos a partir da FIGURA 3 60

FIGURA IV.5: Espectros de emissão de fluorescência das amostras: nativa, desnaturada, primeiro reenovelamento e terceiro reenovelamento.....62

FIGURA IV.6: Espectros de CD das frações nativa, desnaturada, e várias tentativas de reenovelamento da frutalina sem o congelamento da fração desnaturada na presença de D-galactose.....64

FIGURA IV.7: Detalhe do monômero de jacalina com D-galactose em seu sítio ligante.....66

FIGURA IV.8: Estruturas cíclicas dos monossacarídeos D-galactose e D-glicose.....69

FIGURA IV.9: Estrutura cíclica do monossacarídeo xilose.....66

FIGURA IV.10: Espectro de CD das frações nativa, desnaturada, primeiro reenovelamento, segundo reenovelamento, terceiro reenovelamento e quarto reenovelamento de frutalina em solução contendo 0,1 M de D-glicose em PBS.....70

FIGURA IV.11: Espectro de CD das frações nativa, desnaturada, primeiro reenovelamento, em solução contendo 0,1 M de xilose em PBS.....73

FIGURA IV.12: Simulação do espectro de CD da frutalina nativa.....75

FIGURA IV.13: Cinco curvas puras calculadas pelo programa CCA para a simulação do espectro de CD da frutalina nativa.....76

FIGURA IV.14: Monômero de jacalina com D-galactose em seu sítio ligante.....77

FIGURA IV.15: Simulação do espectro de CD para o segundo reenovelamento da frutalina.....79

FIGURA IV.16: Cinco curvas puras calculadas pelo programa CCA para a simulação do espectro de CD do segundo reenovelamento da frutalina.....80

LISTA DE TABELAS

IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO

TABELA 1:: Relação entre o tempo de estocagem de frutalina nativa e o tempo necessário para a desnaturação da amostra 56

TABELA 2: Valores para os máximos, mínimos e zeros encontrados nas curvas de CD da frutalina 59

TABELA 3: Reação de hemaglutinação com a frutalina nativa, desnaturada e reenovelada 65

TABELA 4: Valores para os máximos, mínimos e zeros encontrados nas curvas de CD da frutalina na presença de D-glicose 0,1M 71

TABELA 5: Frações estimadas de estrutura secundária pelo programa CCA para os espectros de CD da frutalina nativa e do segundo reenovelamento 78

SC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO

LISTA DE ABREVIATURAS

Convex Constraint Analysis	CCA
Dicroísmo Circular	CD
Dispersão ótico rotatória - Optical Rotatory Dispersion	ORD
Erro estimado pelo programa CCA	RMS
Fitohemaglutinina de feijão - *Phaseolos vulgaris*	PHA
Lectina de gérmem de trigo - Wheat germ agglutinin	WGA
Neural Nets	K2D
Nonconstrained Least-squares Analysis	MLR
Ressonância nuclear magnética - Nuclear Magnetic Resonance	NMR
Ressonância Paramagnética eletrônica - Electron Paramagnetic Resonance	EPR
Ribossome Inactivating Proteins	RIP
Ridge Regression Analysis	CONTIN
Singular Value Decomposition	SVD
Solução salina 0,15 M tamponada com fosfato de sódio pH 7,4	PBS
The Self-consistent Method	SELCON

RESUMO

Os estudos sobre o mecanismo de enovelamento das proteínas é o resultado de um estudo intenso utilizando métodos bioquímicos, biofísicos e teóricos. "In vitro", o estado inicial deste estudo é a proteína desnaturada. Neste trabalho, temos estudado o reenovelamento, após desnaturação térmica, de uma glicoproteína denominada frutalina, da família das lectinas. A característica principal desta classe de proteínas é sua habilidade para interagir com carboidratos e, portanto, combinar-se com glicocomponentes da superfície da célula, induzindo suas propriedades biológicas. A frutalina é uma lectina tetramérica extraída das sementes de *Artocarpus incisa*. Ela é ligante de D-galactose e o espectro de CD (dicroísmo circular) de sua estrutura nativa foi identificado como sendo dominado por folhas β. A desnaturação térmica e as etapas do reenovelamento foram monitoradas por espectroscopia de CD, fluorescência e também pela perda da atividade hemaglutinante. As condições de desnaturação utilizadas foram aquecimento à 60 °C por 30 a 60 minutos, dependendo do tempo de estocagem (a -18 °C) da proteína na forma nativa. Os resultados indicaram que o reenovelamento é promovido por um processo de congelamento na presença de PBS contendo 0,1 M de D-galactose seguida por centrífugo-concentração em Centriprep 3. A hemaglutinação positiva ocorreu tanto para a fração nativa quanto para a fração reenovelada. O reenovelamento da frutalina desnaturada também ocorreu com PBS contendo 0,1 M de solução de D-glicose. Quando a forma desnaturada foi concentrada antes do congelamento em PBS sem D-galactose ou em

PBS contendo xilose, o reenovelamento não ocorreu. Estes resultados mostraram que o reenovelamento da frutalina foi dependente da ligação com a D-galactose ou D-glicose, bem como a importância do congelamento para obter a forma biologicamente ativa. A análise da estrututra secundária utilizando o programa CCA forneceu um resultado importante: para a forma nativa da frutalina, obtivemos 85% de folhas β paralelas e antiparalelas, incluindo voltas β, enquanto que para a forma reenovelada obtivemos 73%, mostrando que a estrutura reenovelada, a nível secundário, se aproximou satisfatoriamente da nativa, concordando com os resultados obtidos nos testes de hemaglutinação.

ABSTRACT

Our current understanding of the protein folding mechanism is the result of intense study employing biophysical, biochemical and theoretical methods. "In vitro", the initial state of the protein in this puzzle is its unfolded form. In the present work we have studied the refolding, after thermal denaturation, of the glycoprotein frutalin, a member of the lectin class. The main characteristic of these proteins is their ability to interact with carbohydrates and thus combine with glycocomponents of the cell surface, leading to their biological properties. Frutalin is a tetrameric lectin extracted from the seeds of *Artocarpus incisa*. It is D-galactose specific and its native CD spectrum was identified as being dominated by β-sheet. The thermal unfolding and refolding steps were measured by CD and fluorescence spectroscopies together with the loss of hemagglutinating activity. The unfolding conditions used were 60 °C for 30 to 60 minutes, depending on the protein storage time. The results indicate that refolding is promoted by the freezing process in the presence of 0.1 M D-galactose-PBS followed by three-fold concentration in a Centriprep 3. Positive hemagglutination occurred for both the native and refolded forms. Refolding of denatured frutalin also occurred with PBS containing 0.1 M D-glucose. When the unfolded form was concentrated before freezing in PBS without D-galactose or in PBS containing xylose, refolding did not occur. These results show that the refolding

of frutalin is dependent on the binding of D-galactose or D-glucose, and demonstrate the importance of freezing in order to obtain the biologically activity form. An analysis of secondary structure using the CCA program showed an important result: the native form, presented 85% β-sheet/β-turns, while in the refolded form, this content fell to 73%. These results show that the refolded form is very similar to the native protein, which is in agreement with the hemagglutination results.

I - INTRODUÇÃO

I.1 - O ENOVELAMENTO E REENOVELAMENTO DAS PROTEÍNAS

As proteínas exercem papéis cruciais em todos os processos biológicos, tais como: a catálise enzimática, o transporte de outras moléculas e armazenamento de energia, movimento coordenado dos músculos, sustentação mecânica, proteção imune, geração e transmissão de impulsos nervosos e controle do crescimento e da diferenciação celular. Suas unidades estruturais básicas são os aminoácidos, constituídos basicamente por um grupamento amina, um átomo de hidrogênio, uma carboxila, e uma cadeia lateral R diferenciada. Existem vinte tipos de cadeias laterais que variam em tamanho, forma, carga, capacidade de formação de pontes de hidrogênio e reatividade química.[Voet, 1995]

Estes aminoácidos são unidos por ligações peptídicas, formando cadeias polipeptídicas, e estas cadeias, por sua vez, podem dobrar-se em estruturas normalmente regulares: as hélices α, folhas β pregueadas e voltas β. Estruturalmente, as proteínas têm três níveis: a estrutura primária, a estrutura secundária, a estrutura terciária e a estrutura quaternária.

A estrutura primária é constituída pela cadeia polipeptídica, dividida em cadeia principal (formada pelos átomos que se repetem em todos os aminoácidos: o carbono, o grupo carboxila, o grupo amino e o átomo de hidrogênio) e a cadeia lateral (formada pelos radicais dos aminoácidos). Esta seqüência de aminoácidos é codificada

por genes, sendo necessários três nucleotídeos para cada aminoácido, e as extremidades da cadeia são chamadas C-terminal (a extremidade com o grupo carboxila livre) e N-terminal (a extremidade com o grupo amina livre).

A estrutura secundária é formada por arranjos regulares da cadeia principal, as hélices α, folhas e voltas β, e também estrutura desordenada. A formação de agregados destes elementos da origem à estrutura super secundária. As hélices α são estabilizadas principalmente por pontes de hidrogênio entre os grupamentos CO e NH da cadeia principal, mas também o seu raio permite um outro tipo de interação não covalente: os contatos de Van der Waals através de seu eixo, formando uma estrutura em bastão com as cadeias laterais extendendo-se para fora num arranjo helicoidal. Elas são geralmente encontradas na superfície de proteínas globulares, e geralmente possuem um lado hidrofóbico (apontando para o interior do solvente) e um lado hidrofílico (apontando para o exterior do solvente).

As folhas β, formadas por fitas β ligadas por pontes de hidrogênio entre suas cadeias principais, são muito diferentes das hélices α pois a cadeia principal está quase que completamente distendida, e não fortemente enrolada como nas hélices. Além disso as folhas podem ter tamanhos variados em altura e largura, o que torna sua estrutura mais complicada. As folhas podem ser paralelas (quando as cadeias adjacentes estão na mesma direção), ou antiparalelas (quando estão em direções opostas). As paralelas geralmente são encontradas no interior das proteínas, suas fitas são conectedas por hélices e "loops" (estruturas grandes sem nenhuma regularidade que ligam os elementos de estrutura secundária), e esta folha pode ser encontrada na forma de barril (quando está fechada) ou na forma de sela (aberta). Já as folhas antiparalelas, são encontradas na superfície das proteínas, com várias geometrias

possíveis, podendo formar folhas mistas. Além destes elementos, temos os "turns" (ou voltas) que são utilizados para dobrar a cadeia principal formando uma curva fechada, e são pequenos, formados apenas por quatro resíduos de aminoácidos. Temos também a estrutura desordenada, que são cadeias sem nenhuma estrutura regular.

Como alguns exemplos de estrutura super secundária temos: "coiled coil" (duas hélices α paralelas); motivo "EF-Hand" (duas hélices quase perpendiculares ligadas por um loop) e hélice-volta-hélice que são alguns dos enovelamentos do tipo "toda alfa"; grampo-de-cabelo (duas folhas antiparalelas); chave grega (quatro fitas antiparalelas mais um "grampo-de-cabelo" e meio); barril "up and down" (oito fitas antiparalelas) e rocambole (barril com quatro conexões atravessando-o) que são alguns dos vários enovelamentos tipo "toda β"; β-α-β; Rossmann fold (β-α-β-α-β); barril Tim (formado por hélices e folhas) e folhas abertas (com hélices dos dois lados da folha β) que são alguns dos motivos do tipo α/β (regiões interconectadas). Além disso temos os motivos $\alpha+\beta$, onde as regiões α e β estão separadas na proteína.[Branden e Tooze, 1991]

O próximo nível estrutural é a estrutura terciária, que é o arranjo tridimensional dos elementos citados anteriormente, resultando na formação do monômero, que pode conter tanto interações não covalentes (interações hidrofóbicas e eletrostáticas) quanto interações covalentes (ponte de sulfetos). Nesta estrutura já pode estar presente o sítio ligante da molécula, a região que irá interagir com uma outra molécula, ou bactéria, ou outro organismo, para que seja cumprida a função biológica da proteína. Este sítio encontra-se normalmente localizado no interior da proteína, nos chamados "bolsões hidrofóbicos". Porém, algumas proteínas necessitam de mais de uma destas unidades para ser biologicamente ativa, e neste caso, estamos

entrando na estrutura quaternária das proteínas. Este nível estrutural compreende a associação dos monômeros, formando dímeros, trímeros ou tetrâmeros, por interações covalentes ou não.

Partindo da cadeia polipeptídica vimos que existem inúmeras possibilidades de arranjos tridimensionais diferentes, e entender como ocorre o enovelamento de proteínas continua sendo um dos problemas mais interessantes da natureza. É importante saber como e porque as proteínas adotam um enovelamento específico, entre todos os possíveis, e só neste têm atividade biológica. O pesquisador Christian Anfisen, que com o trabalho com a ribonuclease iniciou os estudos sobre o enovelamento na década de 60, escreveu: "*Veio-me à mente há pouco tempo ser de fato possível considerar a seqüência de uma molécula proteica, a ponto de se enovelar para uma forma geométrica precisa, como uma linha melódica escrita em forma canônica e projetada pela Natureza para dobrar-se, criando acordes harmônicos de interação compatíveis com a função biológica...*"

A elucidação desses processos será uma ferramenta muito útil para o desenho de drogas e/ou mecanismos que possam interferir com a atividade da proteína em questão. Ainda, o entendimento de como ocorre o enovelamento de proteínas poderá esclarecer o processo de organização celular, das causas e do controle das anormalidades de tais organizações.

Atualmente é conhecida a estrutura tridimensional de um grande número de proteínas e estes estudos mostram que as proteínas podem adotar o mesmo enovelamento tendo seqüências muito diferentes, sugerindo que o número de enovelamentos seja limitado, provavelmente, a poucas centenas de tipos [Wang, 1996]. Isso implica que, se fosse desenvolvido um método para se enovelar uma

proteína de uma certa família, o enovelamento dos demais representantes desta mesma família estaria determinado. Os estudos sobre enovelamento de proteínas "in vitro" podem ser abordados de duas maneiras: monitorando-se a expressão de proteínas em microorganismos, pela tecnologia de DNA-recombinante ou desnaturando-se uma proteína, por processos físicos ou químicos, e acompanhando seu reenovelamento. Em ambos os casos ocorre uma formação progressiva de interações dentro da proteína que podem ser influenciadas pelo solvente [Itzhaki e Evans, 1996; Timasheff, 1993].

Durante muito tempo, o paradoxo de Levinthal [Levinthal, 1968], foi o mecanismo dominante sobre os sugeridos para o enovelamento das proteínas. De acordo com ele, haveria uma etapa lógica e rápida que definiria caminhos para simplificar a escolha do enovelamento correto, pois a procura casual demoraria uma eternidade, já que são inúmeros os modos possíveis de enovelamento de uma proteína, mesmo que ela seja constituída por poucos resíduos.

As idéias sobre o enovelamento foram e têm sido mudadas drasticamente neste últimos anos graças aos avanços nas áreas de Espectroscopia e Biologia Molecular, e temos hoje vários modelos propostos sobre estes mecanismos. Um dos primeiros modelos foi o modelo "framework" [Ptitsyn, 1973], cuja proposta é de que elementos de estrutura secundária poderiam se formar independentemente da estrutura terciária. No modelo de difusão-colisão [Karplus e Weaver, 1994], estes elementos se difundiriam, colidiriam, unindo-se de maneira eficaz para resultar na estrutura terciária. Estes dois modelos sugerem que há necessidade de formas intermediárias para que ocorra o enovelamento.

Há também o modelo de colapso hidrofóbico [Dill *et al.*, 1995; Ptitsyn, 1996], que sugere um colapso rápido da proteína ao redor de suas cadeias laterais hidrofóbicas, ocorrendo um rearranjo para um espaço conformacional restrito ocupado por um intermediário. Este mecanismo promove um acúmulo de intermediários que, teoricamente, podem diminuir as reações de enovelamento [Sosnick, 1994; Creighton, 1995; Fersht, 1995].

A descoberta de pequenas proteínas que se enovelam rápida e simplesmente promoveu o desenvolvimento de um outro modelo: o modelo de dois estados. Neste não há a presença de estados intermediários, sendo esta simplicidade um problema no que diz respeito à análise dos mecanismos de enovelamento. A solução de qualquer mecanismo requer a determinação do caminho da reação tanto dos reagentes e produtos quanto dos estados de transição e dos intermediários. No caso deste modelo há apenas um estado simples a ser considerado entre os estados nativo e desnaturado: o estado de transição. Nestes estudos, feitos utilizando métodos de engenharia de proteínas, as estruturas primárias são modificadas por mutagênese sítio-dirigida, em regiões que causem pequenas mudanças na proteína, e principalmente, que removam interações que estabilizem a estrutura da proteína nativa. Faz-se então, um estudo da cinética do enovelamento e as custas dessas pequenas proteínas é possível analisar unidades básicas de enovelamento, denominadas "foldons" [Panchenko *et al.*, 1996].

Um modelo de enovelamento clássico, é a nucleação. Aqui alguns resíduos da seqüência, localizados próximos fisicamente, poderiam formar uma estrutura secundária como na proteína nativa que atuaria como um núcleo, a partir do qual a estrutura se propagaria em várias etapas até a formação da estrutura nativa final. A

estrutura terciária se formaria como conseqüência necessária, não havendo então, formas intermediárias.

Já na nucleação - condensação, modelo sugerido para melhorar a nucleação clássica, o núcleo não é pequeno e formado num estado fundamental, mas sim grande e difuso, desenvolvido num estado de transição. Esse núcleo é composto tanto pelos resíduos próximos, na estrutura secundária local, quanto por faixas longas de seqüência com interações terciárias que são necessárias para estabilizá-lo [Anfisen, 1973; Fersht, 1997]. O núcleo não é completamente formado no estado de transição, mas continua em desenvolvimento até o enovelamento, sugerindo um processo cooperativo. Estudos teóricos mostram que este mecanismo é particularmente eficiente para iniciar o enovelamento [Abkevich et al., 1994; Guo e Thirumalai, 1995; Gutin *et al.*, 1995; Thirumalai, 1995; Thirumalai e Guo, 1995]. Fazendo uma analogia com o processo de atuação enzimática, podemos dizer que, assim como são encontrados resíduos envolvidos na catálise não pertencentes ao sítio ativo [Fersht, 1987], o núcleo do enovelamento estaria também "deslocalizado" na proteína. Então regiões que teriam alta probabilidade de formar a estrutura nativa se formariam e contactariam regiões mais distantes, dominando o processo da procura. A formação deste núcleo "esticado" pode representar um forte balanço a favor das interações locais, além da mínima acumulação de intermediários, pois o núcleo não é construído somente em um estágio de transição.

Em proteínas mais complexas podem ser encontrados sítios de nucleação alternativos caso o principal seja destruído [Viguera *et al.*, 1996]. Um núcleo particular não é indispensável, ele é simplesmente uma parte da proteína "melhor arranjada" num determinado estágio de transição, e por isso o núcleo pode ser

variável [Itzhaki *et al.*, 1995; Neira *et al.*, 1996]. Nas proteínas maiores, o processo é mais complicado Podem ser construídos módulos de "foldons" (unidades básicas de enovelamento) que enovelam-se separadamente por nucleação - condensação, resultando em um enovelamento por multinucleação. O mesmo raciocínio pode ser estendido para o caso do reenovelamento das proteínas desnaturadas. Se um trecho da proteína mantém-se na condição de sítio de nucleação, pode-se promover o reenovelamento mais facilmente.

Como muitas proteínas com sequência de aminoácidos diferentes têm uma arquitetura geral similar, a estrutura tridimensional das proteínas não é determinada apenas pela seqüência de aminoácidos, mas esta estrutura pode ser formada antes do enovelamento completo por um empacotamento rígido das cadeias laterais. Este estado intermediário foi proposto e chamado de "molten globule" [Ptitsyn, 1996]. Este estado, que tem algumas características como, ser compacto, com estrutura secundária pronunciada, e ausência de estrutura terciária rígida, foi bem estabelecido, e foi demonstrado que ele pode ter um arranjo terciário tal como na proteína nativa. Foi sugerido também que o núcleo do enovelamento possa consistir mais de resíduos fortemente empacotados do que resíduos atraídos uns pelos outros por interações hidrofóbicas não específicas ou casuais.

Baseados em dados de uma variedade de proteínas estudadas observou-se as seguintes etapas comuns no enovelamento das proteínas:[Mathews, 1993].

1.A proteína desnaturada se colapsa numa forma mais compacta, não polar, e forma alguma estrutura secundária, porém com pouca estabilidade termodinâmica (estado de "molten globule");

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO

2.Há o desenvolvimento da estrutura secundária e início da terciária, de forma que elementos, tais como estão na forma nativa da proteína, aparecem na forma de subdomínios. "Loops", periferias de hélices e dobras das folhas β ainda não estão bem definidos nesta fase;

3.Formação de interações não covalentes na proteína, constituindo o estágio final. O empacotamento interior é solidificado, a forma final da estrutura secundária e da superfície são colocadas no lugar.

Estes estágios de enovelamento são comuns para uma variedade de proteínas, e a proposta de que o enovelamento ocorra em estágios organizados, leva à possibilidade de se desenvolver etapas seguindo um padrão similar, podendo-se utilizar resultados obtidos em experimentos de reenovelamento.

A importância no estudo destes processos tem sido confirmada nos trabalhos que se seguem:

- β-lactoglobulina A bovina: Uma rápida elevação de temperatura de -4 a 2 °C, promoveu um reenovelamento rápido desta proteína, monitorado por dicroísmo circular. Foi observada a ocorrência de estados estruturais intermediários entre os estados nativo e desnaturado, com duas importantes observações: primeira, que o estado de transição da desnaturação não pode ter estrutura próxima à do estado nativo, e segunda que a transição entre o estado desnaturado e um estado intermediário é mais lenta do que a transição entre este estado intermediário e o estado enovelado da proteína. Uma outra conclusão interessante a respeito do processo de reenovelamento é que 10 milisegundos após o início do processo há uma diminuição considerável na exclusão de solvente ficando a região hidrofóbica

mais protegida. Sugere-se que ocorra uma contração da molécula durante este processo [Nölting, 1996]

- Lisozima de clara de ovos: neste trabalho foram analisados por espectroscopia de fluorescência, os efeitos ocorridos na cinética do reenovelamento pela troca de H_2O por D_2O no solvente. Duas fases distintas no reenovelamento, foram alteradas diferentemente em D_2O quando comparadas com H_2O. As diferenças de viscosidade entre os tampões com H_2O e D_2O não explicavam as alterações, porém as mudanças no ambiente dos grupos aniônicos no enovelamento estão ligadas a uma contribuição do efeito do isótopo [Itzhaki e Evans, 1995].

  Ainda em se tratando da lisozima, outro trabalho interessante é a cromatografia em coluna de filtração molecular sendo utilizada para promover o reenovelamento da lisozima em grandes concentrações. Este processo baseia-se na interação da proteína nas formas nativa e desnaturada com a matriz da coluna e nas suas diferentes características hidrodinâmicas. O trabalho propõe que a cromatografia funcione, neste caso, como um mecanismo inicial (sítio de interação) para o reenovelamento da lisozima quando desnaturada com cloreto de guanidina.[Batas et all., 1996]

- Interleucina-β: foi detectado, utilizando espectroscopia de fluorescência e dicroísmo circular, a formação de um estado intermediário parcialmente enovelado. Propôs-se então que, para a formação da proteína nativa, há necessariamente um estado de conformação intermediária entre o nativo e o desnaturado, sendo este então um modelo de três estados

$$U \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} I \xrightarrow{k_2} N$$

onde: k_1 = velocidade de reação de desenovelamento para o estado intermediário

k_{-1} = velocidade de reação do estado intermediário para o estado nativo

k_2 = velocidade de reação de desenovelamento para o estado intermediário

[Heidary *et al.*, 1997]

- Proteína receptora de cAMP de *Escherichia coli*: Esta proteína está envolvida no processo de regulação da vários genes de *Escherichia coli*, sendo portanto de grande interesse a determinação da interação entre as subunidades da proteína e o cAMP. Com este objetivo, foi estudada a desnaturação reversível da proteína, após desnaturação com hidrocloreto de guanidina. O processo de desnaturação e reenovelamento foi acompanhado por medidas dinâmicas de fluorescência (espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo). Os resultados indicaram que a desnaturação e o reenovelamento da proteína se dá em três estágios: um primeiro no qual a proteína está enovelada e na forma de dímero; um segundo no qual se tem os monômeros enovelados e um terceiro no qual os monômeros se encontram desnaturados. [Malecki and Wasylewski, 1996]

Nosso grupo vem desenvolvendo estudos sobre a estabilidade estrutural de uma classe especial de proteínas, as lectinas, quando submetidas à processos físicos e químicos de desnaturação. Alguns dos trabalhos tratam, por exemplo, do isolamento e da caracterização parcial de lectinas de sementes, estudos estruturais e termodinâmicos de lectinas, inclusive com a monitoração da atividade biológica e estudos de reenovelamento de lectinas [Moreira *et al.*, 1997; Silva-Lucca *et al.*, 1997a; Monteiro *et al.*, 1995; Campana *et al.*, 1997a].

I.2 - AS LECTINAS

O início dos estudos mais freqüentes com as lectinas foi na década de 60, quando foram demonstradas as suas propriedades como reagentes extremamente úteis para o isolamento de glicoproteínas, para a caracterização de monossacarídeos, bem como para a monitoração de mudanças que ocorrem na superfície das células em processos de desenvolvimento, em processos patológicos ou de diferenciação [Sharon e Lis, 1993]. As lectinas têm sido identificadas como moléculas mediadoras no reconhecimento celular em vários processos biológicos; isso porque as células reconhecem qualquer outro par que interaja com elas (outra célula, vírus, bactérias ou protozoários) através da complementariedade dos carboidratos contidos em sua superfície e as lectinas, por sua vez, têm como sua principal característica a habilidade de ligar carboidratos de maneira rápida, seletiva e reversível.

As lectinas são proteínas, que podem ou não ter carboidratos ligados à sua estrutura, presentes em uma grande variedade de organismos (vírus, plantas, animais) e, dependendo do local em que elas se encontram no organismo, podem ser responsáveis por determinada função biológica. As lectinas vegetais e animais têm mostrado estruturas secundária e terciária similares, ainda que estas não apresentem homologia significativa em suas seqüências primárias. Como um exemplo, podem ser citadas as galectinas e as soro amilóides P (SAP), ambas lectinas do tipo C encontradas em células animais [Liao *et al.*,1994; Emsley *et al.*,1994], que têm estrutura semelhante à Concanavalina A, extraída de *Concanavalia brasiliensis* [Reeke *et al.*, 1975].

A maioria das lectinas tem especificidade por monossacarídeos, mas também se ligam a oligossacarídeos. Além disso, lectinas que ligam especificamente o mesmo monossacarídeo podem interagir diferentemente com carboidratos da superfície celular.

As lectinas vegetais foram as primeiras a serem estudadas, pois os processos de isolamento são relativamente simples e elas são abundantes na natureza. Esta classe de proteínas está relacionada com mecanismos de defesa dos vegetais e também podem ser encontradas como proteínas de reserva.

As plantas não possuem sistema imunológico para protegê-las dos ataques de bactérias e demais microrganismos e, sendo imóveis, também não podem escapar de ataques dos predadores. Sendo assim, o mecanismo de defesa das plantas constitui-se basicamente de um sistema ativo e um passivo. O sistema ativo é constituído de uma reação hipersensitiva que necrosa rapidamente o local infectado, impedindo que o patógeno infecte e contamine outras partes da planta Juntamente com esta necrose, as células que circundam a infecção sintetizam tanto proteínas específicas quanto compostos de baixo peso molecular com potencial atividade antibiótica. O sistema passivo de defesa, constitui-se de barreiras físicas e adaptações morfológicas, bem como de um sistema bioquímico com proteínas e compostos de baixo peso molecular que são tóxicos e estão presentes em vários tecidos das plantas. Neste sistema encontram-se as lectinas que contém uma propriedade geral da maioria das proteínas envolvidas em sistema de defesa: extrema estabilidade à condições que normalmente inativariam outras proteínas, tais como: variação de pH, estabilidade à ação de enzimas proteolíticas e ao aquecimento [Peumans e Van Damme, 1995]. A ação das lectinas como elementos de defesa em plantas vem sendo demonstrada

sistematicamente com as RIPs (Ribossome Inactivating Protein) tipo II, lectinas cuja ação tóxica é letal aos animais superiores, através da inativação do ribossoma. A cadeia B (na qual se encontra a parte lectínica) se liga aos receptores da superfície celular promovendo a entrada da cadeia A (que contém a atividade citotóxica). Uma vez dentro da célula, as RPIs clivam o RNA ribossômico impedindo que a célula sintetize mais proteínas, causando sua morte. Esta classe tem como principais representantes a ricina (de *Ricinus comunis*), a abrina (de *Abrus precatorius*), e a ebulina (de *Sambucus ebulus*) [Barbieri *et al.*, 1993].

Outras lectinas de sementes também exercem ação tóxica (mortal apenas em grandes quantidades) em animais superiores, como a PHA (fitohemaglutinina) de feijão-*Phaseolus vulgaris*, lectina de soja (*Glycine max*), lectina de "jack bean" (*Canavalia ensiformis*), de figueira-brava (*Datura stramonium*) e a WGA (lectina de gérmen de trigo). Lectinas com ação tóxica também são encontradas em outras partes dos vegetais como as de rizoma de urtiga (*Urtica dioica*) e de bulbo de *Galanttus nivalis*. Estas lectinas sobrevivem às condições altamente desnaturantes do trato digestivo dos animais e ligam-se à mucosa intestinal, causando sérias irritações às paredes do intestino. No caso da PHA, experimentos mostraram que ela ataca as células ciliadas do intestino, em seguida é endocitada pelas células epiteliais induzindo uma atividade metabólica que causa hiperplasia (crescimento celular desordenado) e hipertrofia (crescimento desordenado dos órgãos) no intestino. Assim o papel destas lectinas na defesa das plantas está exatamente no fato de que este ataque ao intestino causa um terrível desconforto no animal após a ingestão, como náuseas, vômitos e diarréia, fosçando-o a procurar uma outra fonte de alimento.

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO

Lectinas com ação inibidora da mobilidade bacteriana podem impedir os movimentos quimiotáticos de bactérias do solo até a semente que está germinando, protegendo assim as jovens raízes do ataque de microrganismos. Esta imobilização ocorre devido à interação das lectinas de sementes com carboidratos da superfície celular das bactérias O exemplo mais conhecido é a lectina extraída das sementes da figueira-brava (*Datura stramonium*), que imobiliza drásticamente diferentes espécies de bactérias [Broekaert e Peumans, 1986].

Lectinas do gérmen de trigo (*Triticum aestivum*), da batata (*Solanum tuberosum*), do amendoim (*Arachis hypogea*), da figueira-brava (*Datura stramonium*), da *Maclura pomifera*, e do feijão (*Phaseolus vulgaris*), têm ação inibitória sobre o desenvolvimento da larva do "caruncho" (*Callosobruchus maculatus*) após a ingestão da polpa das sementes. É sugerido que as lectinas que são específicas na ligação em quitina (um homopolímero de glicose) poderiam ligar-se à membrana das células epiteliais do trato digestivo dos insetos, alterando a estrutura da membrana ou até mesmo alterando sua formação. Elas também poderiam interagir com enzimas proteolíticas do trato digestivo já que algumas lectinas possuem sítios de interação com enzimas proteolíticas, ou poderiam ainda inibí-las [Silva-Lucca , 1997b; Peumans e Van Damme, 1995].

Outras lectinas como a WGA (wheat germ agglutinin) inibem a germinação dos esporos e o crescimento das hifas do fungo *Trichoderma viride*, enquanto a heveína (lectina da seringueira - *Hevea brasileiensis*) inibe o crescimento do fungo *Botrytis cinerea* interferindo na síntese ou na deposição de quitina na parede celular do mesmo.

As lectinas vegetais também podem ser proteínas de reserva dependendo de sua localização. Alguns exemplos são as lectinas de raízes (batata; Allen, 1983), de bulbos (tulipas das famílias Amaryllidaceae e Alliaceae; Cammue *et al.*, 1986 e Van Damme *et al.*, 1991), de rizomas (*Aegopodium podagraria, Urtica dioica*; Peumans *et al.*, 1984, 1985), de folhas e caule (plantas tipo visco; Franz, 1989).

Na agricultura fica clara a importância fundamental do estudos das lectinas, uma vez que, com o avanço da engenharia genética tornou-se possível inserir genes nas plantas tais como aqueles que codificam lectinas, aumentando as defesas vegetais contra várias pragas.

A diversidade dos fenômenos em que as lectinas vegetais estão envolvidas, tanto na própria planta, quanto em atividades "in vivo" e "in vitro" envolvendo fenômenos celulares, faz delas uma classe de proteínas bastante empregada em biotecnologia. Aspectos sobre o reconhecimento de carboidratos na superfície celular, bem como a estrutura destes, vêm sendo ostensivamente estudados durante as duas últimas décadas, sendo as lectinas o foco destes processos. Devido à sua especificidade e seletividade para ligar carboidratos, as lectinas estão envolvidas nos mecanismos de reconhecimento celular pois estes são dependentes dos açúcares de superfície. Esta propriedade vem sendo muito aplicada nas pesquisas sobre a arquitetura e dinâmica dos carboidratos da superfície da célula durante a divisão e diferenciação celular. Assim, as lectinas vegetais têm sido utilizadas como ferramentas no entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos em muitos fenômenos biológicos [Sharon, 1993].

Um desses fenômenos é o mecanismo de infecções bacterianas. É conhecido que as infecções são mediadas por lectinas de superfície da célula da bactéria que

interagem com os açúcares complementares à elas, localizados na superfície da célula hospedeira, promovendo a infecção. A partir daí, tem-se estudado a possibilidade de impedir a adesão através de drogas contendo lectinas (ou seu açúcar ligante) que ocupem o sítio ligante da célula hospedeira (ou da bactéria) impedindo assim, a infecção bacteriana [Sharon e Lis, 1993].

As lectinas também têm sido utilizadas na caracterização de processos celulares malignos, tais como: no reconhecimento de células anormais que contém em sua superfície carboidratos que não são encontrados nas células normais [Sharon e Lis, 1989], nos estudos de indução da migração de neutrófilos e sua adesão ao endotélio [Santos -Oliveira *et al.*, 1994] e na utilização como imunoterápicos. Neste caso, podem ser citadas como exemplo as lectinas do tipo RIP com especificidade por células tumorais, infectadas por vírus HIV ou mesmo contra doenças auto imunes [Barbieri *et al.*, 1993].

Ainda, lectinas isoladas de Orchidaceaea, Alliaceae e Moraceae são utilizadas como: inibidores de retrovirus, matrizes em cromatografias de afinidade para isolamento da proteína GP 120 do vírus HIV [Hester *et al.*, 1995], de imunoglobulinas, de receptores, de hormônios, e de neurotransmissores [Roque-Barreira *et al.*, 1984].

Lectinas oriundas de várias famílias vegetais têm sido estudadas a níveis estruturais e biotecnológicos, como as acima citadas. Dentro destas famílias situam-se as lectinas extraídas das Moraceae, do gênero *Artocarpus*, que vêm apresentando propriedades interessantes. A partir das sementes de *Artocarpus integrifolia* isolou-se a Jacalina e a KM+ [Santos-Oliveira, 1994; Roque-Barreira *et al.*, 1986]. A Jacalina, cuja estrutura cristalográfica foi recentemente resolvida [Sankaranarayanan *et al.*,

1996], desperta especial interesse como ferramenta biotecnológica por ser ligante do anticorpo Ig-A, linfócito CD-4 e de células tumorais. A KM+, por sua vez, induz a migração de neutrófilos "in vivo" e "in vitro" e também inibe a ação da tripsina "in vitro" [Santos-Oliveira, 1994; Silva-Lucca *et al.*, 1997b]. Aspectos fisico-químicos sobre a KM+ como estabilidade estrutural a níveis de estrutura primária, secundária, cristalográfica e modelagem molecular estão sendo desenvolvidos em nosso departamento [Oliveira *et al.*, 1997, Rosa *et al.*,1997; Silva-Lucca *et al.*, 1997a].

A partir de sementes de *A. incisa* isolou-se a lectina Frutalina [Moreira *et al.*, 1997] que apresentou forte atividade hemaglutinante, sendo três vezes mais reativa que a Jacalina. Ambas são ligantes de D-Galactose porém, este açúcar inibe pouco suas atividades.

A Frutalina é inibida por asialofetuína, uma glicoproteína contendo ácido siálico em sua estrutura, sugerindo que seja mais complexa no que diz respeito à especificidade. Esta lectina pode então ser classificada no grupo geral das lectinas ligantes de D-Galactose. A Frutalina foi isolada do extrato salino das sementes da *Artocarpus incisa* em coluna de afinidade contendo D-Galactose imobilizada. Esta lectina não necessita de metais para a sua atividade hemaglutinante, tem peso molecular aparente de 48-49 kDa, é constituída por quatro monômeros reunidos por interações não covalentes e seu espectro de dicroísmo circular é característico de proteína com folha beta pregueada [Moreira *et al.*, 1997].

Ainda mostrou-se estável frente à ação de agentes químicos desnaturantes, sendo também desnaturada a 60 °C por 30 minutos [Campana *et al.*,1997b;].

Resultados preliminares obtidos em nosso laboratório indicavam que esta proteína, após ter sido desnaturada e concentrada, tinha sua atividade biológica

revertida [Monteiro *et al.*, 1995]. Assim, nosso trabalho consistiu em investigar cuidadosamente estes resultados acompanhando o processo de desnaturação e reenovelamento da Frutalina por duas técnicas espectroscópicas (Espectroscopia de Dicroísmo Circular e a Espectroscopia de Fluorescência). Estas são ferramentas de grande utilidade para estudos de mudanças conformacionais. Resulados parciais destes estudos foram apresentados em congressos nacionais e internacionais em 1997 [Campana *et al.*, 1997a e 1997b].

I.3 - ESPECTROSCOPIA DE DICROÍSMO CIRCULAR (CD , "CIRCULAR DICHROISM")

A espectropolarimetria baseia-se no desvio da luz circularmente polarizada incidente em compostos quirais (ou assimétricos). Esta espectroscopia também é conhecida como quiróptica, pois o fenomêno só ocorre em compostos que têm esta propriedade [Nakanish *et al.*, 1994; Fasman, 1996; Bayley, 1969].

A luz circularmente polarizada desempenha um papel decisivo na espectroscopia de dicroísmo circular. Um feixe de luz circularmente polarizado, consiste de dois feixes de onda plana, linearmente polarizados, ortogonais entre si e fora de fase por 90° (FIGURA I.3.1). A onda polarizada linearmente pode ser decomposta em duas componentes individuais circularmente polarizadas uma à esquerda e outra à direita, como pode ser visto na FIGURA I.3.2.

DE BIBLIOTECA
INFORMAÇÃO

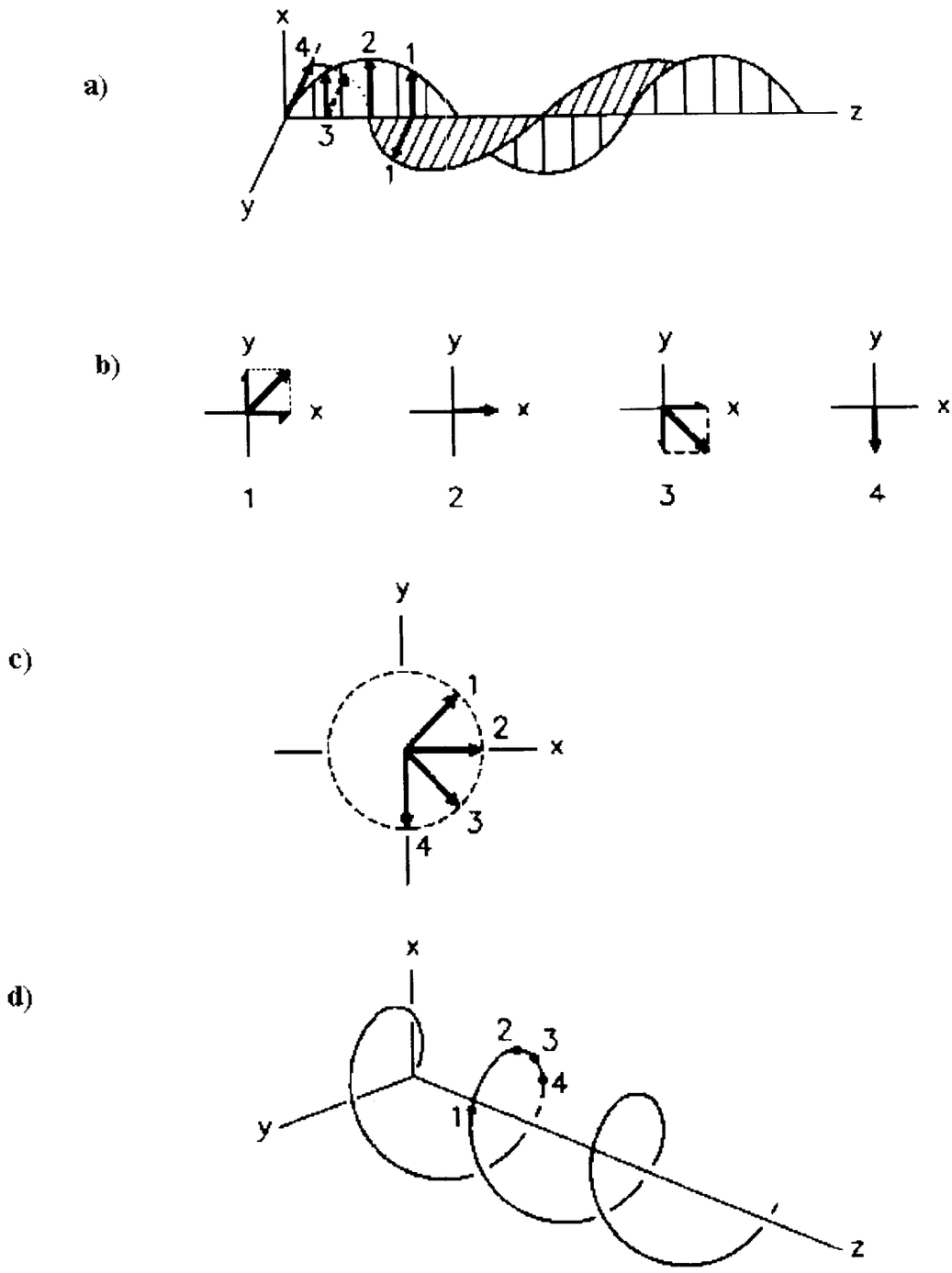


FIGURA I.3.1: Luz polarizada `a direita. Em (a), têm-se vetores elétricos ortogonalmente polarizados e 90° fora de fase. Em (b), têm-se as resultantes da soma das duas ondas nos pontos 1,2,3 e 4 vistas na direção do eixo z. No item (c) os vetores soma projetados num plano perpedicular a z, demonstrando o caminho circular da onda quando visto ao longo da direção de propagação e, por fim no item (d), a representação da luz circularmente polarizada, mostrando o vetor campo elétrico como função da posição.[Fasman, 1996]

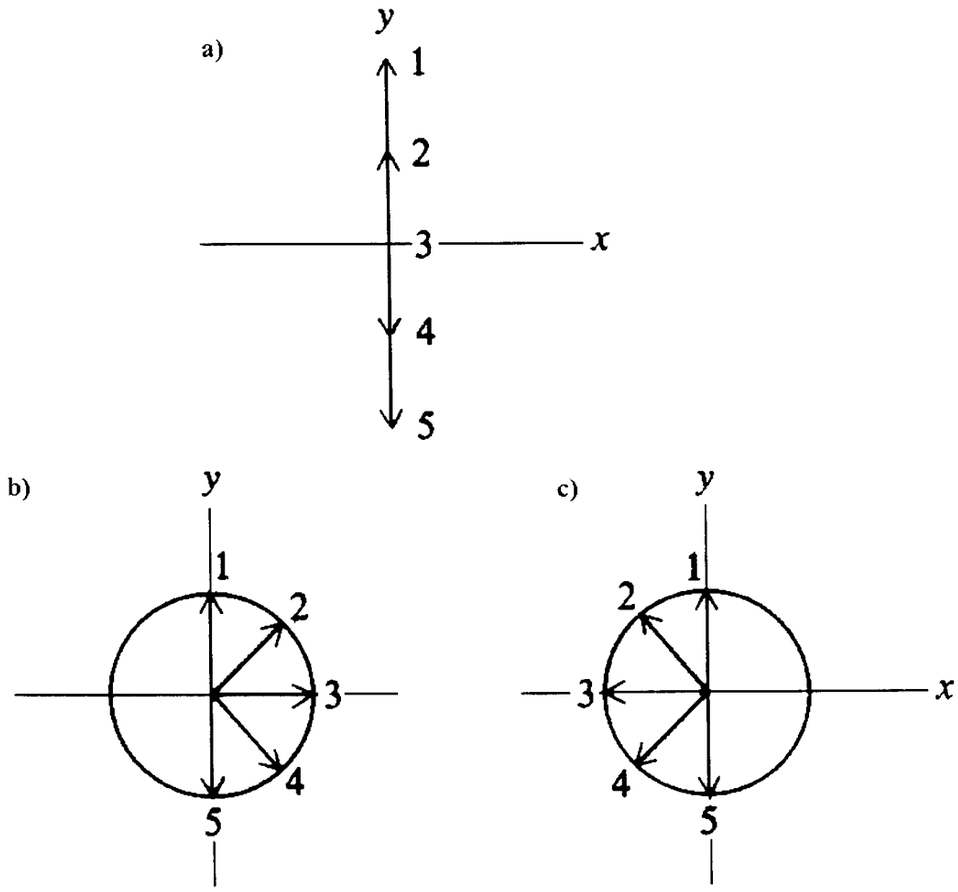


FIGURA I.3.2: a) luz polarizada linearmente, b) e c) resolução da luz polarizada linearmente em duas componentes circulares à direita e à esquerda. [Cantor e Schimel, 1942]

Esta luz, passando por uma substância assimétrica (amostra) é absorvida, e cada componente (circular à direita e circular à esquerda) interage diferentemente devido à absortividade intrínseca dos diferentes compostos (FIGURA I.3.3).

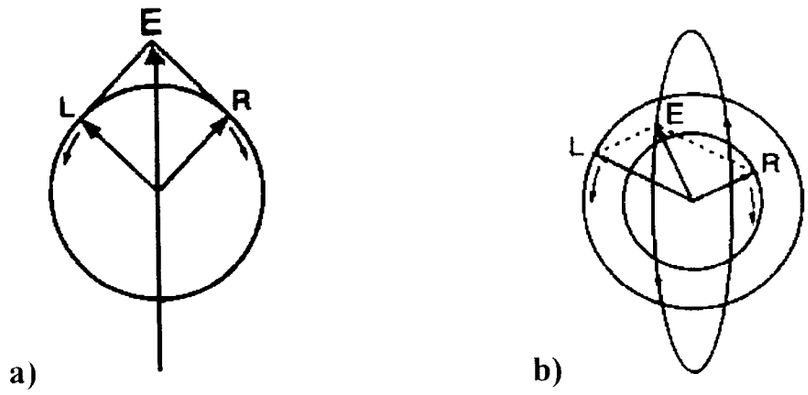


FIGURA I.3.3:a) antes de incidir na amostra tem-se a luz plano polarizada resolvida em duas componentes circulares `a direita (R) e `a esquerda (L). b) ao passar pela amostra que absorve diferentemente as duas componentes. R e L terão tamanhos diferentes. Se a componente R é menos intensa que L o vetor campo elétrico tem a resultante elíptica mostrada na figura.[Nakanish *et al.*, 1994]

Assim, o dicroísmo circular é definido como a diferença entre a absorção das componentes polarizadas à esquerda e à direita (ΔA). Para se calcular o ΔA, utiliza-se a lei de Beer-Lambert-Bouguer onde I_0 é a intensidade da luz que incide na amostra e I a intensidade da luz ao deixar a amostra. A absorbância é definida como:

$$A = \log_{10} (I_0/I)$$

Aplicando a lei para ambos os feixes circularmente polarizados:

$$A_e = \log_{10} (I_0/I_e) \qquad A_d = \log_{10} (I_0/I_d)$$

onde e = componente circularmente polarizada à esquerda

d = componente circularmente polarizada à direita

O Cálculo de ΔA será:

$$\Delta A = A_e - A_d = \log_{10} (I_0/I_e) - \log_{10} (I_0/I_d) = \log_{10} (I_e/I_d)$$

A absorbância também pode ser escrita em função do caminho ótico l, da concentração da solução c, e da capacidade de absorção dos compostos, chamada de coeficiente de absorção molar, ou coeficiente de extinsão molar ε, assim:

$$A = \varepsilon cl, \qquad e \qquad \Delta\varepsilon = (1/cl)\,\Delta A,$$

onde $\Delta\varepsilon$ é definido como ε_l (coeficiente de extinsão molar à direita) − ε_r (coeficiente de extinsão molar à esquerda)

Ao passar pela molécula a luz plano polarizada é convertida em luz elipticamente polarizada. Quando os vetores campo elétrico das duas componentes circulares estão na mesma direção sua soma resulta no semi-eixo maior da elipse, e quando estão em direções opostas sua soma resulta no semi-eixo menor. Desta forma o CD pode ser caracterizado pela razão entre os dois semi-eixos, que é a tangente de um ângulo θ chamado elipticidade. Como θ é sempre um ângulo muito pequeno, a tangente de θ pode ser aproximada para θ (FIGURA I.3.4).

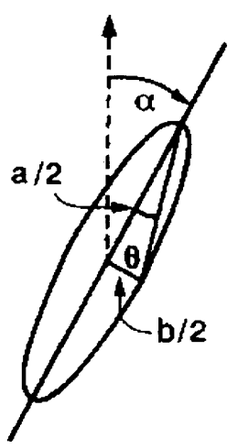


FIGURA I.3.4: O ângulo θ é a elipticidade cuja tangente é a razão entre os eixos menor e maior da elipse; o ângulo α é a dispersão rotatória óptica (ORD, "Optical Rotatory Dispersion"), formado pela inclinação da luz antes de passar pela amostra e o eixo central da elipse após passar pela amostra.[Nakanish *et al.*, 1994]

Desta forma temos:

$$\theta \text{ (rad)} \sim \text{tg}(\theta) = (|E_l| - |E_r|) / (|E_l| + |E_r|)$$

$$= [\exp(-A_l/2) - \exp(-A_r/2)] / [\exp(-A_l/2) + \exp(-A_r/2)]$$

que, expandindo as exponenciais, ignorando os termos de menor ordem e convertendo em graus, temos:

$$\theta \text{ (graus)} = 180 \,.\, \ln 10 \,.\, \Delta A/4\pi$$

Esta elipticidade é proporcional ao CD de forma que:

$$\theta = 32{,}98\ \Delta A$$

A elipticidade também tem uma dependência linear com o caminho ótico e com a concentração da solução, que define a elipticidade molar como sendo:

$$[\theta] = 100\ \theta/cl$$

Por razões históricas, (no século passado não haviam balanças muito precisas), a concentração c era dada por $g/100cm^3$, e a elipticidade molar em $deg.cm^2.g^{-1}$. Para corrigir as unidades temos, então a equação multiplicada por 100.

Que pode ser escrita como:

$$[\theta] = 100.32{,}98\ (\Delta A\ /cl)$$

$$[\theta] = 3298\ \Delta\varepsilon$$

Instrumentos de CD modernos fazem medidas de ΔA (que são geralmente muito pequenos), entretanto, o método original de medidas de CD [Lowry, 1935] era em elipticidade molar.

Outra medida espectropolarimétrica também aplicada à peptídeos e proteínas, é a dispersão rotatória óptica (ORD, "Optical Rotatory Dispersion"), que mede a rotação ótica como função do comprimento de onda. Ela foi muito utilizada há algumas décadas. A técnica de ORD é a diferença no índice de refração para a luz

circularmente polarizada como função do comprimento de onda (ângulo α. FIGURA I.3.4).

As técnicas de ORD e CD são intimamente relacionadas. Se o espectro de CD é conhecido pode-se calcular o espectro de ORD e vice-versa. A vantagem da utilização de ORD está em se medir absorções fora do intervalo de comprimento de onda permitido pelo CD, ou se a absorção for muito fortemente afetada pela absorção do solvente. No entanto, esta técnica não pode resolver picos de transição na região do ultravioleta próximo, fazendo com que, atualmente, o CD continue sendo a técnica mais indicada para estudos relacionados com estrutura de polímeros.

O espectro de CD pode ser considerado como consistindo de uma série de bandas, cada uma correspondendo a uma transição eletrônica do estado fundamental a um estado eletronicamente excitado. A rotação desta carga eletrônica durante a excitação gera um dipolo de transição magnética $<\psi_i | \mathbf{m} | \psi_0>$, e o deslocamento linear da carga gera o dipolo de transição elétrica $<\psi_i | \mu | \psi_0>$. Para resultar numa medida de CD é necessário então, que a transição envolva o movimento linear das cargas e o movimento circular, isto é, que exista simultaneamente **m** e μ não nulos, o que ocorre sob condições especiais de assimetria (característica das moléculas opticamente ativas), assim como nas transições π-π^* e n-π do grupamento amida.

As transições π-π^* e n-π nos peptídeos têm energia muito mais baixa se comparadas às carbonilas simples, e esta proximidade em energia das transições resulta na mistura dos dois tipos de transição, mistura que confere uma contribuição significante ao espectro de CD dos peptídeos. O cromóforo amida dos peptídeos vai apresentar então bandas devido à pequena transição n-π próximas de 230 e 210nm,

enquanto que na transição π-π^* as bandas são próximas a 185-190nm para amidas secundárias e 200nm para amidas terciárias.

Os elementos de estrutura secundária em proteínas foram caracterizados teoricamente e experimentalmente. Para as hélices α, que estão, em média, descritas para um terço dos resíduos em proteínas globulares, e são estruturas bem definidas, a caracterização espectroscópica tem sido muito facilitada por que também muitos homopolipeptídeos adotam esta conformação sobre condições apropriadas. O espectro de CD característico desta estrutura pode ser visto na FIGURA I.3.5, onde é identificada uma banda negativa em 222nm correspondente à transição n-π, uma banda negativa em 208nm e uma positiva em 192nm correspondentes à transição π-π^* do peptídeo.

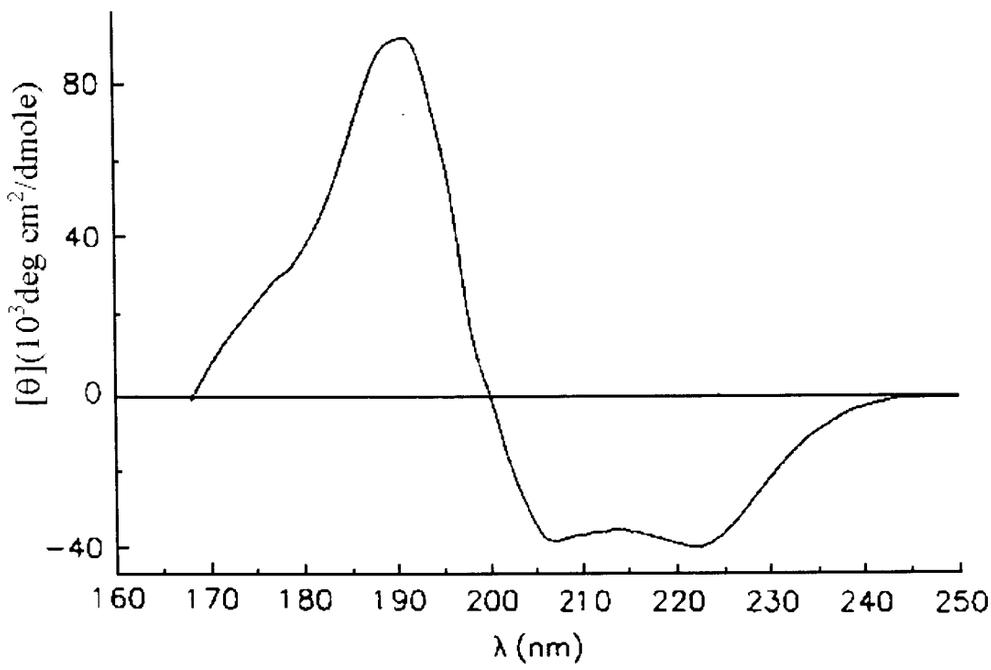


FIGURA I.3.5: Espectro de CD do polipeptídeo GLU na conformação de hélice α.[Tomadje *et al.*, 1992]

A dependência do espectro de CD com o comprimento da hélice tem despertado um grande interesse especialmente para quantificar o conteúdo de hélices α em peptídeos e proteínas. Previsões teóricas indicam que há um aumento em amplitude quando o número de resíduos é aumentado, principalmente nas bandas π-π^*.

Um outro resultado interessante é que tanto a teoria quanto os experimentos concordam que os efeitos finais do CD em 222nm fazem com que a hélice se pareça quatro resíduos menor do que ela realmente é, e coincidentemente ou não este resultado concorda com o número de hidrogênios livres para a formação de pontes no final de cada hélice (região da formação dos CAPs para estabilizar estes hidrogênios).

Já para as folhas β pregueadas a caracterização foi mais complicada que no caso das hélices α. Isto é devido ao fato de que a solubilidade das polipeptídeos nesta conformação é limitada, especialmente a solventes que têm alta absorbância na região ultravioleta, o que aumenta o ruído do espectro. Além disso a conformação β é bem menos definida que as hélices α, pois as folhas pregueadas variam em comprimento e em largura, enquanto as hélices variam apenas em comprimento, e as folhas também podem ser paralelas ou antiparalelas. Os espectros de CD para estruturas β têm se mostrado muito mais variáveis com o solvente ou com as cadeias laterais do que os espectros para hélices α. As bandas de CD características para as estruturas β (que podem ser vistas na FIGURA I.3.6) são uma banda negativa em 216nm e uma positiva próxima de 195nm, e cálculos teóricos atribuem uma banda negativa em 220nm à transição n-π e uma banda positiva em 195-200nm à transição π-π^*.

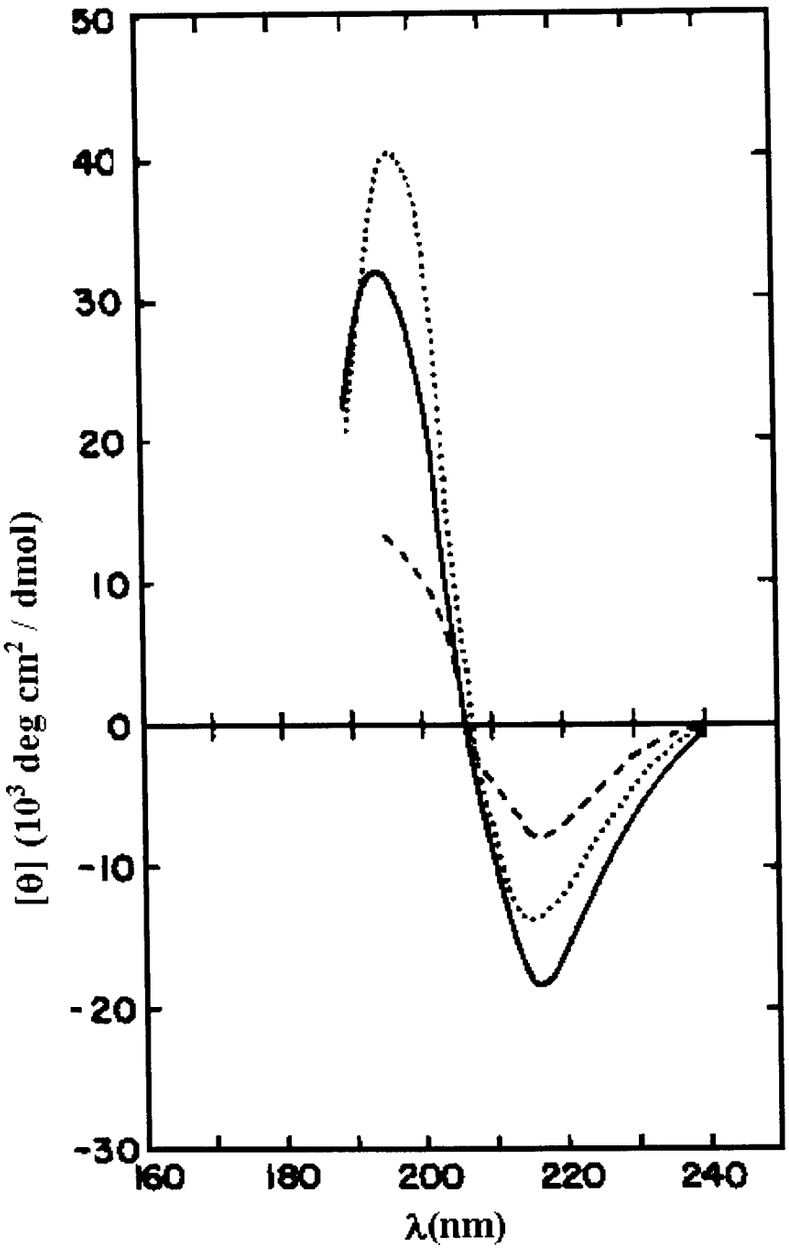
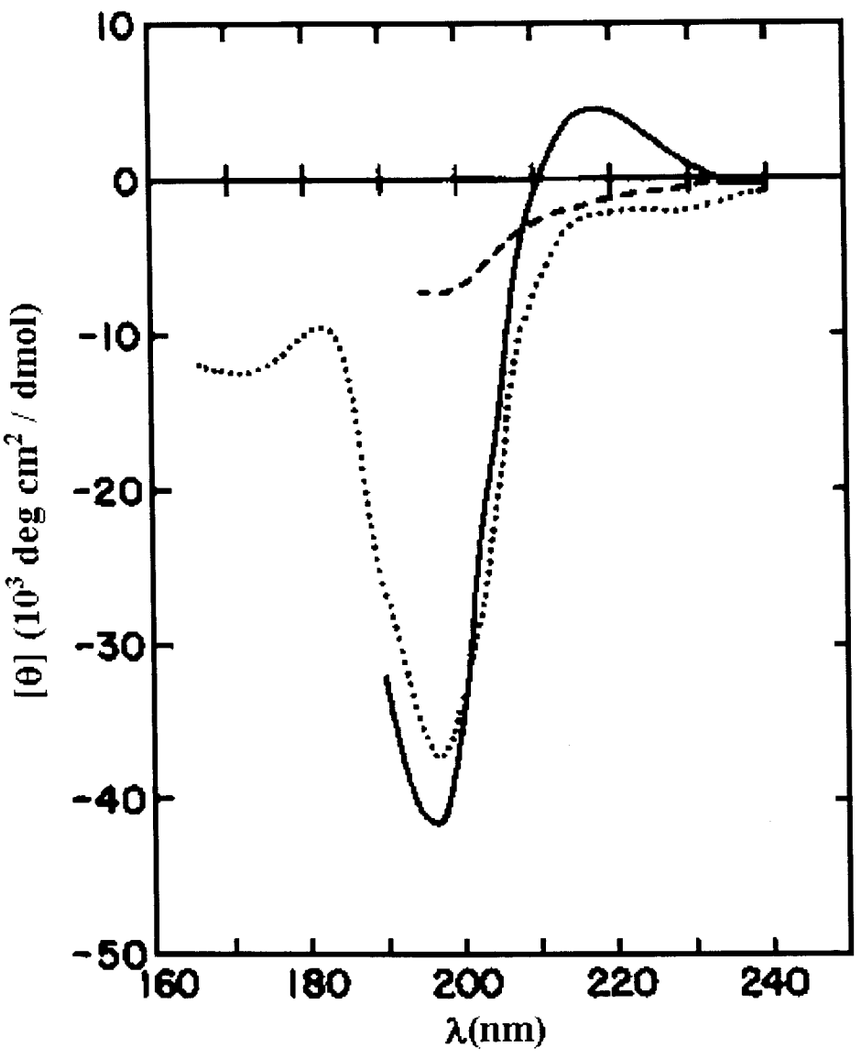


FIGURA I.3.6: Espectros de CD de polipeptídeos em folhas β. (—) polilisina em pH 11 após aquecimento a 52°C por 15 minutos, seguido do resfriamento a 22°C [Greenfield e Fasman, 1969]. (----) Polilisina em 1% de SDS [Lis e Spector, 1969] e (...) polilisina em 0,1 M de NaF em pH 7 [Brahms *et al.*, 1977].

O efeito da excitação é significante para as estruturas β, mas consideravelmente menor do que nas hélices α sendo, portanto, o sinal de CD desta última bem mais forte que o primeiro. Quanto à dependência do CD em relação ao tamanho das folhas, é sugerido que o aumento do comprimento da cadeia torna as bandas de CD mais intensas para as transições n-π.

As voltas β são elementos de estrutura secundária que dobram as cadeias e também são chamados voltas reversa ou voltas tipo "grampo-de-cabelo". Elas ocorrem em aproximadamente um quarto dos resíduos das proteínas globulares, sendo portanto uma configuração significativa. Os tipos de volta β mais comuns são os tipos I, II, III e o espectro de CD para elas tem geralmente um pico negativo próximo a 225nm, correspondente à transição n-π e dois picos correspondentes à transição π-π*, um pico positivo forte entre 200 e 205nm, e um pico negativo forte entre 180 e 190nm. Outros tipos de conformação, por exemplo a volta tipo II', cujo espectro é parecido com o espectro das hélices α, com bandas negativas em 220 e 210nm e uma banda positiva em 190nm.

Em proteínas globulares existem regiões que não pertencem a nenhuma das configurações acima mencionadas sendo, por conseguinte, chamadas desordenadas ou, preferivelmente, "random" (ao acaso). Para polipeptídeos com cadeias laterais ionizadas em pH neutro nesta conformação, o espectro de CD é caracterizado por uma intensa banda negativa em torno de 200nm, porém esta posição de 200nm varia consideravelmente de sistema para sistema (FIGURA I.3.7). Uma banda positiva em torno de 218nm é observada em muitos sistemas desordenados que pode ou não estar acompanhada de uma banda negativa próxima de 235nm.



ok

FIGURA I.3.7: Dicroísmo Circular de polipeptídeos desordenados. Polilisina pH 5,7: (—) [Greenfield e Fasman, 1969]; poliserina em 8 M de LiCl: (---) [Quadrifoglio e Urry, 1968], e polilisina-leucina em água: (...)[Brahms *et al.*, 1977].

As cadeias laterais aromáticas (fenilalanina, triptofano e tirosina) e as ligações dissulfeto têm contribuições dominantes na região do ultravioleta próximo, entre 250 e 300nm para a maioria das proteínas e, apesar dos sinais nesta região serem fracos quando comparados à região de ultravioleta distante, há uma grande vantagem em se explorar os espectros de CD nesta região, pois poderão fornecer

informações envolvendo diretamente os resíduos dos aminoácidos aromáticos e/ou as pontes dissulfeto.

A primeira instrumentação para medidas de CD foi introduzida comercialmente em meados dos anos 60, mas os estudos de CD de peptídeos e proteínas tiveram sua maior expansão há poucos anos. Isto se deve principalmente ao fato de que o CD vem sendo amplamente utilizado no estudo de problemas emergentes na área de biologia molecular estrutural: as transições que ocorrem nos processos de enovelamento, desnaturação e reenovelamento de proteínas; a verificação do correto enovelamento das proteínas expressas "in vitro" pela tecnologia do DNA recombinante; para a detecção de mudanças ou perturbações conformacionais oriundas da mutagênese sítio-dirigida.

Outras técnicas espectroscópicas também vêm sendo utilizadas para estudos envolvendo estruturas de proteínas, como NMR ("Nuclear Magnetic Resonance"), EPR ("Eletron Paramagnetic Resonance"), Raman, Espectroscopia Infravermelho, Espectroscopia de Fluorescência, algumas destas chegando até mesmo a resolução de sua estrutura. No entanto, essas técnicas apresentam limitações quando comparadas ao CD. A técnica de NMR (em duas dimensões), por exemplo, pode resolver estruturas de proteínas em solução, desde que elas sejam pequenas (menores que 20.000 Da) e para proteínas maiores não se consegue resolver detalhes sobre a estrutura, a não ser pela obtenção de cristais, seguida pela difração de raios X.

Nota-se que em todos os casos nos quais a resolução das estruturas é possível uma análise feita por CD fornece informações iniciais sobre o enovelamento da proteína e/ou sobre mudanças conformacionais dependentes de determinadas condições.

A região do ultravioleta distante é, geralmente, dominada por contribuições dos peptídeos. Em alguns casos, principalmente se o conteúdo de hélices α é baixo (como nas lectinas, algumas toxinas de cobras e imunoglobulinas), tal contribuição é proveniente de cadeias laterais aromáticas. Picos positivos nesta região têm sido atribuídos aos resíduos de tirosina e triptofano das cadeias laterais, já que nesta região os tipos de estrutura padrão apresentam somente bandas negativas.

As medidas em CD têm sido um grande atrativo devido a vários fatores: fácil realização, utilizam amostras em solução, não necessitando de grandes quantidades de proteína e as mudanças na estrutura secundária podem ser diretamente interpretadas de seus espectros. Além da praticidade experimental, tem-se a vantagem de que na região do ultravioleta distante (até 250nm) os espectros são extremamente sensíveis à estrutura da proteína, e no ultravioleta próximo refletem contribuições de cadeias laterais, pontes dissulfeto e bandas introduzidas por grupos prostéticos.

O dicroísmo circular é extremamente sensível e pode diferenciar cinco classes em que estão classificadas as proteínas, de acordo com Manavalan e Johnson, ou mesmo estruturas incomuns que não se encaixam na classificação proposta, como é o caso da lectina KM+ extraída das sementes de *Artocarpus integrifolia* [Silva-Lucca *et al.*, 1997a]. As classes são: estruturas toda-α, toda-β, α+β (regiões separadas), α/β (regiões interconectadas) e randômica (altamente desordenada). Recentemente uma técnica matemática de análise de "clusters" foi proposta para a classificação das proteínas baseadas em seu espectro de CD [Venyaminov e Vassilenko, 1994].

Com base nos espectros de CD, vários métodos foram desenvolvidos para o cálculo do conteúdo das frações de estrutura secundária das proteínas, sendo os mesmos comentados a seguir.

I.3.1 - MÉTODOS UTILIZADOS PARA O CÁLCULO DAS FRAÇÕES DE ESTRUTURA SECUNDÁRIA A PARTIR DOS ESPECTROS DE CD

A partir de espectros medidos podemos estimar o conteúdo de estrutura secundária por vários métodos existentes. Todos os métodos assumem os seguintes aspectos: a estrutura tridimensional das proteínas de referência é obtida através da cristalografia de raios X; as contribuições de elementos individuais de estrutura secundária em todo o espectro de CD são aditivas; o efeito da estrutura terciária é ignorado, apenas os cromóforos dos peptídeos são responsáveis pelo espectro no ultravioleta distante, e contribuições de cromóforos não peptídicos podem ou não ser ignoradas. Cada elemento estrutural, tal como hélices alfa e folhas β, pode ser descrito por um espectro simples de CD e os efeitos da geometria variável dos elementos de estrutura secundária são tidos como desprezíveis.

Em geral, os métodos assumem que o espectro de CD da proteína pode ser analisado como combinação linear de k espectros de base. O cálculo dependerá da escolha do espectro de referência, da concordância da estrutura secundária das proteínas de referência com os estudos de raios X e do procedimento matemático utilizado para a desconvolução do espectro de CD.

Alguns dos métodos mais utilizados para o cálculo da estrutura secundária são:

- MLR - ("Nonconstrained Least-squares Analysis"): é o método mais simples para análise pois se utiliza do cálculo dos mínimos quadrados. O espectro de proteínas de estrutura determinada por raios X é desconvoluído em um espectro de base para hélices α, folhas β, voltas β e estruturas desordenadas [Greenfield, 1995].
- SVD - ("Singular Value Decomposition"): utiliza um método de análise de vetores de multicomponentes para extrair curvas de base ortogonais de um grupo de espectros. Após a desconvolução cada base, que é uma curva única, é relacionada com uma mistura de estruturas secundárias padrão [Henessey and Johnson, 1981].
- CONTIN - ("Ridge Regression Analysis"): o programa utiliza este tipo de regressão que é uma variação matemática do processo dos mínimos quadrados. O peso de cada espectro de referência é utilizado na análise do espectro em estudo somente se este espectro tiver uma boa concordância com o melhor ajuste entre a curva teórica e a experimental. Então o programa faz um ajuste do espectro da proteína desconvoluída diretamente por combinação linear do espectro de uma grande base de dados de proteínas com estruturas conhecidas [Provencher and Glöckner, 1981].
- K2D - ("Neural Nets") : As redes neurais (programa de computador que pode detectar padrões e correlações entre dados) são usadas para analisar o espectro de CD, podendo melhorar a correlação entre as estruturas secundárias calculadas e observadas. Nas redes neurais têm-se dois padrões de entradas de dados, o "input" e o "output", que no CD são correspondentes aos espectros de CD e os

pesos fracionais de estruturas secundárias. Os cálculos são executados em duas fases: uma fase de "aprendizado"e uma fase de "memória". Na primeira fase, o programa faz conexões entre os pontos dos espectros de CD e a estrutura secundária dos padrões. Os pesos das conexões são ajustados até que o erro da estrutura secundária calculada e a atual seja minimizado. Na segunda fase, os dados não uttilizados na fase anterior servem como "input" e o "output" correspondente é calculado a partir dos pesos já ajustados [Böhn and Jaenicke, 1992].

- SELCON ("The Self-consistent Method"): As proteínas da base de dados são arranjadas de maneira a aumentar a diferença do erro entre elas e o espectro que está sendo analisado, daí os menos parecidos com o espectro de interesse são automaticamente deletados. Desta forma, as soluções são encontradas mais rapidamente. O programa dá um "chute" inicial da estrutura o qual é incluído na base que será desconvoluída usando SVD. A estrutura secundária da proteína é então, determinada e esta solução passa a ser o novo "chute". O método é repetido até que o resultado não se modifique mais [Sreerama and Woody, 1993, 1994a, 1994b].
- CCA - ("Convex Constraint Analysis"): método que foi utilizado para os cálculos das frações de estrutura secundária da frutalina, a lectina estudada neste trabalho.

Foi desenvolvido em 1991 por Perczel *et al.* para calcular os espectros da base a partir dos espectros de CD das proteínas de referência. O método concordou com a equação que descreve o espectro de CD como combinação linear dos espectros da base:

$$S(\lambda) = \sum_{k=1}^{N} f_k B_k(\lambda)$$

onde $\Sigma f_K = 1$ e $f_K > 0$

$S(\lambda)$ = espectro de CD da proteína como combinação linear dos espectros de base

$B_K(\lambda)$ = espectros da base em função do comprimento de onda

f_K = fração da k-ésima estrutura secundária

k = k-ésima estrutura secundária

N = número de estruturas secundárias

Uma terceira constante foi introduzida para a minimização de volume, o que tornou possível a desconvolução dos espectros de CD. Este método não utiliza base de dados de estruturas provenientes de cristalografia de raios X, mas sim os espectros de CD publicados por Yang *et al.* (1986), incluindo os valores de elipticidade de dezoito proteínas (Chang *et al.*, 1978) e dados de $\Delta\varepsilon$ de quinze proteínas descritas por Hennessey e Johnson (1981).

As bases resultantes são hélices α, folhas β, voltas β e estrutura desordenada. Uma quinta base é atribuída à contribuições quirais relacionadas com cromóforos não peptídicos, aminoácidos aromáticos, pontes dissulfeto e ainda na classificação de Kabsch-Sander, estes espectros guardam relação com voltas gama.

As frações de estrutura secundária de proteínas podem ser calculadas das curvas de CD desconvoluídas. Em 1992, Perczel expandiu sua base de dados originais para vinte e três proteínas, resultando em uma melhor correlação da base com as folhas β antiparalelas, e incluiu o algoritmo Lincomb, que é um algoritmo simples, baseado em cálculos de mínimos quadrados com um grupos de espectros representando estruturas secundárias conhecidas, que estima o peso de cada um dos elementos: hélices α, folha β antiparalela, "β turn", estrutura desordenada e outras contribuições [Perzel 1992a e 1992b].

As proteínas utilizadas como referência neste trabalho foram: mioglobina, parvalbumina ligante de cálcio, lisosima, adenilato kinase, insulina, lactato desidrogenase, citocromo C, carboxipeptidase, termolisina, subtilisina, papaína, inibidor de tripsina, ribonucleases A e S, nuclease de estafilococos, alfa-quimotripsina, elastase, pepsinogênio, gama-II cristalina, imunoglobulina G de camundongo, proteína CheY, concanavalina, ácido proteinase, fragmento de FAB de

imunoglobulina, além dos espectros de CD a serem analisados. Para a utilização do programa CCA, foi desenvolvido em nosso laboratório um roteiro onde algumas etapas foram otimizadas [Silva-Lucca *et al.*, 1996].

Todos os métodos citados anteriormente são bons para a previsão da estimativa do conteúdo de proteínas contendo hélices α. O SELCON tem uma boa correlação entre folhas e voltas β para estruturas de proteínas globulares, é rápido e fácil de usar, porém tem resultados pobres para polipeptídeos com alto conteúdo de folhas β. Já o K2D é bom para estruturas β entre 200 e 240 nm, mas não estima as voltas, ao contrário do CONTIN, que estima muito bem as voltas β. O SVD é bom apenas para hélices α. Caso não se conheça a concentração da proteína pode-se utilizar o MLR (método dos mínimos quadrados), que é o único método disponível para este caso, mas seus resultados são inferiores aos demais. O CCA, apesar de seu uso não ser tão simples, é um excelente método para desconvoluir grupos de espectros de CD, acompanhando efeitos de agentes desnaturantes, de temperatura ou de ligantes que interfiram na conformação da proteína nativa.

I.4 - ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

O fenômeno da fluorescência ocorre em compostos particulares, denominados fluoróforos, que quando excitados em um dado comprimento de onda (em geral, seus máximos de absorção), emitem luz em comprimento de onda diferentes. Assim, ela pode ser definida como a emissão que resulta do retorno de um elétron para um orbital de nível mais baixo, mais especificamente, é a luz emitida quando o estado excitado singleto (S_1) decai para o estado singleto fundamental (S_0).

Esta técnica espectroscópica teve um rápido desenvolvimento nas últimas três décadas devido à sua aplicação nos estudos de proteínas, que possuem fluoróforos intrínsecos (triptofano, tirosina e fenilalanina). Uma grande vantagem em se utilizar esta técnica é a necessidade de pouca concentração de proteína para a realização das medidas, podendo por consequência, serem utilizadas soluções muito diluídas nos experimentos [Lackowicz, 1983; Cantor *et al.*, 1982].

As medidas de fluorescência podem ser estáticas ou dinâmicas (resolvidas no tempo). No presente trabalho, a fluorescência estática foi utilizada para analisar mudanças conformacionais da frutalina nativa, desnaturada e reenovelada.

Além da fluorescência, ocorrem simultaneamente outros tipos de decaimento, como a conversão interna, processo no qual a energia de excitação é perdida por dissipação através dos modos de vibração interna ou por colisão com o solvente; a fosforescência, que é a emissão resultante da transição entre os estados de diferentes multiplicidades; e o cruzamento intersistemas, no qual a troca de spins "proibida" converte um estado singleto (S_1) em um estado tripleto (T_1), e este pode decair para o estado singleto fundamental (S_0) por fosforescência ou conversão interna. Estes

processos podem ser vistos com mais detalhes na FIGURA I.4.1, o Diagrama de Jablonski.

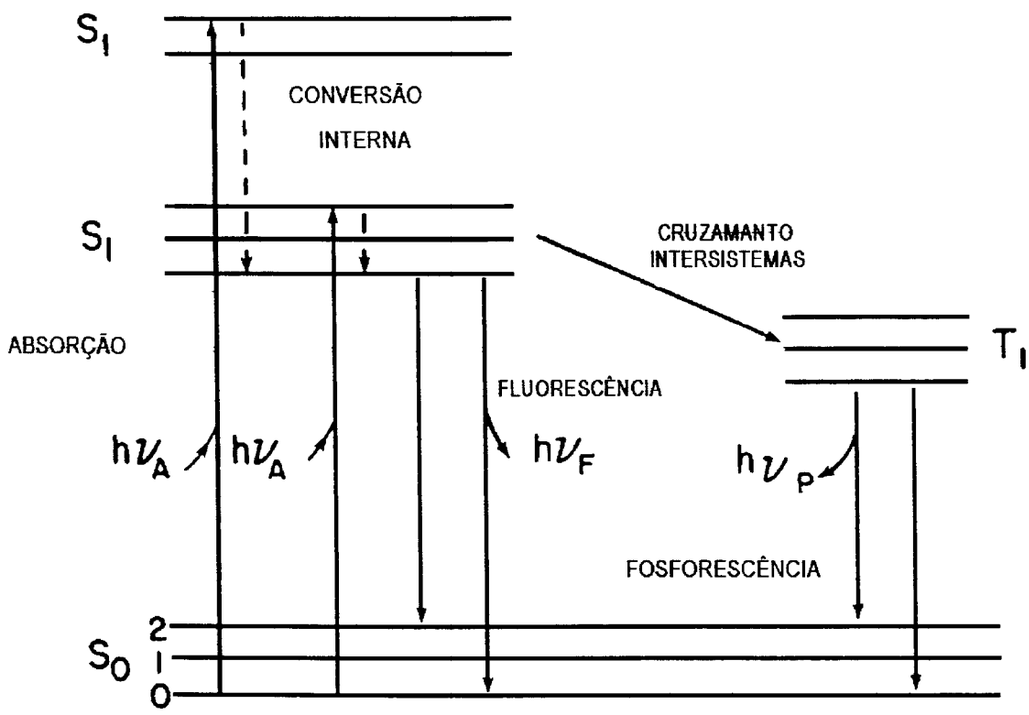


FIGURA I.4.1: Diagrama de Jablonski. As energias necessárias para a excitação são representadas na figura por $h\upsilon_A$, a energia resultante da fluorescência é dada por $h\upsilon_F$ e a energia resultante do processo de fosforescência, $h\upsilon_P$.

Os processos citados anteriormente são competidores da fluorescência, e a intensidade da luz emitida dependerá por sua vez, da ocorrência da fluorescência com relação aos demais processos. Esta fração é dada pelo rendimento quântico da fluorescência (ϕ_F), que é expresso pela seguinte equação:

$$\phi_F = \frac{K_F}{K_F + K_{ic} + K_{IC} + K_Q}$$

ONDE: K_F = razão relativa do processo de fluorescência

K_{ic} = cruzamento intersistema para o estado tripleto

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO

K_{IC} = conversão interna

K_Q = supressão

ϕ_F = rendimento quântico de fluorescência

Este rendimento pode ser calculado se for conhecida a forma do espectro de emissão em estudo. O espectro de emissão representa, por sua vez, a fluorescência espectral da substância em estudo, e é um gráfico da intensidade de fluorescência pelo comprimento de onda para um determinado comprimento de onda de excitação. Estes gráficos variam e são dependentes da estrutura química do fluoróforo e do solvente na qual a substância está dissolvida. Se houver apenas uma espécie fluorescente presente, a forma do espectro de emissão será independente do comprimento de onda.

Os fluoróforos podem ser intrínsecos (ou naturais), onde a fluorescência ocorre naturalmente, ou extrínsecos, aqueles que podem ser acoplados aos compostos não fluorescentes.

FLUORÓFOROS INTRÍNSECOS

Em algumas moléculas biológicas a fluorescência ocorre naturalmente. As mais conhecidas são:

- Proteínas: os resíduos de triptofano são os aminoácidos mais fluorescentes, geralmente responsáveis por 90% da fluorescência nas proteínas. Este fluoróforo natural é altamente sensível. Sendo assim mudanças espectrais resultantes de vários fenômenos podem ser observadas, tais como: interações com ligantes, associação proteína-proteína, desnaturação, reenovelamento. Além disso, o máximo de

emissão das proteínas reflete a exposição média dos seus resíduos de triptofano em solução aquosa. As proteínas absorvem luz em comprimentos de onda próximos a 280nm, decrescido ao conteúdo de seus aromáticos, e estes quando excitados têm seu máximo de emissão no intervalo entre 320 a 350nm. O aminoácido tirosina é altamente fluorescente em solução, mas sua emissão é geralmente fraca quando é constituinte da proteína.

- Ácidos nucleicos: os nucleotídeos e os ácidos nucleicos normalmente não fluorescem. Mas existem algumas exceções, tal como o tRNA de fungo, que contém uma base altamente fluorescente, conhecida como base Y, cujo máximo de emissão é próximo a 470nm.

- Co-fatores: Apesar de o íon NAD^+ não ser fluorescente, o NADH é altamente fluorescente, com absorção em 340nm e máximo de emissão em 450nm.

- Riboflavina e FAD: a riboflavina, a FMN (mononucleotídeo flavina), e o FAD (dinucleotídeo adenina flavina) absorvem luz no intervalo de comprimento de onda e luz visível (aproximadamente 450nm) e emitem, na região de 515nm.

FLUORÓFOROS EXTRÍNSECOS

Se a fluorescência natural das macromoléculas não for adequada ao experimento desejado, ou não for sensível ao fenômeno que se quer quantificar, podem ser escolhidos fluoróforos externos à substância em estudo mas que satisfaçam as condições do experimento. A seguir, alguns exemplos destes fluoróforos:

- Fluoresceína ou isotiocianato: são muito utilizados para marcar proteína, inclusive encontram-se disponíveis imunoglobulinas já marcadas para uso em microscopia de fluorescência. Estes marcadores têm um alto rendimento quântico, e seu comprimento de onda longo, tanto para a absorção quanto para a emissão, minimiza o problema do ruído na fluorescência das amostras biológicas.

- Cloreto de dansila: é bastante utilizado para marcar proteínas pois seu tempo de vida (tempo médio no qual um fluoróforo permanece no estado excitado) é favorável (cerca de 10 nanosegundos), e seu espectro de emissão é muito sensível à polaridade do solvente, característica importante para os estudos de interação da proteína com mudanças no solvente.

- Ácido sulfônico naftilamina: o ácido sulfônico naftilamina e alguns de seus derivados são freqüentemente utilizados como marcadores não covalentes para proteínas e membranas. Estes marcadores não são fluorescentes quando dissolvidos em água, mas são altamente fluorescentes se misturados em solventes não polares ou quando ligados à macromoléculas. Ligam albuminas, lipoproteínas, apomioglobinas, imunoglobulinas e bicamadas lipídicas.

- Sondas de membrana hidrofóbica: os lipídeos são moléculas normalmente não-fluorescentes, por isso as membranas são marcadas com sondas tais como perileno, 9-vinil antraceno (9VA) e 1,6-difenilhexatrieno (DPH). São insolúveis em água e nas regiões hidrofílicas das membranas, mas são altamente sensíveis à polaridade do solvente.

- Ácidos nucleicos: o ATP e seus derivados podem ser altamente fluorescentes se forem acrescidos de pontes de eteno. Estes derivados (εATP) são sensíveis à viscosidade do solvente e são ativos em muitas reações catalisadas por enzimas.

FLUORESCÊNCIA DE PROTEÍNAS

A fluorescência é muito utilizada em proteínas pois estas possuem três fluoróforos naturais, a tirosina, o triptofano e a fenilalanina. Os espectros de emissão dos resíduos de triptofano, por exemplo, podem refletir a polaridade do solvente que os envolve, e os espectros das proteínas são sensíveis às ligações de substratos, reações de associação e desnaturações. A sensibilidade dos supressores (agentes ou processos que diminuem a fluorescência de uma determinada substância) levam à determinação da acessibilidade dos resíduos de triptofano da proteína. Os experimentos com proteína são feitos com comprimentos de onda de excitação no máximo de absorção de 250nm ou em comprimentos de onda maiores. A fenilalanina tem seu máximo de absorção em aproximadamente 260nm, desta forma ela não é excitada na maioria das situações experimentais. Além disso, seu rendimento quântico é bem menor que o dos outros dois. Daí, na região de 280nm a fluorescência é devida à tirosina e ao triptofano. Seus máximos de emissão em água são em 303 e 348nm respectivamente. Estes máximos são altamente sensíveis à polaridade de solvente. Desta forma o máximo de emissão das proteínas é dependente dos fatores que afetam à exposição dos fluoróforos ao solvente, levando então à dependência da estrutura tridimensional da proteína. Um exemplo bastante conhecido é o da molécula de

monelina, que tem seu espectro bastante modificado após ser desnaturada com hidrocloreto de guanidina.

A associação da proteína com seu substrato ou a formação de oligômeros resulta em mudanças no espectro de emissão dos triptofanos, que podem ser decorrentes do enovelamento das regiões onde este resíduo esteja localizado. A sensibilidade dos resíduos de triptofano à polaridade do ambiente que está à sua volta, ou o tamanho da unidade ao seu redor é uma consideração potencial para a quantificação da associação de reações entre as proteínas e outras moléculas.

I.5 - OBJETIVOS DO TRABALHO

Os objetivos principais deste trabalho resumem-se: em estudar o processo de reenovelamento monitorando com atividade biológica e espectroscopias de dicroísmo circular e fluorescência, e também pela atividade biológica. Além disto, vamos investigar a importância do açúcar ligante neste processo.

II - MATERIAIS

II.1 - Reagentes e soluções tampões:

- Solução salina 0,15 M tamponada com fosfato de sódio pH 7,4 (PBS)
  cloreto de sódio (MERK Chemicals) - 0,15 M
  fosfato de sódio bibásico (MERK Chemicals) - 0,06 M
  fosfato de sódio monobásico (MERK Chemicals) - 0,15 M (utilizado para o ajuste de pH)
- PBS contendo 0,2 M de D-galactose (MERK Chemicals)
- PBS contendo 0,2 M de glicose (MERK Chemicals)
- PBS contendo 0,2 M de D-galactose e 0,2 M de D-manose (ambos MERK Chemicals)
- Todas as soluções foram preparadas com água Milli-Q e filtradas com filtro Amicom (5 micras) a vácuo.

II.2 - Resina cromatográfica utilizada

- Resina de afinidade Sepharose D-galactose (Selectin 16 - Pierce Chemical Co.)

II.3 - Membranas e cubetas

- Diálo-filtração do extrato de sementes: membrana YM 10 (pressão máxima de 6,7 atm. - Amicon corp. -), utilizadas em cubas para ultrafiltração (Amicon corp.)
- Cubetas de quartzo retangulares (com capacidade para 1,0 e 3,0 mL) com 1,0 cm de

caminho óptico

- Centrífugo-filtração: Centricon 3 e Centriprep 3 (Amicon corp.)
- Cubeta cilíndrica de quartzo com 1 mm de caminho óptico (capacidade para 0,5mL), e cubetas retangulares com quatro faces polidas (capacidade para 1,0 e 3,0mL) e 1cm de caminho óptico

II.4 - Ensaios de hemaglutinação

- Solução de hemácias humanas frescas a 2% em PBS
- Placas de microtitulação para ensaios de hemaglutinação

II.5 - Equipamentos

- Medidas de fluorescência: espectrofluorímetro JASCO - modelo FP777
- Medidas de dicroismo circular: espectropolarímetro JASCO - modelo J720
- Centrífuga refrigerada Sorvall - modelo RC 5B
- Banho de água circulante JASCO, com termostato
- Leituras de absorbância de proteínas: espectrofotômetro Hitachi - modelo U-2001
- pH-metro Micronal - modelo B-374

III - MÉTODOS

III.1- EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA FRUTALINA

O método para a purificação da frutalina foi descrito por Moreira *et al.* [Moreira *et al.*, 1997]. O procedimento resume-se nos seguintes passos: às sementes secas e trituradas (obtida sob a forma de farinha) foi acrescentado PBS na proporção de 1:10 p/v. A suspensão foi colocada sob agitação em geladeira a 4°C por 24 horas. Após este tempo, foi centrifugada por 20 minutos em centrífuga refrigerada a 5000 rpm e o sobrenadante foi diálo-filtrado em membrana YM 10 contra cinco volumes de PBS a 4°C e concentrados três vezes em relação ao volume inicial. O extrato foi denominado extrato bruto e armazenado a -18°C.

Uma coluna contendo 15mL de resina Sepharose - D-galactose foi equilibrada com 50mL de PBS. Um volume de 10mL de extrato bruto previamente centrifugado foi aplicado na coluna e eluído com 50mL de PBS. A fração não retida na coluna foi desprezada, e a coluna foi lavada com 50mL de PBS. A seguir foi eluída com uma solução 0,1 M de D-galactose em PBS, as frações eluentes foram monitoradas em 280nm. Estas frações contendo a frutalina foram estocadas a -18°C. A homogeneidade foi testada por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes como foi também descrito por Moreira *et al.* [Moreira *et al.*, 1997].

III.2 - DESNATURAÇÃO DA FRUTALINA POR TEMPERATURA

Em vinte tubos "eppendorfs" foram colocados 1mL da solução da frutalina, na concentração de 0,18 mg/mL, contendo D-galactose e mergulhados em banho de

água circulante à temperatura de 60°C. Para interromper a reação de desnaturação, as amostras foram mergulhadas em banho de gelo. A desnaturação foi monitorada por medidas de dicroísmo circular e as amostras desnaturaram entre 30 e 90 minutos, dependendo do tempo de estocagem da proteína nativa.

III.3 - REENOVELAMENTO DA FRUTALINA POR CONGELAMENTO E CENTRIFUGAÇÃO

As amostras desnaturadas foram colocadas em tubo plástico e armazenadas a -18°C pelo tempo necessário para cada experimento planejado. Quando descongeladas, as amostras foram diálo-filtradas e concentradas em Centriprep 3 sete vezes em relação à concentração inicial. Desta fração, 1mL foi diluído para que se obtivesse uma concentração de 0,18mg/mL e foi realizada a leitura no espectropolarímetro, esta primeira etapa foi chamada de primeiro reenovelamento. O material obtido na primeiro reenovelamento foi armazenado a -18°C por oito dias. Após descongelamento lento a amostra foi diluída em PBS três vezes o volume inicial, e centrífugo-concentrada até que atingisse novamente o volume inicial, sendo este o segundo reenovelamento. Para a medida da segunda fase do procedimento de reenovelamento, assim como para a primeira e as demais medidas de CD, a proteína foi diluída para a concentração de 0,18mg/mL. Este procedimento foi repetido duas vezes mais obtendo-se o terceiro e o quarto reenovelamentos. Como o espectro do quarto reenovelamento não apresentou diferença significativa em relação ao espectro do terceiro reenovelamento, este foi omitido da figura dos resultados no capítulo que trata dos resultados e da discussão.

III 4 - MEDIDAS DE DICROÍSMO CIRCULAR

As amostras nativas, desnaturadas, e os reenovelamentos foram medidas no espectropolarímetro, todas contendo 0,18mg/mL de proteína (coeficiente de extinção molar 1,073 - $A_{1cm\ 0.1\%}$.[Moreira *et al.*, 1997]) num intervalo de comprimento de

onda de 195 a 240nm e à temperatura de 25°C, utilizando-se uma cubeta cilíndrica com 1mm de caminho óptico conforme descrito anteriormente.

O tratamento das curvas é feito no próprio programa utilizado para a aquisição de dados. O programa faz uma Transformada de Fourier dos picos de CD, e são cortadas as freqüências onde o ruído é muito intenso, a transformada inversa é calculada para que o espectro esteja novamente em CD X nm.

Os espectros nativo e desnaturado foram utilizados para o cálculo do conteúdo das frações de estrutura secundária pelo programa "Convex Constraint Analysis" (CCA).

III.5 - MEDIDAS DE FLUORESCÊNCIA

As medidas de fluorescência das frações nativa, desnaturada e reenoveladas foram realizadas no espectrofluorímetro à temperatura ambiente (22°C), estando as amostras com a mesma concentração de proteína, 0,09mg/mL, e utilizando uma cubeta de quartzo com quatro faces polidas como descrito anteriormente. O comprimento de onda de excitação foi de 280nm e o espectro de emissão monitorado numa faixa de comprimento de onda de 290 a 450nm. Os espectros respectivos às soluções tampão foram subtraídos dos espectros medidos para minimizar o efeito Raman.

III.6 - ENSAIOS DE HEMAGLUTINAÇÃO

Os testes para hemaglutinação foram realizados com as amostras nativa, desnaturada e reenovelada. Em uma placa de microtitulação foram feitas as seguintes diluições das amostras: 1:1; 1:2; 1:4; 1:8; 1:16 e 1:32 (volume da amostra /volume do tampão), o volume total da diluição foi de 25µl, além dos controles negativos para todas as amostras. Em cada fração foi acrescentado 25µl de uma suspensão de hemácias humanas do tipo O - RH negativo a 2% em PBS. A placa foi mantida à temperatura ambiente (cerca de 22°C) por 30 minutos. A maior diluição que

apresentou reação de aglutinação quando verificada a olho nu, foi considerada o título da medida.

IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1 - MEDIDAS DE DICROÍSMO CIRCULAR DA FRUTALINA NATIVA E DESNATURADA

A FIGURA IV.1 mostra os espectros de CD da frutalina nativa e desnaturada (ambas em solução de PBS contendo D-galactose 0,1 M). Na frutalina nativa ocorre um máximo positivo em 203nm e um mínimo negativo localizado em 218,6nm. Este espectro é característico de moléculas cuja estrutura secundária é predominantemente de folhas β. No espectro da frutalina desnaturada ocorre a perda dos dois picos presentes no espectro nativo, caracterizando assim, o espectro como sendo de proteínas desnaturadas com um mínimo negativo em 196nm.

O espectro de CD da frutalina revelou -se muito parecido com o espectro de CD da jacalina, lectina extraída das sementes de *Artocarpus integrifolia*. Estas proteínas apresentam homologia quanto à seqüência N - terminal, e frações de estrutura secundária [Moreira *et al.*, 1997 e comunicação pessoal].

Tanto a jacalina quanto a frutalina apresentam reação de hemaglutinação com uma solução de hemácias humanas do grupo ABO a 2% em PBS, porém apesar do alto grau de homologia a frutalina apresenta uma particularidade: é três vezes mais ativa nos fenômenos de hemaglutinação e na migração de neutrófilos [Monteiro *et al.*, 1997]. A propriedade hemaglutinante da frutalina foi utilizada nos testes de atividade biológica para a monitoração dos experimentos realizados durante o desenvolvimento do trabalho.

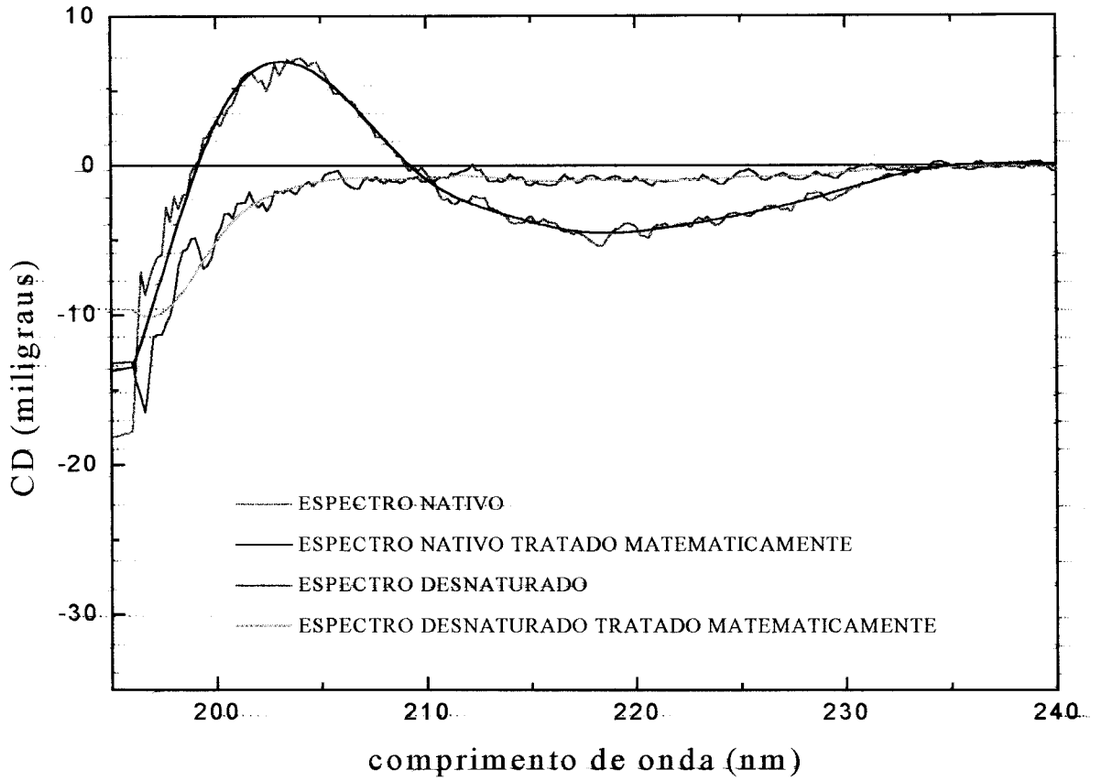


FIGURA IV.1: Espectro de CD de frutalina nativa (—), frutalina nativa tratada matematicamente (—),. frutalina desnaturada (—) e frutalina desnaturada tratada matematicamente (—), todas na concentração de 0,18 mg/mL e em solução contendo 0,1 M de D-galactose em PBS. As medidas foram realizadas à temperatura ambiente (22 °C) em cubeta de quartzo de 1mm de caminho ótico, monitorados de 195 nm a 240 nm.

IV.2 - CINÉTICA DA DESNATURAÇÃO DA FRUTALINA POR TEMPERATURA

O espectro de CD da frutalina desnaturada está mostrado na FIGURA IV.1. A perda das bandas características de estruturas em folhas β, em 204 e 218nm, são os indicadores da desnaturação da proteína e a drástica diminuição da propriedade hemaglutinante foram utilizados como critérios para caracterizar a frutalina desnaturada.

Foi observado que o tempo necessário para a desnaturação da frutalina a 60°C aumentou em função do período em que ela permaneceu estocada a -18°C, como está resumido na TABELA 1. Na primeira coluna está o período em que as frações de frutalina nativa em PBS contendo D-galactose - 0,1M permaneceram congeladas a -18°C. Na outra coluna o tempo necessário para a desnaturação a 60°C de cada uma das frações. O aumento do tempo necessário para a desnaturação aumenta linearmente com o tempo de congelamento, obtendo-se um coeficiente de 0,34min/dia para cerca de 90 dias a - 18°C, a partir do gráfico que descreve esta relação (tempo de estocagem X desnaturação) da FIGURA IV.2.

Este resultado sugere que o açúcar ligante tenha um papel na estabilidade na estrutura da proteína, o que poderá ser melhor investigado com uma cinética de temperatura da proteína com o monossacarídeo ligante D-galactose, ou ainda com uma cinética de temperatura na ausência do monossacarídeo.

DIAS	TEMPO (minutos)
0	30 ± 1min
40	40 ± 1min
60	50 ± 1min
90	60 ± 1min

TABELA 1: Relação entre o tempo de estocagem de frutalina nativa e o tempo necessário para a desnaturação da amostra.

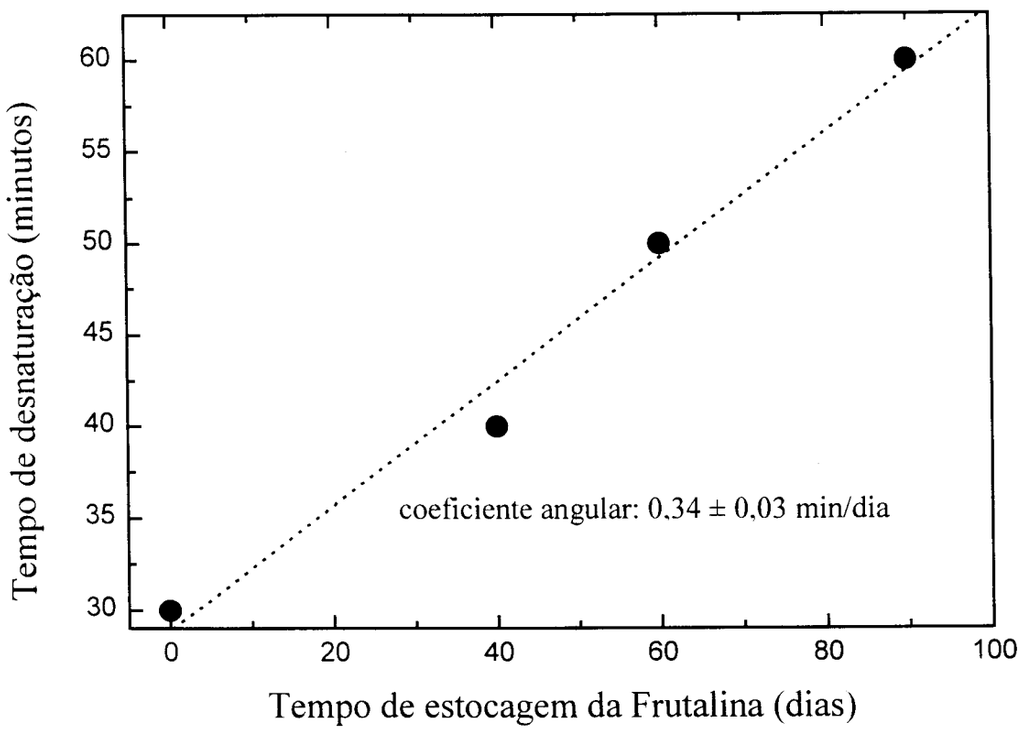


FIGURA IV.2: Gráfico do tempo de estocagem da frutalina contra o tempo de desnaturação. O coeficiente angular foi calculado por regressão linear da curva obtida, utilizando a função de primeiro grau y=ax+b. O coeficiente obtido foi de 0,34.

IV.3 - PROCESSO DE REENOVELAMENTO

A amostra obtida após o primeiro processo de reenovelamento (descongelamento, e sete vezes concentração) apresentou um espectro de CD com uma das bandas bem próxima à banda de CD característica para estruturas β, em 217nm e um pequeno pico positivo se aproximando de 203,6nm, FIGURA IV. 3. O cruzamento da linha do espectro de valores negativos para positivos no primeiro reenovelamento, não é coincidente com o da frutalina nativa que é de 209,4nm.

Após oito dias de congelamento e em seguida concentrada (segundo reenovelamento) o espectro revela um aumento em intensidade da banda em 202,8nm e o cruzamento da linha de valores negativo para positivo foi coincidente, 209nm com o valor para o espectro nativo. O pico negativo em 218,8nm, foi menos intenso que o pico encontrado no espectro nativo, apesar de sua posição ter sido satisfatoriamente próxima à do nativo (218,6nm). O terceiro reenovelamento (após a amostra ter sido novamente centrifugo-concentrada por três vezes) teve seu espectro de CD característico de estrutura predominantemente em folhas β como na proteína nativa embora tenha sido menos intenso. Seus máximos e mínimos foram de 202,6nm positivo e 218,4nm negativo. Na TABELA 2 estão sumarizados os resultados dos máximos e mínimos da proteína nativa e das etapas de reenovelamento. A coluna chamada ZERO mostra os comprimentos de onda onde a curva de CD passou de valores negativos para positivos. Nas colunas de MÁXIMO e MÍNIMO estão os comprimentos de onda onde foram observadas as intensidades máximas das curvas de CD para valores positivos e negativos. A coluna de intensidade apresenta os valores dos máximos positivos de CD obtidos para cada fração.

Estes espectros mostram que a proteína sofreu reenovelamento pelo menos a nível de estrutura secundária, o que será discutido no item IV.5, sobre a atividade hemaglutinante. A FIGURA IV.4, mostra os valores de CD para os máximos positivos, em 203nm, para cada curva, extraídos a FIGURA IV.3. A análise desta curva sugere duas formas estáveis, e com perfis de dicroísmo circular intermediários entre as frações desnaturada e nativa.

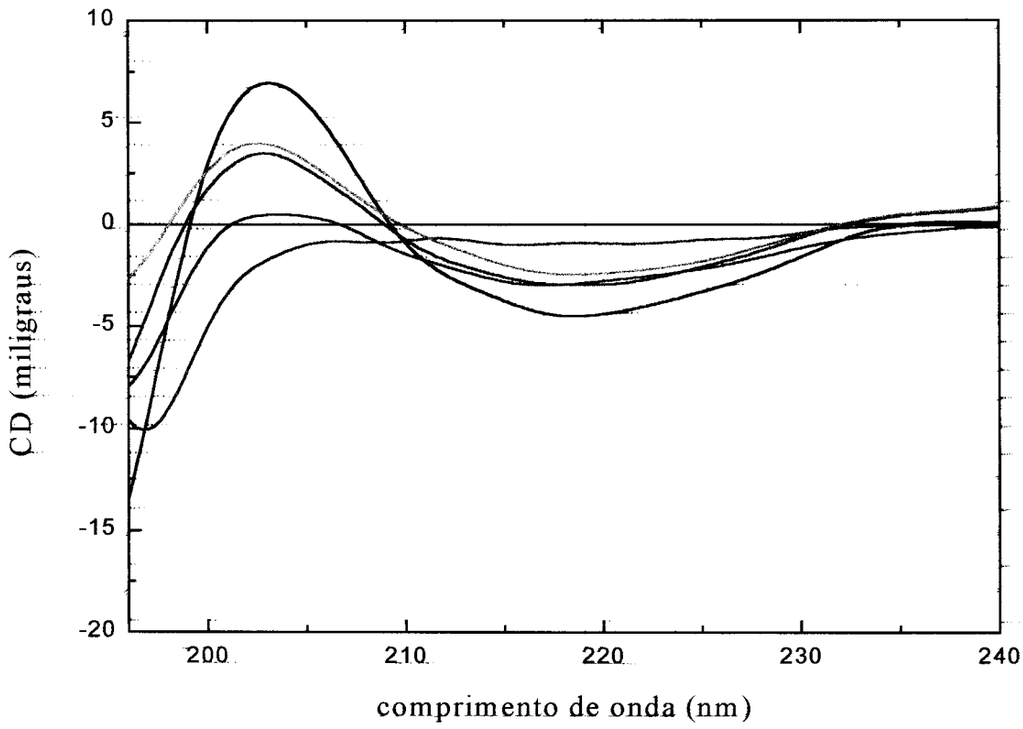


FIGURA IV.3: Espectro de CD das frações nativa (—), desnaturada (—) , primeiro reenovelamento (—), segundo reenovelamento (—) e terceiro reenovelamento ( ) da frutalina. As frações nativa e desnaturada estão em solução contendo 0,1 M de D-galactose em PBS, e as frações das primeira, segunda e terceira renaturações estão em PBS sem D-galactose. Todas as frações foram medidas com igual concentração de proteína (0,18 mg/mL), monitoradas de 196 a 240 nm, à temperatura ambiente (22°C) e em cubeta de quartzo de 1mm de caminho ótico.

	MÍNIMO nm	MÁXIMO nm	ZERO nm	INTENSIDADE miligraus
NATIVA	218,6	203	209.2	6,944
PRIMEIRO REENOVELAMENTO	217	203,6	206,8	0,4845
SEGUNDO REENOVELAMENTO	218,8	202,8	209	3,349
TERCEIRO REENOVELAMENTO	218,4	202,6	209,8	3,979

TABELA 2 - Valores para os máximos, mínimos e zeros encontrados nas curvas de CD da frutalina. As frações reenoveladas estão em solução de PBS, e a fração nativa em PBS-D-galactose 0,1 M. Todos os valores da tabela foram extraídos da FIGURA IV.3.

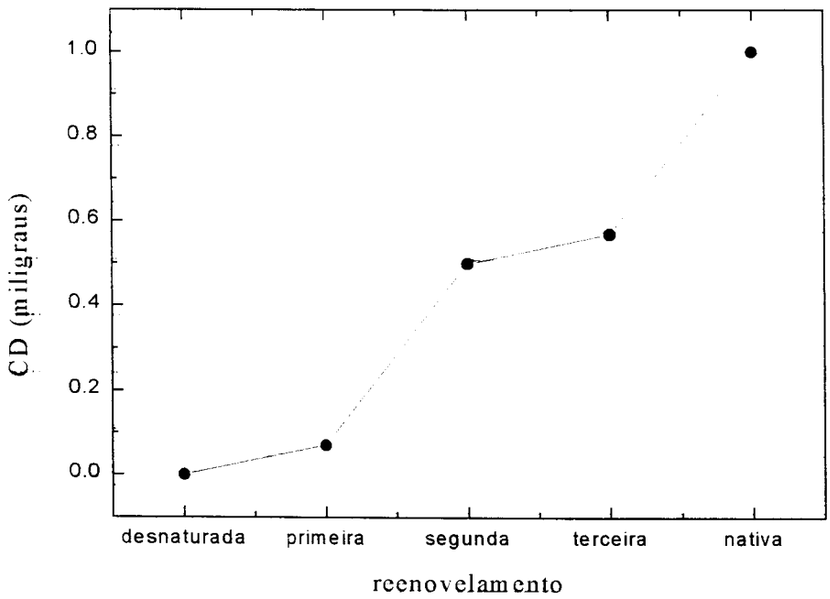


Figura IV.4 : Intensidade dos máximos das curvas de CD em 203 nm. Os valores constantes no gráfico acima foram obtidos a partir da FIGURA IV.3, e foram normalizados, para a fração nativa como um e para fração desnaturada como zero.

IV.4 - FLUORESCÊNCIA

As medidas fluorimétricas foram realizadas com as mesmas amostras utilizadas nas medidas de CD, porém adequadamente diluídas. Os espectros relativos aos tampões (PBS e PBS-D-galactose) foram subtraídos das medidas das proteínas. A FIGURA 5 mostra para a frutalina nativa um máximo de emissão de 330nm. Na frutalina desnaturada houve um deslocamento do máximo de emissão para 343,5nm e também uma diminuição da intensidade de fluorescência. Isto indica que os resíduos de triptofano estão mais expostos ao solvente, uma vez que para o triptofano livre, em solução, o máximo de emissão é em torno de 350nm. A diminuição da intensidade de fluorescência das formas desnaturadas para as reenoveladas e nativa pode ter ocorrido devido à presença de aminoácidos localizados próximos aos resíduos de triptofano, cujas cadeias laterais alterariam a polaridade do ambiente. O primeiro reenovelamento tem seu máximo em 339nm e o terceiro reenovelamento em 337,5nm, mostrando que as amostras apresentam seus máximos deslocados para mais próximo do máximo de emissão da frutalina nativa. A intensidade de fluorescência também aumentou, indicando que os resíduos de triptofano foram novamente "empacotados" no interior da proteína, ficando menos acessíveis ao solvente e à influência das cadeias laterais já discutidas acima.

Podemos inferir pelos resultados de CD, fluorescência e atividade biológica (que será discutida em detalhes na próxima seção) que nesta terceira fase ocorreu o reenovelamento a nível de estrutura terciária dos monômeros, bem como a formação de dímeros, uma vez que para as reações de aglutinação, são necessários pelo menos dois sítios de ligação para resíduos de açúcar. Esta interpretação tem como base a estrutura da jacalina, outra lectina de *Morácea*, que apresenta alta homologia com a frutalina, onde ocorre um sítio de ligação para a D-galactose por monômero.

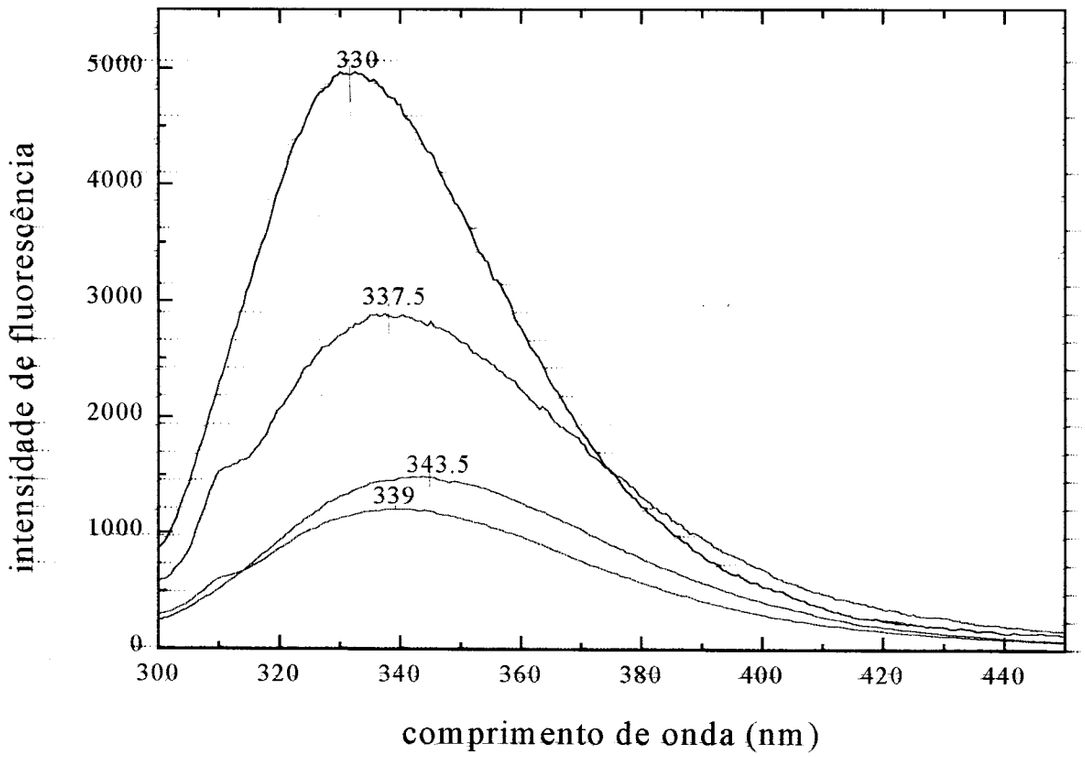


FIGURA IV.5: Espectros de emissão de fluorescência das amostras de frutalina: nativa (—), desnaturada (—), primeiro reenovelamento (—) e terceiro reenovelamento (—). Os máximos de emissão estão descritos na figura para cada uma das curvas. Todas as amostras estão na concentração de 0,18 mg/mL, foram medidas à temperatura ambiente (22°C) o espectro foi monitorado de 300 a 450 nm, com excitação em 280 nm, em cubeta retangular de 1cm de caminho ótico.

O protocolo de obtenção da frutalina desnaturada e reenovelada foi repetido treze vezes e os resultados sempre foram concordantes. Uma outra série de experimentos foi realizada visando a investigação dos processos de centrífugo-concentração, congelamento na presença do açúcar ligante e congelamento na ausência deste, todos separadamente.

•Etapa do congelamento inicial após desnaturação da frutalina para o início do processo de reenovelamento: foram realizados experimentos centrifugando e diluindo a proteína, sem os intervalos de congelamento (de 4 a 8 dias). Diluindo-se até três vezes o volume inicial e concentrando novamente, até obter aproximadamente 0,18 mg/mL, não ocorreram mudanças nos espectros de CD da frutalina desnaturada. A FIGURA IV.6 mostra quatro das quatorze tentativas de reenovelamento, realizadas sem o prévio congelamento das amostras. Este resultados são conclusivos de que a frutalina desnaturada, em solução, só foi reenovelada após permanecer congelada num período de pelo menos quatro dias, antes que se iniciem as centrífugo-concentrações.

•A influência do congelamento da frutalina desnaturada na ausência de D-galactose: neste caso também não ocorreu mudança no espectro da frutalina desnaturada, ou seja, o reenovelamento demonstrou ser dependente da presença do açúcar ligante da lectina durante o congelamento.

•Medidas de CD após descongelamento, e antes da centrífugo-concentração: foi observado sempre um perfil de CD igual aos obtidos antes de seu congelamento.

Nestes experimentos foi verificado, então que o processo de reenovelamento desta lectina é dependente do congelamento na presença de D-galactose seguido do processo de centrífugo-concentração combinados.

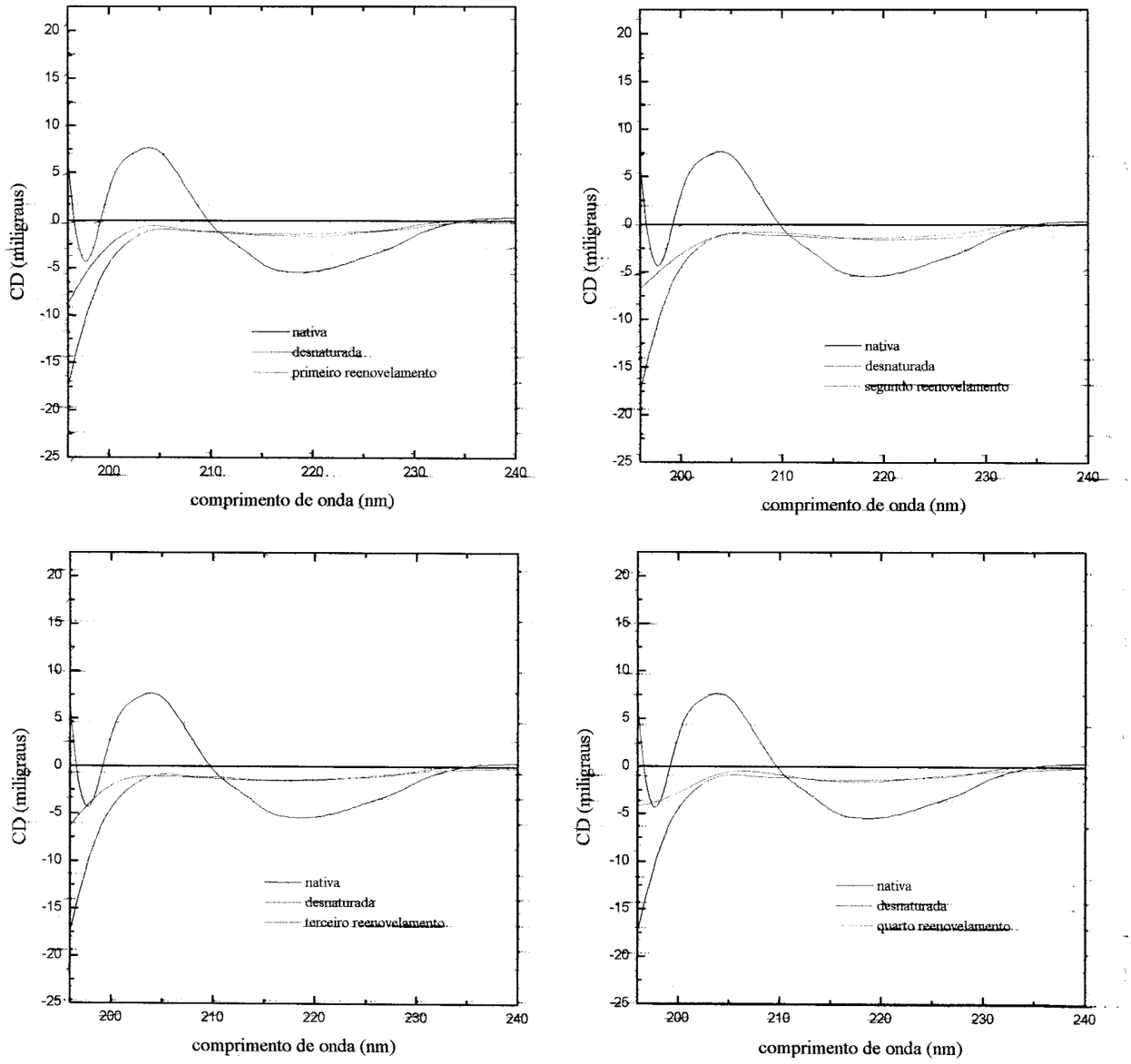


FIGURA IV.6: Espectros de CD das frações nativa (—), desnaturada (—), e várias tentativas de reenovelamento (—) da frutalina sem o prévio congelamento na presença de D-galactose. A concentração foi de 0,18 mg/mL de proteína, monitoradas de 196 a 240 nm, à temperatura ambiente (22°C) e em cubeta de quartzo de 1mm de caminho ótico.

IV.5 - ATIVIDADE BIOLÓGICA (HEMAGLUTINAÇÃO) PRESENTE NAS FRAÇÕES NATIVA E REENOVELADA

A TABELA 3 mostra os resultados dos testes de hemaglutinação. A reação foi realizada com frutalina nativa, com e sem D-galactose, com a frutalina desnaturada e com a frutalina após o terceiro reenovelamento.

	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
FRAÇÃO NATIVA COM D-GALACTOSE	+	+	+	+	+	–
FRAÇÃO DESNATURADA	+	–	–	–	–	–
TERCEIRO REENOVELAMENTO	+	+	+	+	+	–

TABELA 3: Reação de hemaglutinação com a frutalina nativa, desnaturada e reenovelada. O ensaio foi realizado com hemácias humanas tipo O, a 2% em PBS, à temperatura ambiente (22°C). A solução de proteína foi colocada em cada poço e foi feita uma diluição seriada subseqüênte em PBS, a seguir o mesmo volume de solução de hemácias foi adicionado à cada diluição. O volume inicial de solução de proteína foi de 25μl.

A frutalina reenovelada apresentou atividade hemaglutinante nas mesmas diluições que a fração nativa até 1:32, enquanto que a frutalina desnaturada mostrou aglutinação positiva na relação 1:2, que pode ser devido a uma pequena fração de frutalina nativa que tenha restado no meio. Este resultado sugere que a reenovelamento ocorreu a níveis de organização estrutural de moléculas superior ao da estrutura secundária.

A jacalina, que possui alta identidade com a frutalina, tem apenas um sítio ligante de açúcar por monômero (FIGURA IV.7) [Sankaranarayanan *et al.*, 1996], desta forma, para que a hemaglutinação ocorra é necessário que a jacalina esteja, no mínimo, na forma dimérica. Se o mesmo raciocínio for extendido à frutalina, então o reenovelamento ocorreu possivelmente a nível de reorganização estrutural dos monômeros que formaram pelos menos dímeros, pois o sítio de ligação foi recuperado.

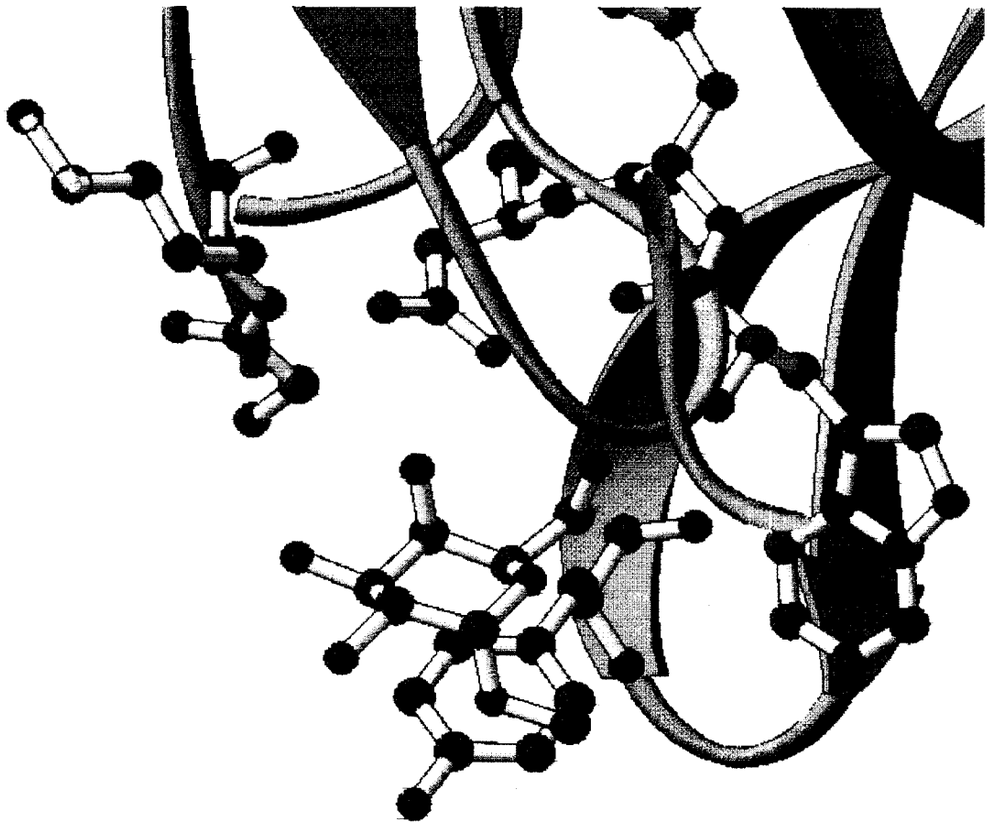


FIGURA IV.7: Detalhe do monômero de jacalina com D-galactose em seu sítio ligante. [FIGURA cedida por P. S. Oliveira, 1998]

IV.6 - REENOVELAMENTO DA FRUTALINA QUANDO CONGELADA COM OUTROS MONOSSACARÍDEOS

A estabilidade dos estados enovelados das proteínas têm demostrado ser dependente do solvente de uma forma geral [Timasheff *et al.*, 1993 ; Anfinsen, 1973]. Mais especificamente esta dependência é vista na viscosidade dos solventes [Waldburger *et al.*, 1995]; na troca de H_2O por D_2O no solvente [Itzhaki *et al.*, 1996], e em mudanças bruscas na temperatura do mesmo, ocasionando um reenovelamento rápido [Nölting, 1996]. Os experimentos mostrados nas FIGURAS IV.10 e IV.11 foram planejados para a verificação de que a importância da D-galactose no reenovelamento não é apenas pela viscosidade, mas pela sua estrutura. Assim, foi escolhido o monossacarídeo D-glicose, que tem uma hidroxila com a posição trocada em relação à D-galactose no Carbono 4, um dos carbonos envolvidos na ligação do sítio da jacalina (FIGURA IV.8). O segundo experimento foi realizado utilizando-se xilose pois este monossacarídeo é um pentose estruturalmente diferente dos dois anteriores (veja FIGURA IV.9).

Na FIGURA IV.10 temos os resultados do experimento de reenovelamento feito com o monosacarídeo D-glicose (tal como descrito em métodos, item III.3) apenas trocando a solução de PBS contendo D-galactose 0,1 M por uma solução de PBS contendo D-glicose 0,1M. Como se pode observar houve reenovelamento, embora menos intenso que quando feito com D-galactose. Para a frutalina nativa obtivemos os picos em 202,4nm e 219nm. Na curva desnaturada, assim como ocorreu para a desnaturação em presença de D-galactose, não temos mais os picos positivos e negativos e a curva não mais cruza a linha de y=0. Para a curva do primeiro reenovelamento temos um pico positivo na região de 204,2nm e o negativo ficou em 217,2nm. O melhor reenovelamento teve seu pico positivo em 202,8nm e o negativo em 218,6nm, e ponto no qual obtivemos o valor de CD igual a zero também foi mais próximo da nativa do que as demais curvas (207,2nm e 209,8 para a nativa). O segundo reenovelamento não apresentou pico positivo. Estes valores estão na TABELA 4 para que se possa compará-los mais facilmente. A coluna chamada ZERO nos mostra para quais valores de comprimento de onda obtivemos CD igual a zero no momento em que se inicia a formação do pico positivo. E as colunas de MÁXIMO e

MÍNIMO nos mostram em quais comprimentos de onda temos o pico máximo positivo e o máximo negativo.

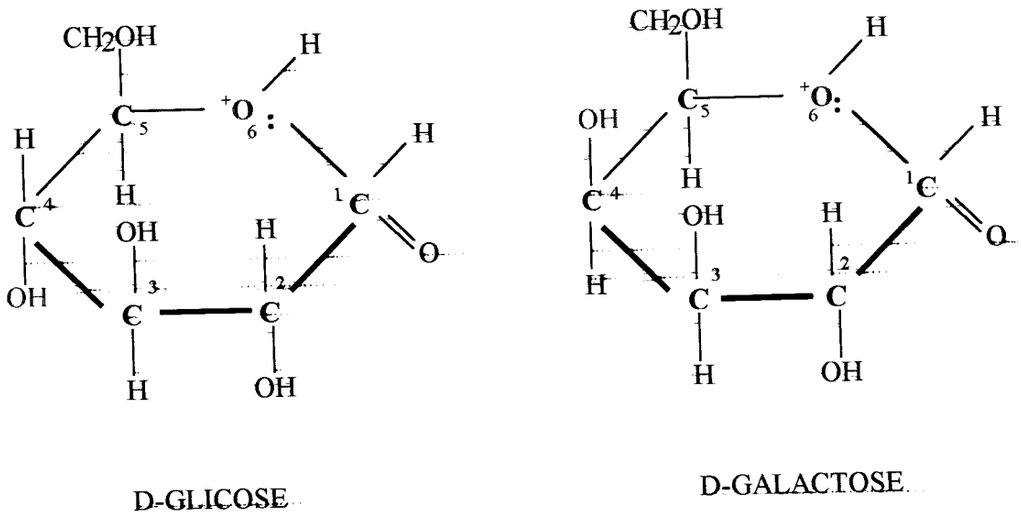


FIGURA IV.8: Estruturas dos monossacarídeos D-galactose e D-glicose. Ambos são hexoses e sua única diferença é uma hidroxila com a posição trocada no carbono 4 (em azul).

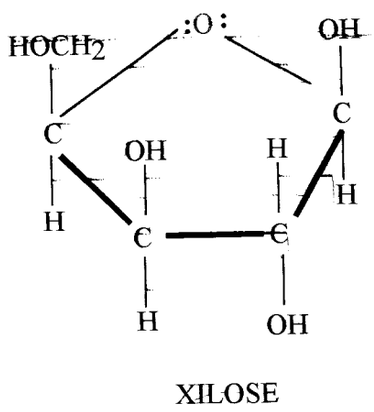


FIGURA IV.9: Estrutura cíclica do monossacarídeo xilose.

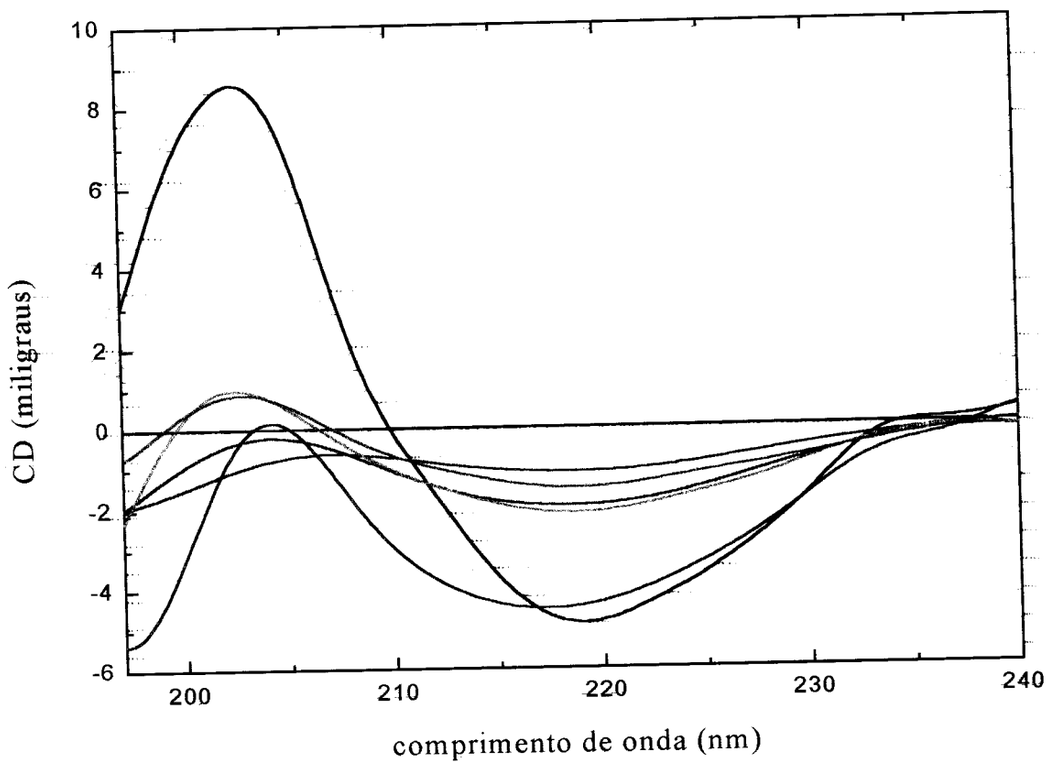


FIGURA IV.10 - Espectro de CD das frações nativa (—), desnaturada (—), primeiro reenovelamento (—), segundo reenovelamento (—), terceiro reenovelamento ( ) e quarto reenovelamento (—) de frutalina. As frações nativa e desnaturada estão em solução contendo 0,1 M de D-glicose em PBS, e as demais estão em PBS. Todas as frações foram medidas com igual concentração de 0,18 mg/mL de proteína, monitoradas de 196 a 240 nm, à temperatura ambiente (22°C) e em cubeta de quartzo de 1mm de caminho ótico.

	MÍNIMO nm	MÁXIMO nm	ZERO nm	INTENSIDADES miligraus
NATIVA	219	202,6	209,8	8,57
PRIMEIRO REENOVELAMENTO	217,2	204,2	205,2	0,1669
SEGUNDO REENOVELAMENTO	218,2	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE
TERCEIRO REENOVELAMENTO	218,6	202,4	206,6	0,9823
QUARTO REENOVELAMENTO	218,6	202,8	207,2	0,8761

TABELA 4 - Valores para os máximos, mínimos e zeros encontrados nas curvas de CD da frutalina na presença de D-glicose 0,1M. Todos os valores da tabela foram extraídos da FIGURA IV.10.

Observa-se experimentalmente no laboratório que tanto a jacalina quanto a frutalina interagem com a resina Sephadex, cuja matriz é polímero de glicose (dextran) sendo eluída com solução deste monossacarídeo, e este fato pode justificar então a ocorrência do reenovelamento na presença de D-glicose, uma vez que este açúcar também é ligante das lectinas citadas anteriormente (FIGURA IV.9). Fica deste modo, uma dúvida: o reenovelamentro teria sido promovido por especificidade do monossacarídeo ou por viscosidade ? Os resultados obtidos no próximo experimento, feito com xilose, tentam resolver este problema, já que a xilose é uma pentose estruturalmente bem diferente dos monossacarídeos anteriormente utilizados.

A frutalina nativa foi desnaturada na presença de xilose. A FIGURA IV.11 mostra as curvas de CD da frutalina nativa em solução contendo 0,1M de xilose-PBS, desnaturada, também na mesma solução, e o primeiro reenovelamento. O espectro da frutalina nativa na presença de xilose tem um máximo em 202,8nm, um mínimo em 219,4nm e seu zero está em 209,2nm. O espectro desnaturado, assim como para a desnaturação com D-galactose e D-glicose, não apresenta os picos presentes no espectro da frutalina nativa. As curvas de desnaturação e de primeira reenovelamento não apresentam características da curva nativa. Na desnaturada temos a ausência dos picos de máximo e mínimo, assim como a curva desnaturada para os demais tampões (D-galactose, D-glicose), e a curva da primeira reenovelamento apresentou um pico negativo que também não se assemelha aos máximos e mínimos obtidos para a frutalina nativa em xilose. Os reenovelamentos seguintes resultaram em espectros desnaturados totalmente.

Este experimento mostrou que monossacarídeos contendo uma configuração bem diferente daquela encontrada nas hexoses, não favorecerá o reenovelamento da Frutalina.

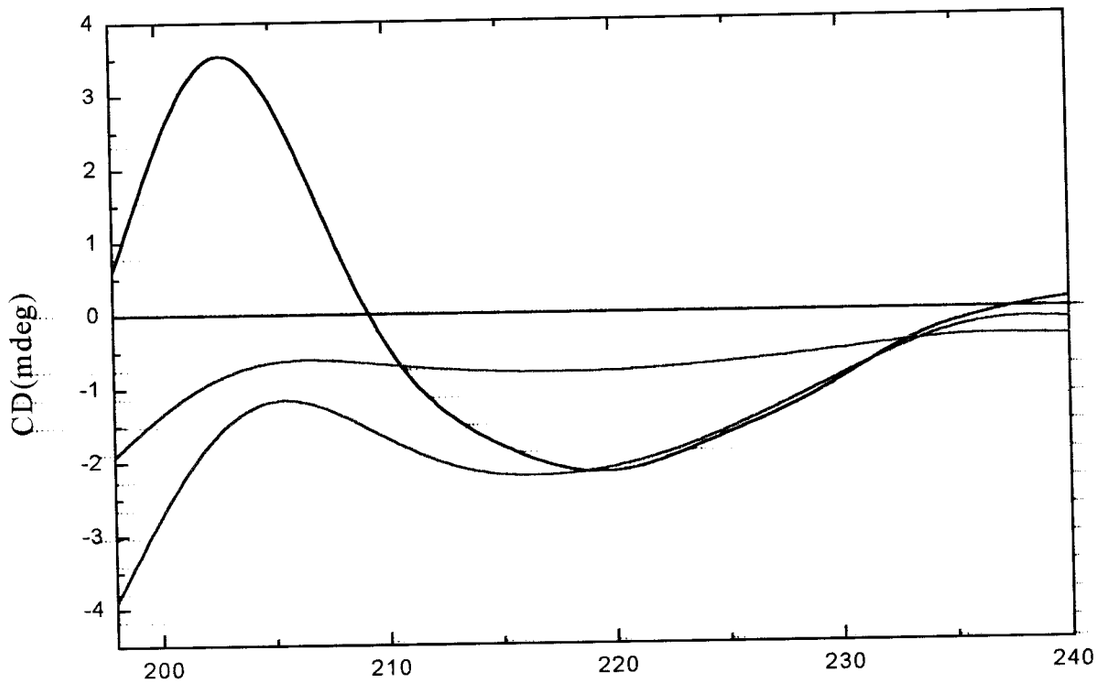


FIGURA IV.11 - Espectro de CD das frações nativa (—), desnaturada (—), primeiro reenovelamento (—), de frutalina. As frações nativa e desnaturada estão em solução contendo 0,1 M de xilose em PBS, e a fração da primeira tentativa de reenovelamento está em PBS. Todas as frações foram medidas com igual concentração de 0,18 mg/mL de proteína, monitoradas de 196 a 240 nm, à temperatura ambiente (22°C) e em cubeta de quartzo de 1mm de caminho ótico.

IV 7- ESTIMATIVA DO CONTEÚDO DE ESTRUTURA SECUNDÁRIA

Os espectros de CD das amostras de frutalina nativa, primeiro e segundo reenovelamentos foram analisadas pelo método CCA para a análise do conteúdo das frações de estrutura secundária. A FIGURA IV.12 mostra as curvas experimental e calculada da frutalina nativa pelo método CCA. A comparação dos dois espectros é usada pra analisar a qualidade da desconvolução, traduzida pelo espectro calculado pelo programa (RMS 2%). A FIGURA IV.13 mostra a decomposição da curva de CD nas cinco curvas puras. Cada uma destas cinco curvas é comparável a uma estrutura secundária característica de acordo com as curvas de referência.

A decomposição do espectro de CD revelou 80% de estruturas beta, nenhuma estrutura em hélice alfa; contribuições aromáticas e aleatórias 5% e desordenada 14%, como descrito na TABELA 5. Estes resultados mostram a semelhança com a jacalina que não contém estruturas helicoidais, e tem um enovelamento, determinado pela Cristalografia e difração de raios X, constituído de 3 β prisma simétricos de quatro fitas beta cada um (FIGURA IV.14) [Sankaranarayanan *et al.*, 1996].

As FIGURAS IV.15 e IV.16 mostram a desconvolução para a curva de CD da frutalina renaturada (segundo reenovelamento). Na FIGURA IV.15 tem-se as curvas experimental e a calculada pelo CCA. Quando sobrepostas não se observa diferença significativa (RMS 1%). Na FIGURA IV.16 tem-se a curva de CD decomposta nas cinco componentes puras. Assim como na FIGURA IV.13 utilizou-se as curvas padrões para as cinco componentas puras. Como era esperado, no reenovelamento há uma alta porcentagem de estrutura beta (70%), mostrando o rearranjo da forma desnaturada. O programa calculou valores de hélice alfa em cerca de 3%, que não se obtém na proteína nativa, e 23% de desordenada enquanto que para a proteína nativa é de apenas 15%. Na TABELA 5 estão resumidos estes resultados.

ESC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA E

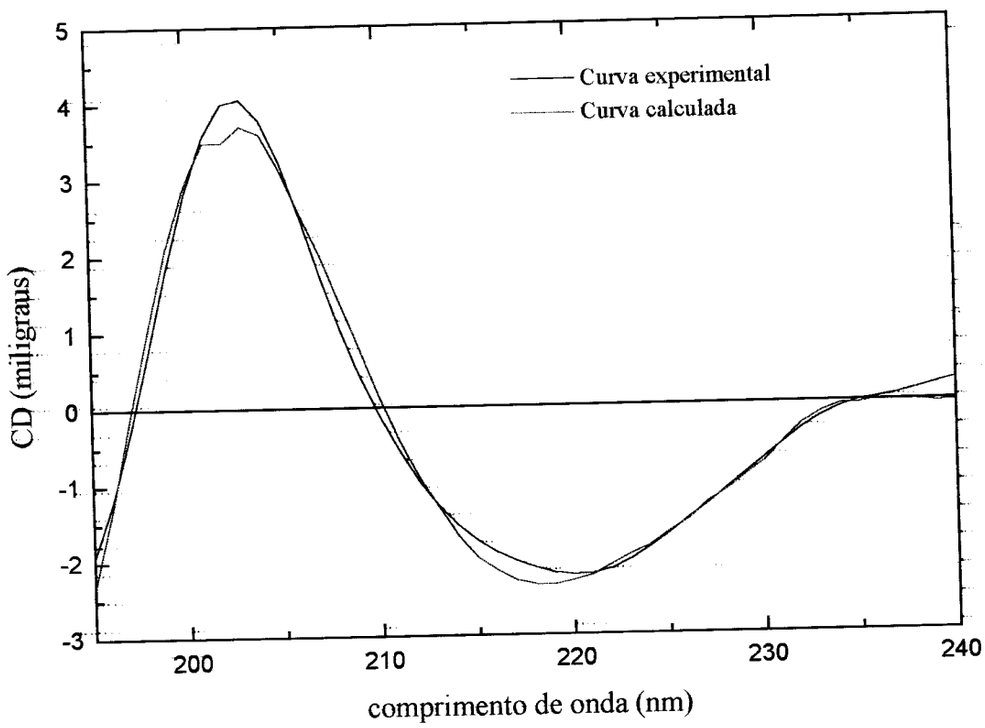


FIGURA IV.12: Simulação do espectro de CD para a frutalina nativa em D-galactose - PBS. Curva experimental (—) e curva calculada pelo programa (—).

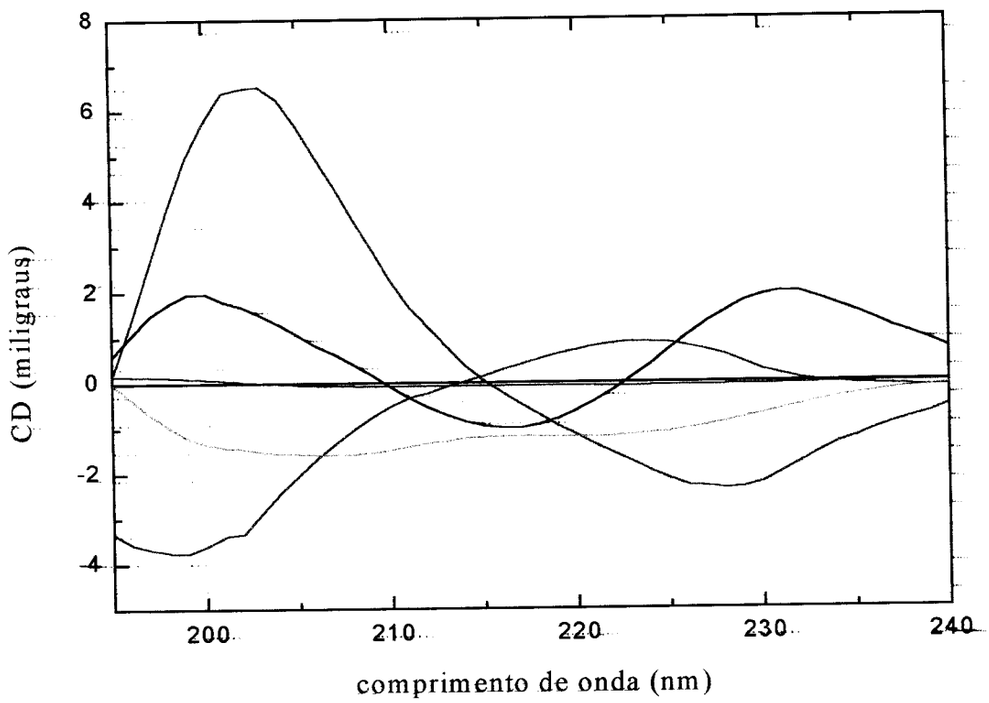


FIGURA IV.13: Cinco curvas puras calculadas pelo programa CCA para a simulação do espectro de CD para a frutalina nativa. obtivemos 22% para voltas beta (—), 0% para hélices alfa (—), 15% para estruturas desordenadas (—), 58% para folhas beta (—), e 5% para contribuições adicionais ( ).

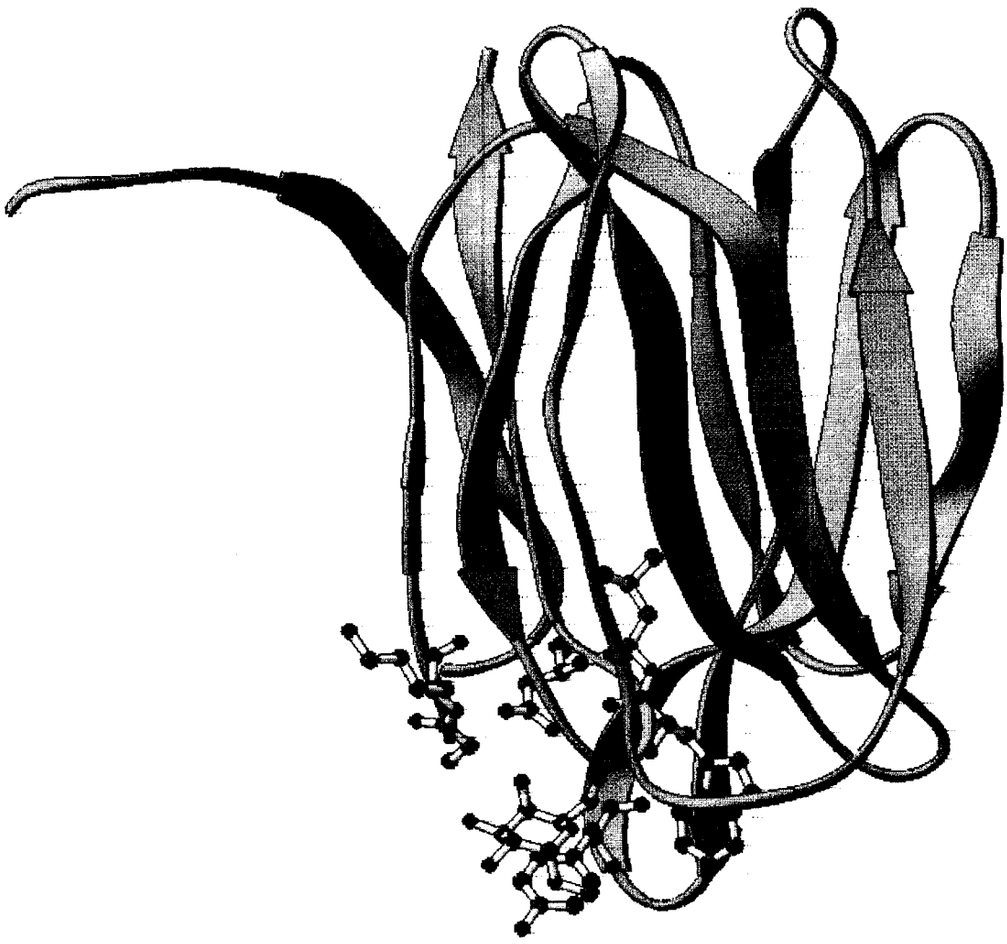


FIGURA IV.14: Monômero de jacalina com D-galactose em seu sítio ligante. [FIGURA cedida por P. S. Oliveira, 1998]

	HÉLICES ALFA	FOLHAS E VOLTAS BETA	CONTRIBUIÇÕES ADICIONAIS	ESTRUTURA DESORDENADA	ERRO
FRAÇÃO NATIVA	0%	80%	5%	15%	2%
SEGUNDO REENOVELAMENTO	3%	79%	6%	13%	3%

TABELA 5 - Nesta tabela encontram-se as frações estimadas de estrutura secundária pelo programa CCA para os espectros de CD da frutalina nativa e do segundo reenovelamento.

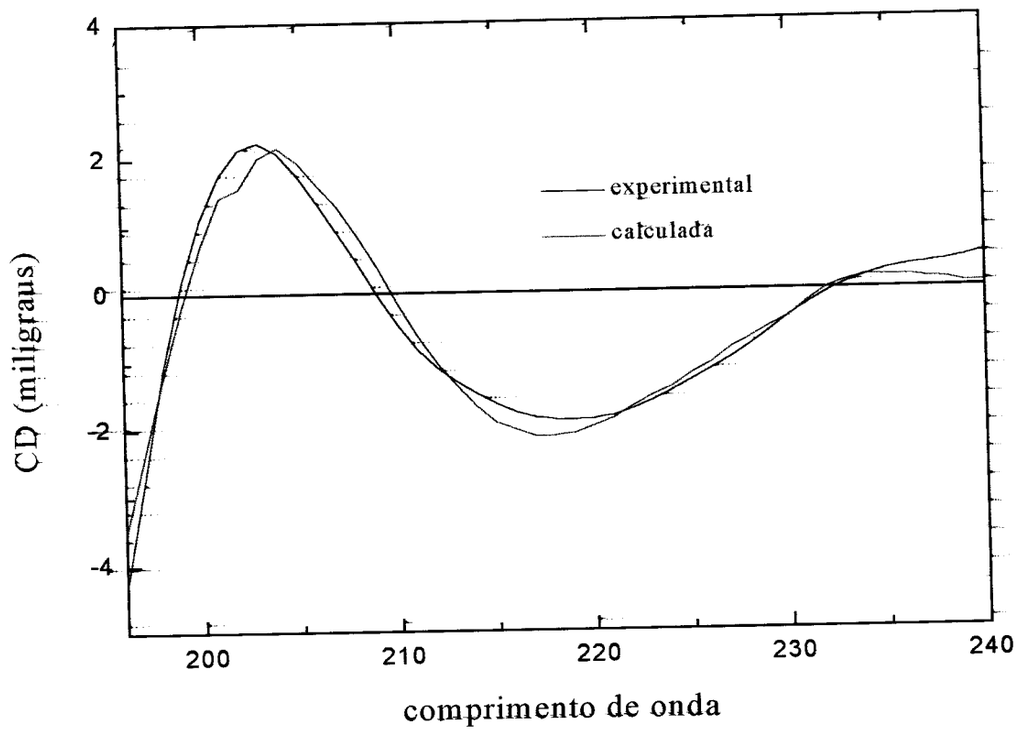


FIGURA IV.15: Simulação do espectro de CD para o segundo reenovelamento da frutalina em D-galactose - PBS. Curva experimental (—) e curva calculada pelo programa (—).

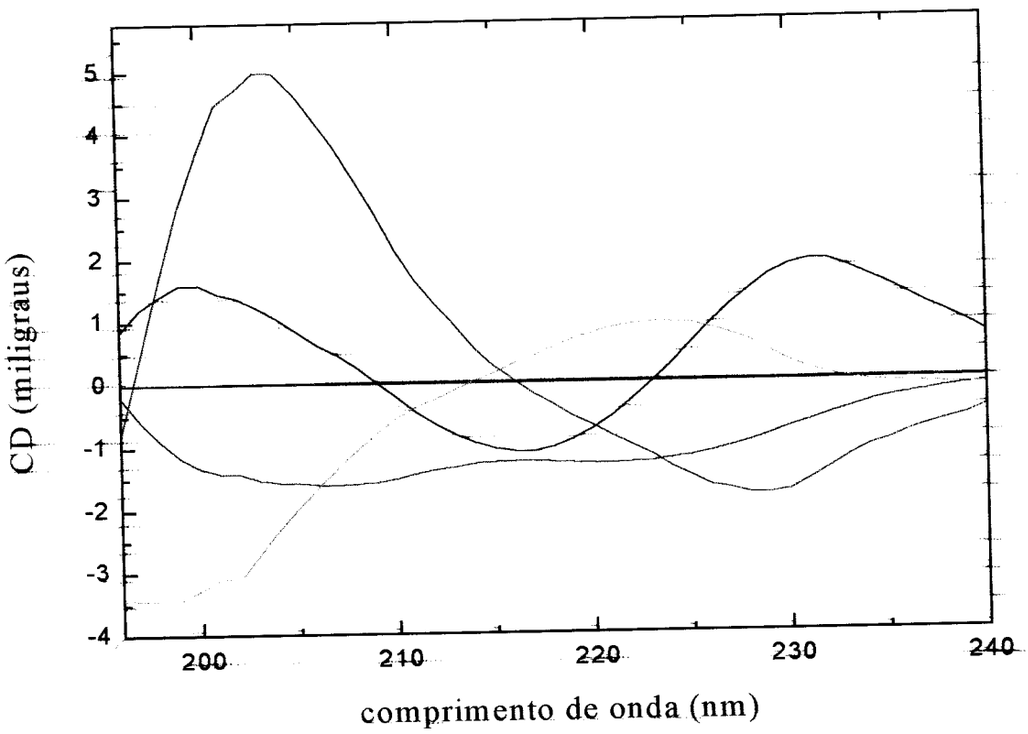


FIGURA IV.16: Cinco curvas puras calculadas pelo programa CCA para a simulação do espectro de CD da frutalina após o segundo reenovelamento. Temos 22% para voltas beta (—), 2% para hélices alfa (—), 6% para contribuições adicionais (—), 57% para folhas beta antiparalelas (—) e 13% para estruturas desordenadas ( ).

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO

V - CONCLUSÕES

- **tempo de congelamento** - um período de congelamento da frutalina desnaturada foi necessário no processo de reenovelamento, e o mínimo foi de quatro dias, evidenciando que possa haver um equilíbrio dinâmico entre o solvente e a proteína enquanto congelados.
- **presença do açúcar** - o congelamento na ausência de um açúcar ligante (D-galactose preferencialmente) não promove o reenovelmento. Além disso, o açúcar foi importante no equilíbrio estrutural da frutalina congelada, uma vez que o tempo de desnaturação aumenta proporcionalmente ao período no qual ela permanece estocada a -18°C.
- **centrífugo-concentração** - este processo também foi necessário para que o reenovelamento ocorresse, pois o congelamento "per si" não foi suficiente para promovê-lo, como pode ser visto na seção IV.4 (página 61).
- **especificidade do açúcar ligante** - a frutalina quando congelada em PBS contendo xilose (uma pentose) não sofreu reenovelamento, ao contrário dos resultados obtidos com D-glicose (outra hexose) cuja estrutura difere da D-galactose somente pela posição da hidroxila do carbono 4 que é equatorial. Como a jacalina, que além de D-galactose também liga D-glicose, a frutalina teve comportamento semelhante, isto é, a D-glicose promoveu um certo grau de reenovelamento. Estes resultados são compatíveis com a alta identidade da seqüência N-terminal da frutalina em relação a jacalina (98% quando analisado até o resíduo 68) e ainda, seus espectros de CD são bastante parecidos. Este fato nos leva a inferir que o sítio ligante de D-galactose na frutalina deve ser semelhante ao da jacalina, que pode ser observado na FIGURA IV.14.

- **mecanismo proposto para o reenovelamento** - a dependência do monossacarídeo ligante para que o reenovelamento ocorra sugere que este poderia ser o "motivo" para a nucleação inicial do processo como um todo. Provavelmente estes resultados aproximam-se mais do modelo "nucleação-condensação" [Fersht, 1997], pois o sítio ligante do açúcar, seria composto tanto de resíduos próximos na estrutura secundária quanto de resíduos que são aproximados pelas componentes da estrutura terciária. Como é proposto para proteínas maiores, seriam formadas unidades básicas de enovelamento, denominadas "foldons", por nucleação-condensação, o que resulta em um mecanismo de multinucleação.

  Sendo a frutalina funcional, do ponto de vista biológico, na forma dimérica ou tetramérica, à medida que os monômeros se reenovelassem estes se organizariam em formas oligoméricas (dimeros ?), resultando em uma proteína reenovelada e funcionalmente ativa. A reorganização na forma de dímeros explicaria o fato de os espectros de CD e Fluorescência não terem exatamente o mesmo aspecto da proteína nativa.

Esta proposta deverá ser comprovada experimentalmente através da obtenção de quantidades relevantes de frutalina na forma reenovelada para que possamos planejar experimentos de filtração molecular, cromatografia de fase reversa e medidas de fluorescência (anisotropia) onde se possa separar as diferentes formas moleculares e calcular o tempo de correlação rotacional inferindo o tamanho da molécula, definindo se a proteína reenovelada encontra-se na forma de dímero ou tetrâmero.

VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABKEVICH, V. I., GUTIN, A. M., e SHAKHNOVICH, E. I. (1994) - Specific nucleus as the transition state for protein folding: evidence from the lattice model. **Biochemistry. 33:** 10026-10036.

- ALLEN, A. D. (1983) - Potato lectin - a glycoprotein with two domains. **Chemical taxonomy, Molecular Biology, Function of Plant Lectins**. Ed. GOLDSTEIN, I. J. & ETZLER, M. E., Nova *Iorque*

- ANFINSEN, C. B. (1973) - Principles that govern the folding of protein chains. **Science 181 (4096):**223-181.

- BARBIERI, L., BATTELLI, M.G., e STIRPE, F. (1993) - Ribossome-inactivating Proteins From Plants. **Biochimica et Biophysica Acta. 1154:**237-282

- BARONDES, S. H., COOPER, D. N. W., GITT, M. A., e LEFFER H. (1994) - GALECTINS - Structure end function of a large family of animal lectins. **J. Bio. Chem. 269:** 1-5

- BATAS, B., JONES, H. R., e CHAUDHURI, J. B. (1997) - Studies of hydrodynamic volume changes that occur during refolding of lysozyme using size-exclusion chromatography. **Journal of Chromatography A 766:**109119.

- BAYLEY, P. M., NIELSEN, E. B., e SCHELLMAN, J. A. (1969) **J. Phys Chem**.

- BEVILACQUA, M. P. (1993) - endothelial-leukocyte adhesion molecules. **Annu. Rev. Immunol. 11:** 767-804.

- BÖHM, G., MUHR, R., e JAENICKE, R. (1992) - QUANTITATIVE-ANALYSIS OF PROTEIN FAR UV CIRCULAR-DICHROISM SPECTRA BY NEURAL NETWORKS. **Protein Eng. 5:**191-195.

- BRAHMS, S., BRAHMS, J., SPACH, G., e BRACK, A. (1977) - IDENTIFICATION OF BETA.BETA-TURNS AND UNORDERED CONFORMATIONS IN POLYPEPTIDE-CHAINS BY VACUUM UV CIRCULAR-DICHROISM **Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74:** 3208.

- BRANDEN, C., TOOZE, J. (1991) - **Introducion to Protein Structure**. Garland Publishing, Inc. Nova Iorque e Londres.

- BROEKAERT, W. F. e PEUMANS, W. J. (1996) - Lectin release from seeds of *datura stramonium* lectin with bacterial motility. **Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**. Ed. BOG-HANSEN, T. C. e VAN DRIESSCHE, E. vol **5:** 57-65. Berlim

- CAMMUE, B. P., PEETERS, B. e PEAUMANS, W. J. (1986) - A new lectin from tulip bulbs. **Plant 169:**583-588.

- CAMPANA, P. T., OLIVEIRA, M. L. de, e BELTRAMINI, L. M. (1997b) - Unfolding and Refolding Studies of lectins from *Artocarpus incisa* seeds. In: **XXIVª REUNIÃO ANUAL SBBq**, Caxambú-MG.

- CAMPANA, P.T., MOREIRA, R.A., e BELTRAMINI, L.M (1997a) - Refolding Studies of frutalin: a lectin isolated from *Artocarpus incisa* seeds. In: **INTERLEC17 - 17th INTERNATIONAL MEETING - Würzburg - Alemanha**.

- CANTOR, C. R., e SCHIMEL, P. R. (1942) - **Techniques for the study of biological structure and function.** Freeman and Company, 1980

- CANTOR, C. R., IVANOV, V. T., LIS, H., OVCHIMIKOV, Y. A., SHARON, N., e TIMASHEFF, S. N. (1982). *The Proteins*. **Academic Press**, Nova Iorque.

- CHANG, C. T., WU, C. -S. C. e YANG, J. T. (1978) - Circular dichroic analysis of protein conformation: Inclusion of β-turns. **Anal. Biochem. (1991):**13-31.

- CREIGHTON, T. E. (1995) - Protein folding: an folding story. **Current Biol. 5:** 353-356

- DILL, K. A., BRONBERG, S., YUE, K. Z., FIEBIR, K. M., YEE, D. P., THOMAS, P. D., e CHAN, H. S. (1995) - Principles of protein folding - a perspective from simple exact models. **Protein Sci. 4:** 561-602.

- EMSLEY, J., WHITE H. E., O'HARA, B. P., OLIVA, G., e SRINIVISAN, N. (1994) - STRUCTURE OF PENTAMERIC HUMAN SERUM AMYLOID-P COMPONENT. **Nature 367:**338-45.

- FASMAN, GERALD D. **Circular Dichroism**. (1996) Nova *Iorque*, Plenum Press.

- FERSHT, A. R. (1987) - Dissection of the structure and activity of the tyrosil-tRNA Synthetase by Site-Direct Mutagenesis. **Biochemistry. 26:** 8031-8037.

- FERSHT, A. R. (1997) - Nucleation mechanisms in protein folding. **Current Opinion in Structural Biology 7:**3-9.
- FERSHT, A. R. (1995) - Characterizing transition states in protein folding: an essential step in the puzzle. **Current Opinion in Structural Biology 5:**79-84.

- FRANZ, H. (1989) - Viscaceae lectins. **Advances in Lectin Research 2:**28-59.

- GANIKO, L. M., ESPREÁFICO, E. M., ROQUE-BARREIRA, M. C. (1197). - KM+ - INDUCED NEUTROPHIL HAPTOTAXIS: POTENTIATION BY HEPARIN SULFATE. **Glicoconjucate Journal**, in press

- GREENFIELD, N. J. (1995) - METHODS TO ESTIMATE THE CONFORMATION OF PROTEINS AND POLYPEPTIDES FROM CIRCULAR DICHROISM DATA. **Anal. Biochem. 235:**1-10

- GREENFIELD, N., e FASMAN, G. D.(1969) - COMPUTED CIRCULAR DICHROISM SPECTRA FOR THE EVALUATION OF PROTEIN CONFORMATION. **Biochemistry. 8:** 4108.

- GUO, Z. Y., e THIRUMALAI, D. (1995) - Kinetics of protein folding: nucleation mechanism, time scales, and pathways. **Biopolymers. 36:** 83-102.

- GUTIM, A. M., ABKEVICH, V. I., e SHAKHNOVICH, E. I. (1995) - Is burst hydrophobic collapse necessary for protein folding?. **Biochemistry. 34:** 3066-3076.

- HEIDARY, D. K., GROSS, L. A., ROY, M. e JENNINGS, P. A. (1997) - Evidence for an obligatory intermediate in the folding of interleukin-1β. **Nature Structural Biology 4(9):**725-731.

- HENNESSEY, J. P. JR., e JOHNSON, W. C. Jr (1981) - Information content in the Circular Dichroism of proteins. **Biochemistry 20:**1085-1094.

- HESTER, G., HANAE, K., IRWIN, J. G., e WRIGHT, S. C. (1995) - Structure of mannose-specific snowdrop (*Galanthus nivalis*) lectin is representative of a new plant lectin family. **Nature Structural Biology 2(6):**472-479.

- ITZHAKI, L. S., e EVANS, P.A. (1996)- "Solvent Isotope Effects On The "refolding" Kinetics Of Hen Egg-white Lysozyme". **Protein Science. 5:**140-146.

- ITZHAKI, L. S., OTZEN, D. E., e FERSHT, A. R. (1995) - The structure of the transition-state for folding of chymotrypsin inhibitor-2 analyzed by protein engineering methods - evidence for a nucleation-condensation mechanism for protein folding. **J. Mol. Biol. 254:** 260-288.

- KARPLUS, M., e WEAVER, D. L. (1994) - Protein folding dynamics - the diffusion-collision model and experimental data. **Protein Sci. 3:** 650-668.

- LACKOWICZ, J. R. (1983). *Principles of Fluorescence spectroscopy*. **Plenum Press**, Nova Iorque.

- LEVINTHAL, C. (1968) - Are there pathways for protein folding?. **J. Chem. Phys. 85:** 44-45.

- LOWRY, T .M.(1935) - Optical Rotatory Power, Longmans, Green, London, reprinted by Dover publications, New York, 1964

- MALECKI, J., e WASYLEWSKI, Z. (1996) - Stability and kinetics of unfolding and refolding of cAMP receptor protein from *Escherichia coli*. **Eur. J. Biochem. 243**:660-669.

- MATHEWS, R. C. (1993) - Pathways of protein folding. **Annu. Rev. Biochem. 62:**653-683.

- MONTEIRO, A. C. O. (1998) - CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E ESTRUTURAIS DA FRUTALINA, UMA LECTINA D-GALACTOSE ESPECÍFICA DE *Artocarpus incisa*. Dissertação de mestrado apresentada à Universidade Federal do Ceará.

- MONTEIRO, A.C.O.; BELTRAMINI, L.M.; MOREIRA, e R.A.(1995) - Studies of structure and biological activity of lectins frutalin and jacalin monitored by circular Dichroism and Fluorescence. In: **XXIV^a_REUNIÃO ANUAL SBBq**, Caxambú-MG, 06-09 mai/95.

- MOREIRA, R.A., CASTELO BRANCO, C.C., MONTEIRO, A.C.O., TAVARES, R.O. e BELTRAMINI, L.M. (1997) - "Isolation and Partial Characterization of a Lectin from Artocarpus incisa L. Seeds". **Phytochemistry,46(1):**139-144.

♣ NAKANISH, K.; BEROVA, N.; e WOODY, R. W. (1994) *Circular Dichroism - Principles and Applications*. Nova *Iorque*, VCH Publishers, Inc.

♣ NEIRA, J. L., DAVIS, B., PRAT GRAY, G. D., LADUMER, A. G., BUCKLE, A. M., e FERSHT, A. (1996) - Towards the complete structural characterization os a protein folding pathway; the structures of the denatured, transition and native states for the association/folding of two complementary fragments of cleaved chymotrypsin inhibitor 2. Direct evidence of a nucleation mechanism. **Fold Des.. 1:** 189-208.

♣ NÖLTING, B. (1996) - Temperature-jump fast "refolding" of cold-unfolded protein. **Biochem. And Biophys. Researche Comm. 227:** 903-908.

♣ OLIVEIRA, P. S. L., GARRATT, R. C., MASCARENHAS, Y. P., BELTRAMINI, L. M. e ROQUE-BARREIRA, M. C. (1997) - CRYSTALLIZATION AND PRELIMINARY CRYSTALLOGRAPHIC DATA OF A NEUTROPHIL MIGRATION-INDUCING LECTIN (KM+) EXTRACTED FROM THE SEEDS OF *Artocarpus integrifolia*. **Protein Structure, Function and Genetics 27**, 157-159

♣ PANCHENKO, A. R., LUTHEYSCHULTEN, Z., e WOLYNES, P. G. (1996) - Foldons, protein structural modules, and exons. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93:** 2008-2013.

♣ PEAUMANS, W. J., e VAN DAMME, E. J. M. (1995) - The role of lectins in plant defense. **Histochemical journal 27:**253-271.

♣ PERCZEL, A., HOLLÓSI, M., TUSNÁDY, G., e FASMAN, G. D (1991) - Convex constraint analysis: A natural deconvolution of the Circular Dichroism curves of proteins. **Protein Eng. 4:**669-679.

♣ PERCZEL, A., PARK, K., e FASMAN, G. D., (1992a) - Deconvolution of the Circular Dichroism spectra of proteins: The Circular Dichroism spectra of the antiparallel β-sheet in proteins. **Protein Structure, Function and Genetics 3:**57-69.

♣ PERCZEL, A., PARK, K., e FASMAN, G. D., (1992b) - Analysis of the Circular Dichroism spectrum of proteins using the convex constraint algorithm: A practical guide. **Anal. Biochem. 203:**38-93.

♣ PEUMANS, W. J., DE LEY, M. e BROEKART, W. F. (1984) - An usual lectin from stinging nettle (*Urtica dioica*) rhizomes. **FEBS Lett. 177:** 99-103

♣ PEUMANS, W. J., NSIMBA-LUBAKI, M., CARLIER, A. R. e VAN DRIESSCHE, E.(1984) - A lectin from *Bryonia dioica* root stocks. **Planta 160:**222-228

- PEUMANS, W. J., NSIMBA-LUBAKI, M., PEETERS, B. e BROEKART, W. F. (1985) - Isolation and partial characterization of a lectin from *Aegopodium podagraria* rhizomes. **Planta 164:** 75-82

- PROVENCHER, S. W., e GLÖCKER, J. (1981) - ESTIMATION OF GLOBULAR PROTEIN SECONDARY STRUCTURE FROM CIRCULAR-DICHROISM. **Biochemistry 20:**33-37.

- PTITSYN, O. (1996) - How molten is the molten globule?. **Nat. Struct. Biol. 3:** 488-490.

- PTITSYN. O. B. (1963) - Stage mechanism of self-organization of protein molecules. **Dokl. Acad. Nauk. 210:** 1213-1215.

- QUADRIFOGLIO, F., e URRY, D. W. (1968). **Int. J. Pep. Protein Res. 5:** 179.

- REEKE, N. G. JR., BECKER, J. W., e EDELMAN, G. M. (1975) - The covalent and Tree-Dimensional structure of Concanavalin A. **The journal of Biological Chemistry. 2250(4):**1525-1547.

- ROSA, J. C., OLIVEIRA, P. S. L., GARRAT, R. C., e GREENE, L. J.(1998) resultados não publicados

- SANHARANARAYANAN, R., *et al.* (1996) - A novel mode of carbohydrate recognition in Jacalin, a Moraceae plant lectin with β-prism fold. **Nature Structure Biology. 3(7):**596-603.

- SANTOS-OLIVEIRA, R., DIAS-BARUFFI, M., THOMAS, S.M.O., BELTRAMINI, L.M., e ROQUE-BARREIRA, M.C. (1994) - A neutrophil migration-inducing lectin from *Artocarpus integrifolia*. **J. Immunology. 153:**1798-1807.

- SHARON, N. (1993) - Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals: an atomic view. **Trends Biochem. Sci. 18**: 221.

- SHARON, N. e LIS, H. (1989) - Lectins as cells recognition molecules. **Science 246:** 227.

- SHARON, N. e LIS, H. (1993) - Carbohydrates in cell recognition. **Scientific American, 268** (1):82.

♣ SILVA-LUCCA, R. A., LAURE, H. J., e BELTRAMINI, L. M.(1997b) - Km+: A Neutrophil Migration - Inducing lectin and trypsin inibhitor. In: **XXIVª REUNIÃO ANUAL SBBq**, Caxambú-MG.

♣ SILVA-LUCCA, R. A., MARLETTA, A., BELTRAMINI, L. M., e CAMPANA, P. T.(1996) - Roteiro para a Utilização do Programa CCA. **Publicação Interna do grupo de Biofísica Molecular e Espectroscopia do IFSC - USP**.

♣ SILVA-LUCCA, R. A., TABAK, M., NASCIMENTO, O. R., ROQUE-BARREIRA, M. C., e BELTRAMINI, L.M. (1997a) - Structural and Thermodynamic studies of KM+: a D-Mannose binding lectin from *Artocarpus integrifolia* seeds. Submitted for publication in **Archives of Biochemistry and Biophysics**.

♣ SOSNICK, T. R., MAYNE, L., HILLER, R., e ENGLANDER, S. W. (1994) - The barriers in protein folding. **Nat. Struct. Biol. 1:** 149-156.

♣ SREERAMA, N., e WOODY, R. W. (1993) - a self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from Circular Dichroism. **Anal. Biochem. 209:**32-44.

♣ SREERAMA, N., e WOODY, R. W. (1994a) - poly (pro) II helices in globular proteins: identification and Circular Dichroism analysis. **Biochemistry 33:**10022-10025.

♣ SREERAMA, N., e WOODY, R. W. (1994b) - Protein secondary structure from Circular Dichroism spectroscopy - combining variable selection principle and cluster analysis with neural network, ridge regression and self consistent. **J. Mol. Biol. 242:**497-507.

♣ THIRUMALAI, D. (1995) - From minimal models to real proteins - time scales for protein folding kinetics. **J. Phys I. 5:** 1457-1467.

♣ THIRUMALAI, D., e GUO, Z. Y. (1995) - Nucleation mechanism for protein folding and theorical predictions for hydrogen-exchange labeling experiments. **Biopolymers. 35:** 137-140.

♣ TIMASHEFF, S.N. (1993) - The Control Of Protein Stability And Association By Weak Interactions With Water: How Do Solvents Affect These Processes? **Annu. Rev. Biophys. Biological Struct. 22:**67-(1997).

♣ TOUMADJE, A., ALCORN, S. W. e JOHNSON, W. C., Jr. (1992). **Anal, Biochem. 200:** 321.

- VAN DAMME, E. J. M., GOLDSTEIN, I. J. e PEUMANS, W. J. (1991) - Comparative study of related mannose-binding lectins from *Amaryllidaceae* e *Alliaceae* species. **Phytochemistry 30:** 504-514

- VENYAMINOV, S. Y., e VASSILENKO, K. S.(1994) - Determination of protein tertiary structure class from Circular Dichroism Spectra. **Anal. Biochem. 222:** 176-184.

- VIGUERA, A. R., SERRANO, L., e WILMANNS, M. (1996) - Different folding transition-states may result in the same native structure. Nat. Struct. Biol. 3: 874-880.

- VOET, D.; VOET, J. G. (1995) - **Biochemistry**. Jhon Wiley & Sons, Inc. Canadá

- WANG,Z. X. (1996) - How Many Folds Are There In Nature?. **Proteins: structure, function and genetics. 26:**186-191.

- YANG, J. T., WU, C. -S. C., e MARTINEZ, H. M. (1986) - Calculation of protein conformation from Circular Dichroism. **Methods Enzymol. 30:**208-269.

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO