UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

PATRICIA SUEMY KUMAGAI

Interações moleculares no mecanismo de ação da
galectina-4 humana

São Carlos

2016

PATRICIA SUEMY KUMAGAI

Interações moleculares no mecanismo de ação da
galectina-4 humana

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada

Opção: Física Biomolecular

Orientador: Prof. Dr. Antonio José da Costa Filho

Versão Original

São Carlos

2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica revisada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Kunagai, Patricia Sueny
Interações moleculares no mecanismo de ação da
galectina-4 humana / Patricia Sueny Kunagai;
orientador Antonio José Costa-Filho -- São Carlos,
2016.

177 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em
Física Biomolecular) -- Instituto de Física de São
Carlos, Universidade de São Paulo, 2016.

1. Galectina-4 humana. 2. Carboidratos. 3.
Interações. 4. Espectroscopia. 5. Calorimetria. I.
Costa-Filho, Antonio José, orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Patricia Suemy Kumagai

Tese apresentada ao Instituto de Física
de São Carlos da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Doutora em Ciências. Área de
Concentração: Física Aplicada - Opção:
Física Biomolecular.

Aprovado(a) em: 23/03/2016

Comissão Julgadora

Dr(a). Antônio José da Costa Filho

Instituição: (FFCLRP/USP)

Dr(a). Pietro Ciancaglini

Instituição: (FFCLRP/USP)

Dr(a). Ana Paula Valente

Instituição: (UFRJ/Rio de Janeiro)

Dr(a). Paulo Mascarello Bisch

Instituição: (UFRJ/Rio de Janeiro)

Dr(a). Richard John Ward

Instituição: (FFCLRP/USP)

Eu dedico este trabalho
à toda minha família

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Antonio José da Costa Filho. Cearense, obrigada pela oportunidade, ensinamentos e confiança. Por me dar liberdade para criar e realizar meu trabalho e, assim, errar e aprender com meus passos. Obrigada pelo incentivo e o cuidado com qual sempre teve comigo. Obrigada pelos ensinamentos, não só científicos, mas principalmente as lições de vida. Obrigada também pelas inúmeras cervejas que, com certeza, foram essenciais. Enfim, não me canso em dizer: Obrigada, Cearense!

Ao meu orientador no exterior Prof. Dr. Anthony Watts (University of Oxford) pela oportunidade de se trabalhar em um centro científico de referência mundial, com certeza, foi um sonho realizado! Pelo cuidado e carinho com o qual me recebeu em seu grupo e, principalmente, pela confiança depositada em mim e ao meu trabalho. Agradeço também todos os membros do grupo Watts, principalmente à Dra. Patricia Dijkman pela paciência e competência com a qual me orientou.

Ao Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi pelas reuniões, ligações, discussões e conversas “intermináveis”, sempre muito amistosas, que foram de primordial importância para este trabalho, mesmo num período delicado de sua vida. Por sempre me incentivar e me animar com o projeto quando nem eu mesma acreditava. Aos membros de seu grupo, em especial a Dra. Thalita Riul e Dr. Elder Latorraca pelo auxílio nos experimentos com as células. Aos técnicos Rubinho e Fran e ao pessoal do biotério no auxílio na imunização do coelho (Sushi) para a produção de anticorpos.

Aos técnicos Bel, Andressa e Fernando por manterem a ordem no laboratório e, assim, facilitando nosso dia-a-dia na bancada. Pela extrema competência e prontidão para nos ajudar com os nossos problemas.

Aos amigos e colegas do grupo de Biofísica e do IFSC em especial à Amanda, Ana Eliza, Val, Sabrina, Militar e aos amigos que já não fazem mais parte desse grupo, mas que foram muito importantes para mim: Joci, Zé Luis e Fábio. Todos, excelentes profissionais e, o mais importante, excelentes pessoas com quem eu tive a honra de conviver e aprender todos esses anos, seja na bancada ou fazendo experimentos, no café pós-almoço ou na mesa de bar.

Aos amigos e colegas do grupo Laboratório de Biofísica Molecular-LBM de Ribeirão Preto, em especial ao Assuero, Felipe e Mariana por sempre me “abrigarem” nas estadias em Ribeirão e por todas as conversas sempre regadas à muita cerveja.

Às minhas amigas de todos momentos Ana Júlia, Brunna e Fernanda por sempre estarem por perto, muitas vezes só do coração. Amigas por toda a vida!

Aos meus tios e tias, Nelson e Ione e Edson e Se, que sempre me deram suporte, principalmente emocional, na ausência dos meus pais. Por me guiarem e cuidarem de mim e por entenderem as minhas “ausências”. Por me amarem como filha e nunca se esquecerem de mim.

Aos meus pais, Hélio e Áurea, e minha irmã Fernanda pelo amor e apoio incondicional, mesmo à distância.

Ao Helton, pelo carinho, paciência (muita paciência!), compreensão e incentivo, principalmente nos últimos anos de doutorado.

Ao Instituto de Física de São Carlos e ao corpo docente e funcionários desta.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de doutorado direto e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

“Tu te tornas eternamente responsável
por aquilo que cativas”

O Pequeno Príncipe - Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

KUMAGAI, P.S. **Interações moleculares no mecanismo de ação da galectina-4 humana.** 2016. 177 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

A galectina-4 humana (HGal-4), pertencente à família das galectinas, possui dois domínios de reconhecimento de carboidratos (CRDs) com alta afinidade para β -galactosídeos e se encontra amplamente distribuída em células normais e neoplásicas de diferentes organismos. Suas funções englobam uma grande variedade de eventos celulares, tais como processos inflamatórios, neoplásicos, progressão tumoral e metástase. Entretanto, muitas perguntas sobre suas interações com diferentes carboidratos, a especificidade destas interações e o papel específico das galectinas permanecem ainda sem resposta. No presente trabalho, propomos a investigação das interações galectina-glicano da galectina-4 humana e de seus domínios CRDs independentes (CRD-I e CRD-II) através de um conjunto de métodos biofísicos. Através do método de dicroísmo circular (CD), usando várias regiões espectrais, e fluorescência fomos capazes de entender mudanças ocorrentes na estrutura secundária e terciária das proteínas quando da interação com lactose/sacarose. Estes dados, juntamente com testes de hemaglutinação, mostraram que a galectina-4 e os CRDs respondem de forma distinta à ligação com açúcar. Por diferentes técnicas (fluorescência, ITC e MST) determinamos as constantes de dissociação para os domínios CRDs ($K_d \sim 0,5$ mM) e para HGal-4 e, de forma qualitativa, os valores obtidos indicaram possíveis estados oligoméricos dessas proteínas. A investigação da interação proteína-membrana da HGal-4 foi feita, primeiramente, com miméticos de membranas e monitorada pela técnica de RPE em crescente complexidade de composição de tais miméticos, indo desde composições mais simples, passando por *lipid rafts* na presença de diferentes glicolipídeos (GM1, LPS) e chegando-se à interação com células tumorais (U87MG, T98G e HT-29). Tais experimentos mostraram que galectina-4 reconhece e se liga naqueles modelos onde existem glicanos complexos na superfície. Investigamos também a participação de HGal-4 endógena e exógena no tratamento quimioterápico de células tumorais e verificamos um papel importante de HGal-4 para células HT-29. Finalizando esta tese, apresentamos o trabalho realizado em um ano de estágio na *University of Oxford*, durante o qual, investigamos a estrutura da região C-terminal de um receptor da família GPCR, qual seja o receptor de neurotensina NTS1. Aqui, mais uma vez,

foi empregada a técnica de RPE que aliada à produção/marcação de mutantes do receptor, permitiu determinar que a hélice H8 se estabiliza quando em proteolipossomos.

Palavras-chave: Galectina-4 humana. Carboidratos. Interações. Espectroscopia. Calorimetria.

ABSTRACT

KUMAGAI, P.S. **Molecular interactions on mechanism action of human galectin-4**. 2016. 177 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

Human galectin-4 (HGal-4), a member of the galectin family, contains two carbohydrate recognition domains (CRDs) with high affinity for β -galactosides and is widely distributed in normal and neoplastic cells of different organisms. Its functions include a wide variety of cellular events such as inflammation, cancer, cell adhesion, tumor progression and metastasis. However, many questions about their interactions with different carbohydrates, the specificity of these interactions and the specific role of galectins remain unanswered. In this study, we propose the investigation of galectin-glycan interactions of human galectin-4 and its independent CRDs (CRD-I and-II) through a combination of biophysical methods. From circular dichroism (CD), measured in different spectral ranges, and fluorescence experiments we were able to understand changes in secondary and tertiary structure of the protein while interacting with lactose/sucrose. These results along with hemagglutination assays showed that galectin-4 and its CRDs respond differently to sugar binding. From fluorescence, ITC and MST measurements we determined the dissociation constants for the CRDs ($K_d \sim 0.5$ mM) and for HGal-4. These values qualitatively indicated the formation of potential oligomers of CRDs and of HGal-4. The investigation of the HGal-4 interaction with membranes was firstly performed using mimetic membranes and monitored by EPR spectroscopy. The composition of the mimetic membranes was gradually increased so that to span simple compositions (such as DMPC), passing by lipid rafts in the presence of different glycolipids (GM1, LPS) up to interactions with tumor cells (U87MG, T98G e HT-29). These experiments showed that galectin-4 recognizes and binds to membrane models constituted by complex glycans on their surface. We also investigated the involvement of endogenous and exogenous HGal-4 in chemotherapies of tumor cells and found an important role of HGal-4 in the case of HT-29 cells. At last, we presented the work done in an one-year internship at the *University of Oxford*, during which we investigated the C-terminal region of the GPCR family receptor, the neurotensin receptor NTS1. Here, we used once again the EPR technique combined with the

production/spin-labelling of mutants of the receptors, and determined that helix H8 was stabilized upon receptor reconstitution in proteoliposomes.

Keywords: Human galectin-4. Carbohydrates. Interactions. Spectroscopy. Calorimetry.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Estrutura de alguns sacarídeos.** Monossacarídeos: D-galactose, D-glicose e D-frutose. Dissacarídeos: lactose e sacarose. 34
- Figura 2 – Representação esquemática das estruturas dos três grupos de galectinas: proto, quimera e *tandem-repeat*.**..... 39
- Figura 3 - Representação esquemática dos diferentes tipos de rede que podem ser, hipoteticamente, formados entre galectinas e glicanos multivalentes.** São mostrados exemplos de ligantes bi, tri e tetravalentes..... 40
- Figura 4 - Estrutura tridimensional da galectina-1 humana (PDB 1GZW).** (a) A estrutura da Gal-1 é apresentada como um exemplo da estrutura conservada da família das galectinas. As cinco fitas- β F (F1-F5) e as seis fitas- β S (S1-S6a/S6b) são indicados pela respectiva letra-número nas fitas- β . (b) Representação topológica do domínio CRD de HGal-1 gerado pelo servidor online PDBsum (<https://www.ebi.ac.uk/pdbsum/>). 41
- Figura 5 – Alinhamento sequencial dos domínios CRD-I e CRD-II da galectina-4 humana.** O alinhamento mostra os sete resíduos pertencentes ao sítio de ligação, o resíduo de arginina 89 sofre uma mutação conservativa no domínio CRD-II por uma lisina (rosa). 42
- Figura 6 - Estrutura tridimensional dos domínios: a) CRD-I (PDB ID 4XZP) e b) CRD-II (não publicado).** As cinco fitas- β F (F1-F5) e as seis fitas- β S (S1-S6) são indicados pela respectiva letra-número nas folhas- β 43
- Figura 7 – Representação pictórica de atividade hemaglutinante de galectinas.** Quando a galectina exibe atividade, ou seja, há formação de rede, observa-se que o poço fica difuso. Ao passo que, quando não há hemaglutinação, configura-se um “botão” no fundo do poço. 50
- Figura 8 - Perfil de purificação do domínio CRD-I.** (a) Análise por eletroforese em gel SDS-PAGE 15% da purificação do CRD-I: (1) eluição da proteína com 300 mM de imidazol por cromatografia de afinidade em coluna de Ni-NTA; (2) frações 12 e 13 da cromatografia de exclusão molecular. (b) Perfil cromatográfico da etapa de exclusão molecular em coluna Superdex75. 54
- Figura 9 - Perfil de purificação do domínio CRD-II.** (a) Análise por eletroforese em gel SDS-PAGE 15% da purificação do CRD-I: (1) eluição da proteína com 300

mM de imidazol por cromatografia de afinidade em coluna de Ni-NTA; (2) frações 13 e 14 da cromatografia de exclusão molecular. (b) Perfil cromatográfico da etapa de exclusão molecular em coluna Superdex75.....55

Figura 10 - Perfil de purificação da HGal-4. (a) Análise por eletroforese em gel SDS-PAGE 15% da purificação da HGal-4: (1) eluição da proteína com 100 mM de lactose por cromatografia de afinidade em coluna de α -Lactose-Agarose; (2) frações 11 e 12 da cromatografia de exclusão molecular. (b) Perfil cromatográfico da etapa de exclusão molecular em coluna Superdex75.....56

Figura 11 - Testes de hemaglutinação em diferentes concentrações de proteínas. Verifica-se que CRD-I não possui atividade hemaglutinante, enquanto que CRD-II hemaglutina nas concentrações entre 5 e 10 μ M com uma dependência de concentração. A HGal-4 exibe atividade aglutinante entre as concentrações de 0,31 e 10 μ M.....58

Figura 12 - Teste de hemaglutinação com concentração de proteína constante a 10 μ M e com titulação de lactose ou sacarose. (a) Titulação com sacarose. A hemaglutinação ocorreu em todas as concentrações de sacarose para as três proteínas; (b) Titulação com lactose. A atividade hemaglutinante de CRD-II e HGal-4 foi inibida nas concentrações de 50 e 100 mM de lactose e o CRD-I exibe atividade na presença de baixa concentração de lactose.60

Figura 13 - Espectros de CD convencional na região do UV distante obtidos para CRD-I (—), CRD-II (—) e HGal-4 (—) a 20°C. Espectros característicos de proteínas majoritariamente compostas por folhas- β : largo pico negativo em torno de 216 nm e um pico positivo em torno de 200 nm.....61

Figura 14 - Espectros de SRCD de proteínas ricas em estrutura α -hélice e folha- β do banco de dados de CD SP175. Os espectros de SRCD mostrados são provenientes de proteínas contendo (a) ~50% α -hélices, onde os espectros são bem similares uns aos outros enquanto, (b) proteínas contendo ~50% folha- β , com baixo teor helicoidal, apresenta espectros variados.62

Figura 15 - Espectros de SRCD obtidos para CRD-I (—), CRD-II (—) e HGal-4 (—) a 20°C. A área em cinza destaca a região abaixo de 200 nm, onde estão as principais diferenças entre as estruturas secundárias das proteínas em estudo.....64

Figura 16 – Análise da diferença dos espectros de SRCD da HGal-4 e dos domínios CRDs. Espectro de SRCD da HGal-4 (—), soma teórica dos espectros dos

domínios CRDs (—) e a subtração dos espectros de HGal-4 e a soma dos espectros dos domínios CRDs (—).	65
Figura 17 – Espectros de SRCD experimental e teórico calculados pelo <i>BeStSel</i>: para CRD-I (—), CRD-II (—) e HGal-4 (—).	67
Figura 18 - Espectros de SRCD das proteínas (a) CRD-I. (b) CRD-II e (c) HGal-4 na conformação apo (—), na presença de lactose (—) e na presença de sacarose (—).	69
Figura 19 – Estrutura tridimensional dos domínios CRDs com os resíduos de triptofanos em destaque. São mostrados os resíduos (a) Trp71 e 84 no domínio CRD-I e (b) Trp256 no CRD-II.	72
Figura 20 - Espectros de Fluorescência intrínseca das proteínas (a) CRD-I, (b) CRD-II e (c) HGal-4 com titulação de sacarose (colunas da esquerda) e lactose (colunas da direita).	73
Figura 21 - Gráficos da variação do centro de massa espectral <i>versus</i> concentração de lactose das proteínas: (a) CRD-I, (b) CRD-II e (c) HGal-4.	75
Figura 22 - Espectro de CD na região do UV-próximo da proteína dehidroquinase tipo II. O gráfico mostra os picos característicos correspondentes aos resíduos aromáticos de Phe, Tyr e Trp.	76
Figura 23 - Espectros de CD UV-próximo das proteínas (a) CRD-I. (b) CRD-II e (c) HGal-4 na conformação apo (—), na presença de lactose (—) e na presença de sacarose (—).	78
Figura 24 - Curvas de ITC de titulação com lactose das proteínas (a) CRD-I, (b) CRD-II e (c) HGal-4.	82
Figura 25 – Modelo de homodimerização de galectinas. (a) Homodímero da galectina-1 humana (PDB ID 1GZW); (b) Modelo de oligomerização dos domínios CRDs e HGal-4 construído com base nos resultados apresentados no presente trabalho.	83
Figura 26 – Curvas de ligação por MST da proteína galectina-4 humana. Concentração da HGal-4 constante a 200 nM e titulação com: (a) lactose e (b) N-Acetil-Lactosamina.	85
Figura 27 – Curva de desnaturação térmica por CD convencional (216 nm) das proteínas (a) CRD-I. (b) CRD-II e (c) HGal-4 na conformação apo (—), na presença de lactose (—) e na presença de sacarose (—).	87

- Figura 28 - Análise PCA dos espectros de SRCD das proteínas (a) CRD-I. (b) CRD-II e (c) HGal-4.** Coluna da esquerda: gráficos em 3D e curvas de nível dos espectros do desenovelamento térmico; Coluna da direita: transição térmica analisada por PCA.....91
- Figura 29 - Espectros de RPE de modelos de membrana miméticos de *lipid rafts* na composição POPC/SM/Chol (50:30:20) contendo fosfolipídios marcados 5-PC na ausência (—) e na presença da proteína HGal-4 (—). A razão proteína:lipídeo utilizada foi de 1:50 e os espectros coletados a 20°C.....94**
- Figura 30 – Espectros de RPE de modelos de membrana miméticos de *lipid rafts* contendo o fosfolipídio marcado 5-PC na ausência (—) e na presença da proteína HGal-4 (—) nas composições: a) POPC/Chol/GM1 (1:1:1); b) POPC/SM/Chol/GM1 (50:20:20:10); c) POPC/SM/Chol/GM1 (50:27:20:3). A razão proteína:lipídeo utilizada foi de 1:50 e os espectros foram coletados à 20°C.95**
- Figura 31 - Espectros de RPE de modelos de membrana miméticos de *lipid rafts* contendo o fosfolipídio marcado 5-PC ausência (—) e na presença da proteína HGal-4 (—) nas composições POPC/SM/Chol/x (50:27:20:3), onde x equivale aos esfingolipídeos: a) SulfBrain e b) SulfGalCer. A razão proteína:lipídeo utilizada foi de 1:50 e os espectros foram coletados à 20°C.96**
- Figura 32 - Espectros de RPE da HGal-4 marcada com o marcador de spin MTSSL na ausência e na presença de miméticos de modelos de membrana nas composições: DMPC; DMPC/LacPE 5%. A razão proteína:lipídeo utilizada foi de 1:50 e os espectros foram coletados à 20°C.98**
- Figura 33 - Espectros de RPE da HGal-4 marcada com o marcador de spin MTSL na ausência e na presença de miméticos de modelos de membrana nas composições: POPA; POPA/DOPC; POPA/DOPC/LacPE 5%. A razão proteína:lipídeo utilizada foi de 1:50 e os espectros foram coletados à 20°C.99**
- Figura 34 - Espectros de RPE da HGal-4 marcada com MTSL em solução e na presença de modelos de membrana miméticos de *lipid rafts*. As composições utilizadas foram POPC/SM/Chol/x (50:27:20:3), onde x equivale aos glicosfingolipídeos: GM1, SulfBrain e SulfGalCer. A razão proteína:lipídeo utilizada foi de 1:50 e os espectros foram coletados à 20°C.101**
- Figura 35 - Representação esquemática da estrutura de um LPS.** Os LPS são formados por três componentes: Lipídeo A, *core* e antígeno-O (*n* pode variar de 4 a 40)..102

Figura 36 - Esquema das estruturas dos LPS1, 2, 3 e 4. Cada LPS se diferencia pela cadeia antígeno-O.	103
Figura 37 - Espectros de RPE das proteínas (a) HGal-4 e (b) HGal-1, apo e na presença de miméticos de membrana miméticos de <i>lipid rafts</i>. As composições utilizadas foram POPC/SM/Chol/LPS (50:27:20:3), com os 4 tipos diferentes de LPS mostrados. A razão proteína:lipídeo utilizada foi de 1:50 e os espectros foram coletados à 20°C.	106
Figura 38 – Análise da imunoreatividade do anticorpo anti-HGal-4 para outras galectinas humanas por <i>Western blot</i>. Amostras nas colunas: (1) HGal-1; (2) HGal-3; (3) HGal-4; (4) CRD-I da HGal-4; (5) CRD-II da HGal-4; (6) HGal-12, proteínas a uma quantidade de 250 ng. (Amostras cedidas pelo grupo do Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi).	125
Figura 39 - Imunodeteção de HGal-4 em diferentes linhagens celulares por <i>Western blot</i>. Amostras nas colunas: (1) T98G, (2) U251, (3) U87MG, (4) HGal-4 e (5) HT-29 testadas para imunoreatividade com anticorpo anti-HGal-4.	126
Figura 40 – Interação galectina-4 humana marcada com FITC (HGal-4-FITC) com as linhagens celulares U87MG (□), T98G (▣) e HT-29 (■) na ausência ou presença de 100 mM de lactose ou sacarose nas concentrações de proteína de 0,2, 1 e 5 mM.	128
Figura 41 - Avaliação da viabilidade das linhagens celulares U87MG (□), T98G (▣) e HT-29 (■) frente ao tratamento de cisplatina em diferentes concentrações por citometria de fluxo. As células positivas para a marcação de AnexinaV+/PI+ são consideradas mortas/apoptóticas. As células foram tratadas por 72h com cisplatina e células sem tratamento foram consideradas como controle de viabilidade (CV).	129
Figura 42 - Imunodeteção de HGal-4 e α-tubulina em diferentes linhagens celulares frente ao tratamento de cisplatina em concentrações diferentes. Amostras nas colunas de (1-4) células HT-29: (1) sem tratamento, tratamento com cisplatina a (2) 37,5 μ M; (3) 75 μ M e (4) 150 μ M; Amostras nas colunas de (5-8) células T98G: (5) sem tratamento, tratamento com cisplatina a (6) 37,5 μ M; (7) 75 μ M e (8) 150 μ M. Ao centro, a galectina-4 funcionando como controle positivo.	130
Figura 43 – Avaliação da viabilidade das linhagens celulares U87MG (□), T98G (▣) e HT-29 (■) frente ao tratamento com cisplatina e galectina-4 por ensaios	

de MTT. As células foram tratadas com 75 μ M de cisplatina e/ou galectina-4 nas concentrações de 0,2, 1 e 5 μ M, por 72 horas.131

Figura 44 - Avaliação da viabilidade das linhagens celulares T98G (□) e HT-29 (■) frente ao tratamento de cisplatina (75 μ M) na presença de diferentes concentrações de galectina-4 humana (0,2, 1 e 5 μ M). As células positivas para a marcação de AnexinaV+/PI+ são consideradas mortas/apoptóticas. As células foram tratadas por 72h com cisplatina e células sem tratamento foram consideradas como controle de viabilidade (CV). Os valores de p indicam valores comparáveis, sendo que * indica $p < 0,05$, ** indica $p < 0,01$ e *** indica $p < 0,001$133

Figura 45 – Modelo de estrutura das proteínas GPCR. (a) esquema bidimensional mostrando as sete α -hélices transmembranas conectadas por loops imersos em membrana; (b) Estrutura tridimensional da rodopsina bovina (PDB ID 1F88), em destaque a hélice 8.141

Figura 46 - Estruturas cristalográficas do receptor NTS-1 na forma ativada: (a) PDB ID 4GRV (b) PDB ID 3ZEV.143

Figura 47 – Esquema da proteína de fusão usada para a expressão do receptor NTS1 funcional em *E. coli*. A NTS1B consiste em MBP truncado ligado ao N-terminal e um *tag* deca-His, no C-terminal. E ainda, sítio de clivagem Tev entre MBP e NTS1 e NTS1 e Tdx para a remoção proteolítica dos parceiros de fusão.145

Figura 48 - Representação do receptor NTS1 em membrana. Em vermelho são mostrados os resíduos de cisteína nativa mutados por Ala ou Ser e em azul claro, os resíduos mutados subsequentemente por cisteínas uma-a-uma.146

Figura 49 - Análise por eletroforese em gel SDS-PAGE 15% da purificação do mutante A374C-NTS1. A seta indica a massa aparente do mutante ~44 kDa.151

Figura 50 - Espectros de CW-RPE dos mutantes da hélice 8 do receptor NTS1. 153

Figura 51 - Análise da periodicidade da hélice 8 por CW-RPE. O parâmetro $\Delta H0 - 1$ foi determinado através dos espectros de cw-RPE coletados a 277 K, e plotados em função do número residual.154

Figura 52 – Sequência e número dos resíduos de aminoácidos que seguiram a mutação sítio-dirigida para a subsequente análise de formação da hélice 8. 154

Figura 53 – Painel completo dos vinte mutantes para análise da periodicidade da hélice 8 por CW-RPE. O parâmetro $\Delta H0 - 1$ foi determinado através dos

espectros de CW-RPE coletados a 277 K, e plotados em função do número residual. Em preto, mutantes do receptor NTS1 na conformação apo e, em vermelho, na presença do agonista NT. Em ambas as condições, observamos uma função senoidal, que se estende do resíduo 374 a 385, com periodicidade $\sim 3,6$ 155

Figura 54 - Espectros de CW-RPE de cada um dos mutados referente a região de 374 a 387 no C-terminal. Na conformação apo (—) e na presença do agonista NT (—). 157

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação da família de lectinas.....	37
Tabela 2 - Estrutura e distribuição tecidual das galectinas.....	39
Tabela 3 - Determinação experimental de composição de estrutura secundária dos domínios CRD e HGal-4. Desconvolução dos espectros de SRCD utilizando a ferramenta <i>DichroWeb</i> ⁸⁷	66
Tabela 4 - Determinação experimental de composição de estrutura secundária dos domínios CRD e HGal-4. Desconvolução dos espectros de SRCD utilizando a ferramenta <i>BeStSel</i> ⁷⁷	67
Tabela 5 - Determinação experimental de composição de estrutura secundária dos domínios CRDs e HGal-4 na ausência e presença de lactose e sacarose. Desconvolução dos espectros de SRCD utilizando a ferramenta <i>BeStSel</i> ⁷⁷	71
Tabela 6 - Temperaturas de transição (T_m , °C) dos CRDs e HGal-4 na conformação apo e na presença de lactose ou sacarose, e variação da temperatura de transição (ΔT_m) entre a conformação apo e na presença de lactose. O * nos valores de T_m do CRD-II indicam maiores erros associados à determinação destes.....	87
Tabela 7 - Parâmetros termodinâmicos obtidos a partir do tratamento das curvas de desnaturação dos domínios CRD-I e CRD-II e da HGal-4 (* indica que o alto erro associado, ** indica que não foi possível obter esses valores).	89
Tabela 8 - Glicosíngolipídeos utilizados nas diferentes composições de modelos de membrana. Representação das estruturas químicas das espécies predominantes, no caso dos glicosíngolipídeos naturais.	93
Tabela 9 – Lista dos LPS utilizados. A tabela mostra a fonte dos LPS de diferentes linhagens de <i>E. coli</i> e sua função relacionada a lise da membrana causada pelas galectinas-1 e/ou -4.....	103
Tabela 10 - Os 11 mutantes da hélice H8 da proteína NTS1: cada um dos mutantes foi nomeado com a letra do resíduo nativo, posição sequencial e a letra C correspondendo à mutação por cisteína.	147

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-ME	β -mercaptoetanol
BPL	<i>Brain polar lipid</i>
CD	<i>Circular Dichroism</i>
Chol	Colesterol
CM	Centro de massa
CRD	<i>Carbohydrate Recognition Domain</i>
CV	viabilidade celular
CW	<i>continuous wave</i>
DMPC	1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina
DO	Densidade óptica
DOPC	1,2-di oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina
f _D	fração desnaturada
FITC	isotiocianato de fluoresceína
GBP	<i>glycan binding protein</i>
GM ₁	Gangliosídeo GM1
GPCR	<i>G-protein coupled receptor</i>
H8	Hélice 8
HGal	Galectina humana
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
IR	infravermelho
ITC	<i>Isothermal Titration Calorimetry</i>
K _a	Constante de associação
K _d	Constante de dissociação
Lac	Lactose
LacNAc	N-Acetil-D-Lactosamina
Lac-PE	1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-lactosil
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
LPS	Lipopolisacarídeo
LUV	<i>Large unilamellar vesicles</i>
MLV	<i>Multilamellar vesicles</i>
MW	<i>Molecular weight</i>

MST	<i>Microscale Thermophoresis</i>
MTSSL	S-(1-oxyl-2,2,5,5-tetramethyl-2,5-dihydro-1H-pyrrol-3-yl)methyl methanesulfonylthioate
MTT	<i>3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide</i>
Ni-NTA	Resina de níquel e ácido nitrilotriacético
NT	neurotensina
NTS1	receptor de neurotensina-1
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PC	fosfatidilcolina
PCA	<i>Principal component analyse</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PE	fosfoetanolamina
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonila
POPA	1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfato
POPC	1-Palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RIPA	<i>Radio Immunoprecipitation Assay</i>
RPE	Ressonância Paramagnética Eletrônica
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDSL	<i>Site directed spin labelling</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SM	Esfingomielina
Suc	sacarose
SulfBrain	cerebrosídeo sulfatado
SulfGalCer	3-Sulfo-C24:1 GalCer
SRCD	<i>Synchrotron Radiation Circular Dichroism</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
T _m	Temperatura de transição
TM	transmembrana
U	Unidades
UA	Unidade arbitrária
UV	Ultra-violeta

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	31
1.1 INTRODUÇÃO.....	33
1.1.1 GLICÔMICA E GLICOPROTEOMA: GLICANOS E GLICOCONJUGADOS	34
1.1.2 LECTINAS	36
1.1.3 GALECTINAS	37
1.1.4 GALECTINA-4 HUMANA.....	42
1.2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA	46
1.3 MATERIAIS E MÉTODOS	47
1.3.1 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DOS DOMÍNIOS CRDS.....	47
1.3.2 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA GALECTINA-4 HUMANA	48
1.3.3 ANÁLISE DA ATIVIDADE LECTÍNICA POR ENSAIO DE HEMAGLUTINAÇÃO	50
1.3.4 ESTUDO DE ESTRUTURA-FUNÇÃO DA INTERAÇÃO PROTEÍNA-LIGANTE	51
1.3.5 TERMODINÂMICA DE INTERAÇÃO PROTEÍNA-LIGANTE	52
1.3.6 INTERAÇÃO PROTEÍNA E MODELOS DE MEMBRANA.....	53
1.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	54
1.4.1 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DOS DOMÍNIOS CRDS.....	54
1.4.2 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA GALECTINA-4 HUMANA	56
1.4.3 ANÁLISE DA ATIVIDADE LECTÍNICA POR ENSAIO DE HEMAGLUTINAÇÃO	57
1.4.4 INTERAÇÃO PROTEÍNA-LIGANTE: DISSECANDO MUDANÇAS CONFORMACIONAIS	61
1.4.4.1 AVALIAÇÃO DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA.....	61
1.4.4.2 AVALIAÇÃO DA ESTRUTURA TERCIÁRIA	71
1.4.5 TERMODINÂMICA DE INTERAÇÃO PROTEÍNA-LIGANTE	80
1.4.6 ESTABILIDADE TÉRMICA DAS PROTEÍNAS	85
1.4.7 INTERAÇÃO PROTEÍNA E MODELOS DE MEMBRANA.....	92
1.5 CONCLUSÕES	107
CAPÍTULO 2.....	115
2.1 INTRODUÇÃO	117
2.2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA.....	119
2.3 MATERIAIS E MÉTODOS	120

2.3.1 ANIMAL.....	120
2.3.2 PRODUÇÃO DE IMUNOGLOBULINA POLICLONAL DE COELHO ANTI-GALECTINA-4 HUMANA.....	120
2.3.2.1 IMUNIZAÇÃO DE ANIMAL E OBTENÇÃO DO SORO DE COELHO	120
2.3.2.2 PURIFICAÇÃO DAS IMUNOGLOBULINAS ANTI-HGAL-4 DO SORO DE COELHO	121
2.3.3 OBTENÇÃO E CULTURA DE CÉLULAS	122
2.3.4 WESTERN-BLOTTING	122
2.3.5 AVALIAÇÃO DA LIGAÇÃO DE GALECTINA-4 NA SUPERFÍCIE DE CÉLULAS TUMORAIS POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	123
2.3.6 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DA GALECTINA-4 NA MORTE DE LINHAGENS TUMORAIS INDUZIDAS POR CISPLATINA	123
2.3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	124
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	125
2.4.1 PRODUÇÃO DE IMUNOGLOBULINA POLICLONAL ANTI-GALECTINA-4 HUMANA.....	125
2.4.2 IMUNODETECÇÃO DE GALECTINA-4 EM DIFERENTES LINHAGENS CELULARES TUMORAIS	126
2.4.3 INTERAÇÃO DA GALECTINA-4 NA SUPERFÍCIE CELULAR DE DIFERENTES LINHAGENS CELULARES.....	126
2.4.4 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DAS DIFERENTES CÉLULAS TUMORAIS FRENTE AO TRATAMENTO COM CISPLATINA	128
2.4.5 EFEITO DA GALECTINA-4 HUMANA NA VIABILIDADE DAS CÉLULAS TUMORAIS FRENTE AO TRATAMENTO COM CISPLATINA	129
2.5 CONCLUSÕES.....	134
CAPÍTULO 3	137
3.1 INTRODUÇÃO.....	139
3.1.1 PROTEÍNAS DE MEMBRANA	139
3.1.2 RECEPTOR NEUROTENSINA 1 (NTS1).....	140
3.2 OBJETIVO E JUSTIFICATIVA	144
3.3 MATERIAS E MÉTODOS.....	145
3.3.1 MUTANTES DA HÉLICE 8 DO RECEPTOR DE NEUROTENSINA 1 (NTS1-H8)	145
3.3.2 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DOS MUTANTES H8-NTS1.....	147
3.3.3 MARCAÇÃO DE SPIN DOS MUTANTES H8-NTS1.....	149

3.3.4 RECONSTITUIÇÃO EM LIPÍDEOS DOS MUTANTES H8-NTS1	149
3.3.5 “SCAN DE NITRÓXIDOS” POR ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA (RPE).....	150
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	151
3.4.1 EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO, MARCAÇÃO DE SPIN E RECONSTITUIÇÃO DOS MUTANTES H8-NTS1.....	151
3.4.2 “SCAN DE NITRÓXIDO” POR RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA DE ONDA CONTÍNUA (CW-RPE)	152
3.5 CONCLUSÕES	158
REFERÊNCIAS	161
APÊNDICE A	177

Capítulo 1

Dissecando as interações proteína-ligante da
galectina-4 humana e seus domínios CRDs

1.1 INTRODUÇÃO

As células de todos os organismos vivos são compostas por quatro macromoléculas essenciais para a vida: ácidos nucleicos, proteínas, lipídios e glicanos.¹ Assim como a genômica e a proteômica são as áreas da ciência focadas nos estudos de ácidos nucleicos e proteínas, respectivamente, a glicômica tem como foco glicanos e gliconconjugados.

Após as chamadas eras da genômica e da proteômica, a glicômica tem ganhado muito atenção, pois foi constatado que glicanos são moléculas determinantes no reconhecimento em diversos processos celulares.² A glicômica tem como foco o entendimento da biossíntese e a determinação estrutural e funcional de glicanos envolvidos em sistemas biológicos.³ No entanto, diferentemente da genômica e da proteômica, os objetos de estudo da glicômica não estão baseados na codificação pelo DNA e sim pela codificação de glicanos: o glicocódigo. O glicocódigo é muito mais complexo, variado e de difícil análise quando comparado a proteínas ou ácidos nucleicos.

Em eucariotos, os glicanos e glicoconjugados estão presentes principalmente na superfície celular, proeminentes e de fácil acesso.⁴ Esta posição na interface entre os meios extra e intracelular tem progressivamente envolvido os glicanos em algumas patologias e doenças, como câncer e inflamações⁵⁻⁷, aumentando, assim, o interesse pelo estudo de glicanos para além dos aspectos científicos mais básicos, o que torna projetos de amplo escopo cada vez mais necessários.

Muitos dos processos biológicos que contam com a participação de glicanos envolvem seu reconhecimento direto por proteínas que ligam glicanos (GBPs, *glycan binding proteins*). Tal interação de GBPs com glicanos pode promover adesão celular, sinalização celular, enovelamento de glicoproteínas, dentre outros.³ Desta forma, vários estudos têm mostrado que os glicanos contribuem de forma geral e/ou específica em quase todos os processos biológicos regulatórios.³ Assim, anormalidades na sua síntese ou disfunções relacionadas a glicanos e glicoconjugados podem levar a uma série de diferentes doenças e desordens.

1.1.1 Glicômica e glicoproteoma: glicanos e glicoconjugados

Os carboidratos (ou sacarídeos) são biomoléculas compostas basicamente por átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio, definida pela fórmula empírica $C_m(H_2O)_n$, alguns podendo conter, ainda, nitrogênio, fósforo ou enxofre. O mais simples desses compostos carbônicos são os monossacarídeos.⁸ Os monossacarídeos, ou açúcares simples, são, predominantemente, polihidroxi aldeídos ou cetonas cíclicas, que possuem um ou mais átomos de carbono assimétricos (exceto pelas dihidroxiacetonas) e, portanto, apresentam isoformas opticamente ativas (moléculas quirais). Os monossacarídeos mais abundantes encontrados na natureza são aqueles compostos por seis carbonos em estrutura cíclica, sendo alguns exemplos de D-aldoses, a D-galactose e D-glicose, e D-frutose sendo uma D-cetose⁸ (**Figura 1**). Os oligossacarídeos consistem em unidades de monossacarídeos ligados por ligações glicosídicas, formando pequenas cadeias. Os mais abundantes são os dissacarídeos, formados por duas unidades de monossacarídeos. Os mais típicos são a lactose (formada por uma unidade de D-galactose e uma de D-glicose) e a sacarose (formada por uma unidade de D-glicose e uma de D-frutose) (**Figura 1**).

Figura 1 - Estrutura de alguns sacarídeos. Monossacarídeos: D-galactose, D-glicose e D-frutose. Dissacarídeos: lactose e sacarose.

Fonte: Adaptada de NELSON⁸

A maior parte dos carboidratos encontrados na natureza ocorre na forma de polissacarídeos. Os polissacarídeos, ou glicanos, são polímeros de açúcar constituídos por mais de 20 unidades de monossacarídeos e que se diferem em sua composição pelas unidades de açúcar, tipo de ligação entre essas unidades, ramificações e comprimento da cadeia. Alguns exemplos de polissacarídeos são o amido e a celulose, que tem papel no armazenamento de energia e elementos estruturais em células de plantas, respectivamente.

Em mamíferos, os glicanos são constituídos por nove monossacarídeos: glicose (Glc), N-Acetilglicosamina (GlcNAc), galactose (Gal), N-Acetilgalactosamina (GalNAc), manose (Man), fucose (Fuc), ácido glicorônico (GlcA), xilose (Xyl) e ácido siálico (NeuAc), que podem ser conectados uns aos outros por uma ligação glicosídica numa miríade de combinações através da ação de enzimas conhecidas como glicosiltransferases e glicosidases.^{3, 5, 6} Devido ao grande número de possíveis estruturas que os glicanos podem assumir, a informação neles contida é enorme. Além disso, a glicosilação gera diversos tipos de glicoconjugados em que, tipicamente, se ligam glicanos a proteínas e lipídeos, formando um complexo biologicamente ativo⁸. São conhecidos pelo menos nove aminoácidos que sofrem glicosilação: Asn, Arg, Ser, Thr, Tyr, Trp, Cys, hidroxil-Lys e hidroxil-Pro^{9, 10}, formando o que se chama de glicoproteínas. As glicoproteínas carregam informações importantes, como sítios específicos para reconhecimento e alta afinidade de ligação para outras proteínas, assim como os gliolipídeos, que possuem uma cabeça hidrofóbica formada por glicanos, e que agem como sítios específicos de reconhecimento por proteínas GBPs. A distribuição espacial e temporal e a função de glicanos não são, ainda, totalmente entendidas e estudos que contribuam com informações nesse sentido são bastante desejáveis.

1.1.2 Lectinas

Como dito anteriormente, muitos processos biológicos passam pelo reconhecimento de glicanos por parte de proteínas GBPs. As lectinas estão entre as principais GBPs conhecidas até o momento.¹¹ Desde a década de 1960, é conhecida a função aglutinante e a afinidade por açúcares dessa família de proteínas e que essas regulam diferentes processos biológicos.¹² As lectinas endógenas são responsáveis por converter informações contidas nos glicanos em sinal celular.

As funções desempenhadas por lectinas estão intimamente associadas com sua capacidade de “ler” o glicocódigo e, assim, a interação de lectinas com estruturas de glicanos específicos são responsáveis pelo enovelamento correto e ordenação de algumas proteínas, adesão e tráfego celular, reconhecimento de patógenos, fertilização em mamíferos, dentre outros processos.¹³

Ao longo de mais de um século, as lectinas de origem vegetal foram extensivamente estudadas e caracterizadas.¹⁴ Nas últimas décadas, as pesquisas têm também focado o estudo de lectinas de origem animal e sua capacidade de reconhecer moléculas de carboidrato de origem endógena ou exógenas às células.¹¹ Uma análise geral revela que embora a arquitetura global de uma lectina possa variar enormemente, a capacidade destas proteínas em se ligar a moléculas de carboidratos é restrita a um domínio específico da proteína designado por domínio de reconhecimento a carboidratos (CRDs). Os CRDs compartilham alta similaridade em termos estruturais, no entanto, exibem distintas características com relação à natureza de seus ligantes, sua dependência por cátions bivalentes, sua localização celular e sua participação em processos biológicos.¹¹

A família das lectinas pode ser classificada em diferentes subfamílias segundo a presença de sequências conservadas de aminoácidos nos CRDs, estrutura tridimensional desses domínios e propriedades como dependência de cátions bivalentes ou ambiente redutor para a funcionalização (**Tabela 1**). Com o avanço da ciência e tecnologia, foi possível resolver várias estruturas tridimensionais de lectinas de diferentes grupos (ex. PDB IDs: 2MSB, 1KJL, 1M6P, 1O7V, 1K12, 1JHN, 1X9D, 1R1Z, 1DQ0, 1UMI, 1JC9, 1HJW, 1GNH) e, desta forma, identificar características do enovelamento estrutural de cada uma. Devido à diversidade estrutural, as lectinas podem exibir atividades biológicas múltiplas.^{15, 16}

Tabela 1 - Classificação da família de lectinas.

Subfamília	Especificidade	Característica
Tipo-C	Man, Gal, Fuc	Dependente de Ca^{2+}
Galectinas	β -galactosídeos	Motivo tipo-S
Tipo-P	Man-6-P	Motivo tipo-P
Tipo-I	Variável	Domínios de imunoglobulinas
Tipo-F	L-fucose	Motivo tipo-F
Calnexina	Glc_1Man_9	Motivo tipo-calnexina
Tipo-M	Man_8	Motivo tipo-M
Tipo-L	Variável	Motivo tipo-L
Tipo-R	Variável	Motivo tipo-R
F-box	GlcNAc_2	Motivo tipo-F-box
Ficolina	GlcNAc , GalNAc	Contém domínios de fibrinogênio/colágeno
Chitinase-like (chilectinas)	Chito-oligossacarídeos	Estrutura TIM barril-like
Pentraxina	PC/galactosídeos	Multivalente
Ligação a heparina	Heparina/heparina- $(\text{SO}_4)^{2-}$	Grupo de aminoácidos básicos
Intelectinas (tipo-X)	Gal, galactofuranose, pentoses	Motivo tipo-intelectinas

Fonte: Adaptada de VAST¹⁷

1.1.3 Galectinas

As galectinas (originalmente denominadas de lectinas do tipo solúvel, tipo-S ou S-Lac) formam uma subfamília importante de proteínas pertencentes ao grupo das lectinas. Possuem características únicas como estrutura altamente conservada, especificidade à β -galactosídeos e capacidade de regular e mediar diversos processos celulares.^{11, 18-20} Membros desta classe de proteínas são encontrados em nematódeos, insetos e mamíferos com diversas funções celulares a elas atribuídas. As galectinas são proteínas encontradas na forma solúvel em ambientes extra e intracelular, incluindo o núcleo, de diversas células e tecidos. Dada sua localização, muitas funções intracelulares como a modulação de sinalização celular e de apoptose, regulação de *splicing* de RNA, maquinaria endocítica e tráfego estão sendo a elas

atribuídas.²¹⁻²³ A ausência de peptídeo sinal faz com que algumas galectinas sejam excretadas por uma via não-clássica, mantendo intacta sua função de reconhecimento de carboidratos. Uma vez fora da célula, as galectinas podem se ligar a inúmeros glicoconjugados e transmitir/decodificar informações para ativação de células imunes, diferenciação e homeostase.²⁴

Ainda em relação à sua função, algumas galectinas estão distribuídas em uma ampla variedade de tecidos enquanto outras são mais específicas. A sua expressão é modulada durante a diferenciação da célula individual e durante o desenvolvimento dos tecidos, e muda sob diferentes condições fisiológicas ou patológicas.²⁵ A **Tabela 2** mostra o tipo de estrutura e a distribuição tecidual das galectinas humanas. Podemos notar que as galectinas possuem uma diversidade de papéis biológicos devido a sua vasta localização. Da literatura, algumas das atividades biológicas atribuídas às galectinas são: progressão de câncer ²⁶⁻²⁸, processos específicos de desenvolvimento normal de tecidos, processos de regeneração e cicatrização ²⁹, ³⁰ e participação imunológica e inflamatória.³¹⁻³³ Além disso, estudos têm demonstrado que as galectinas participam no desenvolvimento de neurites, inibição do crescimento de células não-neurais ^{34, 35}, estimulam o crescimento celular ³⁶, induzem apoptose de tímócitos imaturos ³⁷, células T ativadas ³⁸, gênese tumoral, processos autoimunes, diferenciação, morfogênese, metástase de tumor, apoptose e função imunorregulatória.^{33, 39} A maioria dessas funções está relacionada ao processo de reconhecimento de carboidratos na superfície celular.

Em termos estruturais, os membros da família das galectinas compartilham domínios de reconhecimento de carboidratos característicos, constituídos por uma sequência em torno de 135 a 140 aminoácidos altamente conservados. Até o presente momento, 16 galectinas humanas diferentes foram isoladas e sequenciadas. Elas são numeradas de acordo com a ordem cronológica de descoberta (galectina-1 a galectina-16). Baseado no número e nas posições dos CRDs, os membros da família das galectinas são classificados em três grupos: proto, químera e *tandem-repeat* (**Tabela 2** e **Figura 2**).

Tabela 2 - Estrutura e distribuição tecidual das galectinas.

Galectina	Tipo de Estrutura	Distribuição Tecidual
1	Tipo proto; monomérico/dimérico	Músculos, neurônios, rins, placenta, timos, célula B, célula T, células tumorais
2	Tipo proto; monomérico/dimérico	Hepatomas, trato gastrointestinal, tumores
3	Tipo quimera	Atividades macrófagas, eosinófilos, mastócitos, epitélio gastrointestinal, trato respiratório, rins, neurônios
4	Tipo 'tandem-repeat'	Epitélio intestinal e oral
5	Tipo proto	Eritrócitos e epitélio oral
6	Tipo 'tandem-repeat'	Epitélio intestinal
7	Tipo proto	Queratinócitos
8	Tipo ' <i>tandem-repeat</i> '; possui isoformas	Pulmão, fígado, rins, coração e cérebro
9	Tipo 'tandem-repeat'	Timos, fígado, intestino delgado, rins, baço, pulmão, músculos cardíacos e esqueléticos
10	Tipo proto	Eosinófilos e basófilos
11	Tipo proto; dímero	Trato intestinal
12	Tipo 'tandem-repeat'	Adipócitos
13 (PP13)	Tipo proto	Placenta
14	Tipo proto	Eosinófilos
15	Tipo proto	Epitélio endometrial
16	Tipo proto	Placenta

Fonte: Adaptada de WADA et al⁴⁰; RABINOVICH et al⁴¹; GUARDIA et al⁴²

Figura 2 – Representação esquemática das estruturas dos três grupos de galectinas: proto, quimera e *tandem-repeat*.

Fonte: Adaptada de RABINOVICH²²

Os membros do grupo proto (compreendendo as galectinas-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14, -15 e -16) são caracterizados por possuir apenas um domínio CRD, podendo existir na forma de monômeros ou homodímeros ligados de forma não covalente. O tipo quimera possui apenas um membro, a galectina-3, composta por um domínio CRD na região C-terminal ligado a um pequeno domínio no N-terminal rico em resíduos de prolina, tirosina e glicina. Este último possui repetições de 7 a 10 aminoácidos com uma sequência consenso do tipo PGAYPG(X)₁₋₄, onde X representa qualquer aminoácido, e é similar a domínios encontrados em proteínas que possuem características de auto-agregação/oligomerização.⁴³ No grupo *tandem-repeat* (galectinas-4, -6, -8, -9 e -12), a galectina é formada por dois CRDs distintos conectados por um peptídeo de ligação e cada domínio possui afinidade diferente por carboidratos.⁴¹

Considerando a ligação com carboidratos, a maioria das galectinas é bivalente ou multivalente, permitindo o reconhecimento e a ligação de múltiplos ligantes e a ativação de diversas vias de sinalização. As galectinas do tipo proto podem dimerizar, a galectina-3 pode formar oligômeros e se ligar de forma multivalente a glicanos e as galectinas do tipo *tandem-repeat* são pelo menos bivalentes. Desta forma, essas proteínas podem formar estruturas ordenadas de galectina-glicano, chamadas de redes (*lattices*), e atuar na superfície celular ou através de ligação específica direta com glicoconjugados presentes na superfície celular²² (**Figura 3**).

Figura 3 - Representação esquemática dos diferentes tipos de rede que podem ser, hipoteticamente, formados entre galectinas e glicanos multivalentes. São mostrados exemplos de ligantes bi, tri e tetravalentes.

Fonte: Adaptada de RABINOVICH²²

Fazendo uma análise global da estrutura dos CRDs das galectinas (utilizando a galectina-1 de humano, HGal-1, como exemplo), temos que os CRDs são constituídos pela quantidade usual acima mencionada de 135 a 140 resíduos de aminoácidos conservados formando uma estrutura β -sanduíche composta por duas folhas- β antiparalelas em uma topologia do tipo motivo “*jelly-roll*” (**Figura 4**). O lado côncavo é formado por seis fitas, nomeadas de S1 a S6, onde se encontra o sítio de ligação (LBG, do inglês, *ligand-binding groove*), o sulco formado pelas fitas S4-S6, e o lado convexo é formado por cinco fitas chamadas de F1 a F5 (**Figura 4**). Ao longo da sequência de aminoácido das proteínas, as fitas são ordenadas da seguinte forma: S1 – F2 – S3 – S4 – S5 – S6 – F3 – F4 – F5 – S2 – F1, com variação de comprimento dos *loops* que as conectam.⁴²

Figura 4 - Estrutura tridimensional da galectina-1 humana (PDB 1GZW). (a) A estrutura da Gal-1 é apresentada como um exemplo da estrutura conservada da família das galectinas. As cinco fitas- β F (F1-F5) e as seis fitas- β S (S1-S6a/S6b) são indicados pela respectiva letra-número nas fitas- β . (b) Representação topológica do domínio CRD de HGal-1 gerado pelo servidor online PDBsum (<https://www.ebi.ac.uk/pdbsum/>).

Fonte: Adaptada de LOPEZ-LUCENDO⁴⁴

Através de análise computacional, Guardia e colaboradores compararam todas as sequências e estruturas dos domínios CRDs de todos os membros da subfamília das galectinas.⁴² Desta forma, mostraram que a subfamília de galectinas tem baixa identidade sequencial (29% de identidade sequencial e 35% de similaridade) e alta similaridade na estrutura tridimensional. Diversos resíduos de aminoácidos são altamente conservados entre as galectinas, dentre os quais estão os resíduos que compõem o sítio de ligação, sendo cruciais na ligação com carboidratos. Para a HGal-1, são eles: His44, Asn46, Arg48, His52, Asn61,

Trp68, Glu71 e Arg73.⁴⁴ Dentre todos estes, comparando-se aos outros membros da família, o resíduo de triptofano foi o que apareceu como resíduo mais crítico. Entretanto, é a presença de um anel aromático o fator fundamental para garantir a ligação com açúcar.^{45, 46}

1.1.4 Galectina-4 Humana

A galectina-4 humana (HGal-4) pertence ao grupo *tandem-repeat*. O monômero de aproximadamente 36 kDa contém dois domínios de reconhecimento a carboidratos (CRD-I no N-terminal e CRD-II no C-terminal) conectados por uma cadeia peptídica única.⁴⁷ Os dois domínios possuem sequência de aminoácidos conservados, característica de todas as galectinas, no entanto compartilham somente 37% de identidade entre si. O alinhamento sequencial dos CRDs é mostrado na **Figura 5** para o qual foi utilizado o servidor online ALIGN versão 2.1.⁴⁸ Dos sete resíduos envolvidos na interação com o carboidrato característico dos domínios CRDs, somente o resíduo de arginina 89 sofre uma mutação conservativa por uma lisina no CRD-II (indicado pela seta na **Figura 5**). Comparando-se os CRDs da HGal-4 com outras galectinas humanas, observamos que estes possuem uma identidade sequencial de aproximadamente 27% com o CRD da galectina-1, 35% com a galectina-3 e 35% com a galectina-7.⁴⁹ Os domínios de reconhecimento de carboidratos nas galectinas-4 são altamente conservados entre os membros da família de outros mamíferos, revelando uma identidade de 79% com a galectina-4 de porco e 76% com a de rato.⁴⁹

CRD-I	MAYVPAPGYQPTYNPTLPYYQPIPGGLNVGMSVYIQGVASEHMKRFFVN FVVGQD
CRD-II	---LPTMEGPPTFNPPVPYFGRLQGGLTARRTII IKGYVPPTGKSFAINFKVGSS
	↓
CRD-I	PGSDVAFHFNPRFDGWDKVVFNTLQGGKWSGERK RSM-PFKKGAAFELVFIVLA
CRD-II	--GDIALHINPRM-GNGTVVRN SLLNGSWGSEKKITHNPFPGPGQFFDLSIRCGL
CRD-I	EHYKVVVNGNPFYEYGHRLP-LQMVTHLQVDGDLQLQSINFI
CRD-II	DRFKVYANGQHLLFDFAHRLSAFQRVDTLEIQGDVTLSYVQI-

Figura 5 – Alinhamento sequencial dos domínios CRD-I e CRD-II da galectina-4 humana. O alinhamento mostra os sete resíduos pertencentes ao sítio de ligação, o resíduo de arginina 89 sofre uma mutação conservativa no domínio CRD-II por uma lisina (rosa).

Fonte: Elaborada pela autora.

Até o presente momento são conhecidas somente as estruturas tridimensionais dos domínios CRDs da galectina-4 separadamente: duas estruturas do domínio N-terminal da galectina-4 de camundongo (PDB ID: 3I8T⁵⁰; 2DYC, não publicado), uma estrutura do domínio C-terminal da galectina-4 de humano resolvida por RMN (PDB ID: 1X50, não publicado) e seis estruturas cristalográficas do domínio C-terminal da HGal-4 complexada com diferentes ligantes (PDB ID: 5CBL⁵¹; 4YLZ, 4YM0, 4YM1, 4YM2 e 4YM3⁵²). Na **Figura 6** abaixo são mostradas as estruturas cristalográficas dos domínios CRD-I e CRD-II da HGal-4⁵³ na conformação apo, resolvidas e disponibilizadas por nossos colaboradores, grupo da Profa. Dra. Maria Cristina Nonato (FCFRP - USP). Em ambas as estruturas 3D dos domínios CRD-I e CRD-II (**Figura 6a** e **b**, respectivamente) observamos o enovelamento típico compartilhado por todas as glectinas em um arranjo β -sanduíche e em uma topologia do tipo motivo “jelly-roll”.

(a) CRD-I

(b) CRD-II

Figura 6 - Estrutura tridimensional dos domínios: a) CRD-I (PDB ID 4XZP) e b) CRD-II (não publicado). As cinco fitas- β F (F1-F5) e as seis fitas- β S (S1-S6) são indicados pela respectiva letra-número nas folhas- β .

Fonte: Elaborada pela autora.

Ambos os domínios da galectina-4 de ligam lactose com afinidade similar àquela descrita para outras galectinas (k_D de aproximadamente 0,5-1 mM), mas suas respectivas preferências por este e outros sacarídeos são diferentes.^{54, 55} Esta é uma possível causa da diversidade de locais onde são encontradas e das inúmeras funções atribuídas à HGal-4 devido ao *crosslinking* de moléculas.^{56, 57} Recentemente, a ligação específica a cada domínio tem sido estudada em galectinas de ratos, camundongos e humanos.⁵⁸⁻⁶² Estes estudos

confirmam que ambos os domínios diferem no reconhecimento, seletividade e afinidade por oligossacarídeos específicos, corroborando a hipótese de funções de *clustering* ou *crosslinking* de galectina-4.^{62, 63}

A galectina-4 é expressa no epitélio da mucosa oral, do esôfago e do intestino.^{49, 54, 61} No trato gastrointestinal, verificou-se que galectina-4 atua como um marcador de domínios do tipo *raft* localizados na borda das células em escova dos enterócitos.⁶⁴ A HGal-4 tem sido detectada como proteína de adesão celular, no epitélio da mucosa oral, no esôfago, e tem sido encontrada mais especificamente na membrana citoplasmática.⁵⁸ Estudos recentes demonstram que a HGal-4 se liga a distintas estruturas nas bordas intercelulares do epitélio coloretal. Os domínios de reconhecimento de carboidratos na molécula reconhecem distintos ligantes, sendo que o domínio N-terminal possui afinidade por ligantes localizados em espaços intercelulares, enquanto o domínio C-terminal se encontra associado a ligantes presentes na membrana celular. Este fato sugere que a HGal-4 possui como possível função mediar interações entre glicoconjugados presentes na membrana citoplasmática em células do epitélio intestinal e glicoconjugados encontrados em espaço intercelular.⁵⁸

Com relação ao seu envolvimento em fenômenos patológicos, a maioria dos estudos que relacionam tumores à galectina-4 reportam apenas modificações nos níveis de mRNA. Em câncer de cólon intestinal, a expressão de mRNA da HGal-4 está abaixo dos níveis normais, enquanto está presente em altas concentrações em carcinoma hepatocelular⁶⁵ e em câncer gástrico, com aumento do poder metastático quando comparado com o tecido normal.⁶⁶ A diferença na expressão do mRNA para HGal-4 em câncer de cólon indica a participação desta lectina na malignidade do câncer coloretal.⁴⁷ Embora o papel de algumas galectinas em metástase tumoral já tenha sido constatado, a participação da galectina-4, assim como a importância das diferentes especificidades de cada um dos seus CRDs, neste processo ainda é desconhecida.²⁵ A expressão mais controlada da HGal-4 faz com que o uso desta galectina seja particularmente promissor como marcador diferencial no diagnóstico e prognóstico de certos tipos de câncer.^{35, 47} Além disso, a HGal-4 não é apenas um marcador de malignidade, mas também promove a carcinogenicidade e a inibição de sua atividade pode ser um componente importante na terapia anticâncer.^{47, 67}

Embora os dados relatados na literatura, tanto de caracterização funcional em nível molecular quanto aqueles relacionados ao envolvimento em mecanismos celulares e patológicos, justifiquem a importância do estudo das galectinas, fica também bastante

evidente que este campo de pesquisa carece ainda de respostas a muitas perguntas. Por exemplo: qual a principal função das galectinas? Por que elas são encontradas extracelularmente apesar de terem sido desenhadas como proteínas intracelulares? Por que as galectinas são específicas para β -galactosídeos? Quais são seus ligantes endógenos intra e extracelulares? Como a sua disfunção pode levar à patologias? As respostas a estas questões certamente passam por um entendimento e descrição mais detalhados dos fenômenos, em nível molecular, que regem as interações relevantes para função da galectina-4. Informações obtidas através de técnicas experimentais diversas e complementares podem, portanto, ajudar a compreender tais aspectos e constituem a base metodológica empregada no presente projeto.

Além desse aspecto multitécnicas, nosso trabalho procura adotar também uma estratégia de estudos de mais largo escopo que envolvam galectinas inseridas em sistemas de interação gradativamente mais complexos, permitindo, assim, investigações que vão desde a Biofísica molecular estrutural/funcional até o papel do interactoma proteico em células. Para tanto, são aqui relatados e discutidos aspectos biofísicos envolvendo a proteína galectina-4 humana íntegra e seus domínios CRD-I e CRD-II isolados em um nível crescente de complexidade de sistemas em investigação que vão desde estudos dessas proteínas em solução (na ausência e na presença de ligantes), passando por investigação de suas interações com miméticos de membranas celulares (também em nível crescente de complexidade de composição) e chegando a estudos de Hgal-4 na presença de células tumorais.

1.2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

O objetivo geral desta parte do presente trabalho é mapear as interações da HGal-4 e de seus domínios CRDs (CRD-I e CRD-II) individualmente com carboidratos em solução e/ou presentes na superfície de modelos de membrana e quais os efeitos de tais interações tanto em suas respectivas estruturas quanto das membranas.

Especificamente, através de uma abordagem multi-técnica, buscamos por:

- Diferenças comportamentais entre os domínios CRD-I e CRD-II, incluindo mudanças conformacionais, reconhecimento e afinidades por diferentes ligantes;
- Determinar a afinidade de ligação da galectina-4 humana e de seus domínios CRD-I e CRD-II por diferentes ligantes;
- Investigar interações com carboidratos em superfície de modelos de membrana.

1.3 MATERIAIS E MÉTODOS

1.3.1 Expressão e Purificação dos domínios CRDs

Os genes referentes aos domínios CRD-I e CRD-II estão inseridos no vetor de expressão pET28a(+) e os plasmídeos foram transformados em linhagem de expressão *E.coli* Rosetta (DE3). Os plasmídeos recombinantes foram cedidos gentilmente pela Profa. Dra. Maria Cristina Nonato (FCFRP - USP) e seguimos o protocolo de expressão e purificação previamente estabelecido em seu grupo ⁶⁸, salvo algumas adaptações. Utilizamos protocolos similares para a expressão dos dois domínios.

As expressões das proteínas foram realizadas em meio de cultura LB (Lúria-Bertani) na presença do antibiótico canamicina (30 µg/mL) e cloranfenicol (34 µg/mL) e mantidas em uma incubadora sob agitação. O crescimento das células foi monitorado medindo-se a densidade óptica no comprimento de onda de 600 nm (DO_{600nm}) até que se atingisse valor entre 0,50 e 0,60. Ao final deste processo, a indução da expressão de cada domínio foi feita adicionando-se isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) em uma concentração de 0,5 mM e mantendo-se sob agitação *overnight* a 250 rpm e a 30°C.

Após essas etapas, as células foram isoladas do meio de cultura por centrifugação a 6.000 rpm e a 4 °C por 20 minutos. Para a obtenção dos domínios, as células foram ressuspensas em tampão 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl em pH 8,00 (tampão A), 1 mM do inibidor de protease fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) e 14 mM de β-mercaptoetanol (2-ME). Foram utilizados aproximadamente 3 mL do tampão A para cada 1 grama de célula na ressuspensão. Em seguida, o material ressuspendido foi sonicado em banho de gelo em 12 ciclos de 30 segundos de sonicação a 12% de potência, interrompidos por 45 segundos de intervalo entre os ciclos. Após a sonicação, a amostra foi centrifugada por 30 minutos a 12.000 rpm e a 4 °C para isolar o material solúvel (sobrenadante) e insolúvel (*pellet*) e, em seguida, mantida à temperatura de 4 °C.

A purificação foi realizada em duas etapas: a cromatografia de afinidade em resina de Ni-NTA e a cromatografia por exclusão molecular. Na primeira etapa da purificação do domínio CRD-I, a resina foi primeiramente equilibrada com tampão A. O sobrenadante resultante da extração da proteína foi adicionado à resina e o eluente coletado. Este eluente foi passado novamente pela resina para que as moléculas de proteína que não se ligaram pudessem se ligar à resina. Em seguida, foi feita uma lavagem com tampão A, acrescida de

um gradiente crescente de concentração de imidazol (0, 25, 50, 300 e 500 mM) para a remoção de eventuais contaminantes. A diferença na purificação do domínio CRD-II está na adição de 14 mM de 2-ME em todas as etapas devido à presença de duas cisteínas livres neste fragmento da HGal-4. Para ambas as proteínas, a eluição ocorreu em 300 mM de concentração de imidazol e foram coletadas 15 alíquotas de 2 mL cada. As frações puras de cada domínio foram unificadas e concentradas por ultra filtração em sistema Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Devices com limite de peso molecular nominal (NMWL) de 10 kDa (Millipore, EUA), submetida à centrifugação a 2.500g à 4°C.

Na segunda etapa, os domínios foram submetidos à cromatografia de exclusão molecular utilizando-se uma coluna Superdex75 em um cromatógrafo AKTA purifier (GE Healthcare, EUA). O fluxo foi mantido em 0,5 mL/min de tampão PBS (Phosphate Buffer Saline) em pH 7,4 e 2-ME (1 mM ou 14 mM, dependendo do experimento a ser realizado) e foram coletadas frações de 1 mL. O grau de pureza das proteínas foi monitorado por eletroforese em gel de poliacrilamida 15% com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).

Para a quantificação das proteínas purificadas utilizamos o espectrofotômetro NanoDrop®- 1000 v.3.7.1 (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) medindo-se a absorção em 280 nm. Através das sequências de aminoácidos que constituem cada domínio, podemos calcular os coeficientes de extinção molar (ϵ) através do programa *ProtParam Tool* (<http://ca.expasy.org/tools/protparam.html>).⁶⁹ Os valores de ϵ obtidos para os domínios CRD-I e CRD-II na forma reduzida foram de 24410 e 11460 M⁻¹ cm⁻¹, respectivamente. A estimativa da concentração das amostras foi determinada através da Lei de Beer-Lambert: $A = \epsilon \cdot C \cdot l$, onde ϵ é o coeficiente de extinção molar e pode variar com o comprimento de onda incidente e o solvente empregado, A é a absorbância em 280nm, l é o comprimento do caminho óptico (cm) e C é a concentração molar (mol/L).

1.3.2 Expressão e Purificação da Galectina-4 Humana

O gene referente à galecina-4 humana está inserido em vetor de expressão em bactéria pQE e os plasmídeos foram transformados em linhagem de expressão *E.coli* Rosetta (DE3). O plasmídeo recombinante foi cedido gentilmente pelo Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi (FCFRP - USP) e seguimos o protocolo de expressão e purificação previamente estabelecido por Ideo et al.⁷⁰, salvo algumas adaptações.

A expressão da galectina-4 humana foi realizada em meio de cultura LB na presença dos antibióticos cloranfenicol (34 µg/mL) e canamicina (30 µg/mL) e mantido em uma incubadora sob agitação. O crescimento das células foi monitorado medindo-se a densidade óptica no comprimento de onda de 600 nm (DO_{600nm}) até que se atingisse o valor entre 0,45 e 0,50. Ao final deste processo, a indução da expressão foi feita adicionando-se IPTG em uma concentração final de 0,5 mM e mantendo-se sob agitação *overnight* a 250 rpm e a 30 °C.

Após essas etapas, as células foram isoladas do meio de cultura por centrifugação a 6.000 rpm e a 4 °C por 20 minutos. Para a obtenção da proteína HGal-4, as células foram ressuspensas em tampão PBS em pH 7,40, 1 mM do inibidor de protease PMSF e 14 mM de 2-ME. Foram utilizados aproximadamente 3 mL do tampão PBS para cada 1 grama de célula na ressuspensão. Em seguida, o material ressuspendido foi sonificado em banho de gelo em 12 ciclos de 30 segundos de sonicação a 12% de potência, interrompidos por 45 segundos de intervalo entre os ciclos. Após a sonicação, a amostra foi centrifugada por 40 minutos a 12.000 rpm e a 4°C para isolar o material solúvel (sobrenadante) daquele insolúvel (*pellet*) e, em seguida, mantida à temperatura de 4°C.

A purificação da HGal-4 foi realizada em duas etapas: a cromatografia de afinidade e a cromatografia por exclusão molecular. Na primeira etapa, utilizamos uma coluna de resina de α -Lactose-Agarose (Sigma-Aldrich) como matriz. A coluna foi primeiramente equilibrada com tampão de lavagem (PBS em pH 7,4 e 14 mM 2-ME). O sobrenadante resultante da extração da proteína foi adicionado à resina e o eluente coletado. Este eluente foi passado novamente pela resina para que proteínas que não se ligaram, pudessem se ligar à resina. Em seguida, foi feita uma lavagem com o tampão de lavagem para a remoção de eventuais contaminantes. A eluição da proteína foi feita com o tampão de eluição (PBS em pH 7,4, 14 mM de 2-ME e 100 mM de lactose) e coletada em alíquotas de 2 mL cada. As frações puras da HGal-4 foram unificadas e concentradas por ultra filtração em sistema Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Devices com limite de peso molecular nominal (NMWL) de 10 kDa (Millipore, EUA), submetida à centrifugação a 2.500g e a 4°C.

Após esse processo, a proteína foi submetida à cromatografia de exclusão molecular utilizando-se uma coluna Superdex™ 75 em um cromatógrafo AKTA purifier (GE Healthcare, EUA). O fluxo foi mantido em 0,5 mL/min do mesmo tampão e foram coletadas frações de 1 mL. Esta etapa é necessária para garantir a retirada da lactose. O grau de pureza da proteína foi monitorado por eletroforese em gel de poliacrilamida 15% SDS-PAGE. A

proteína foi quantificada da mesma forma que para os domínios CRDs, sendo o valor de ϵ teórico obtido para HGal-4 é $37360 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

1.3.3 Análise da atividade lectínica por ensaio de hemaglutinação

A atividade lectínica das galectinas é feita pelo reconhecimento de glicanos na superfície de eritrócitos. Esta capacidade de aglutinar hemácias é denominada hemaglutinação. A hemaglutinação é um dos métodos mais antigos, simples e baratos utilizado para o reconhecimento e caracterização de lectinas, que devido ao seu caráter multivalente tem a capacidade de interligar diferentes células, formando uma rede. A **Figura 7** mostra um esquema de um teste de hemaglutinação com galectina.

Figura 7 – Representação pictória de atividade hemaglutinante de galectinas. Quando a galectina exibe atividade, ou seja, há formação de rede, observa-se que o poço fica difuso. Ao passo que, quando não há hemaglutinação, configura-se um “botão” no fundo do poço.

Fonte: Adaptada de HIRABAYASHI⁷¹

Os ensaios de hemaglutinação foram realizados utilizando-se suspensão de hemácias humanas a 3% diluídas em tampão PBS. A reação foi realizada em placas de poliestireno de fundo em “U”, onde em cada poço foi acrescentado 50 μl de suspensão de hemácias e 50 μl de diferentes concentrações de proteína (CRD-I, CRD-II e/ou HGal-4). A hemaglutinação das hemácias foi verificada após 2 horas de incubação à temperatura ambiente. Foram também testados a atividade lectínica na presença de lactose ou sacarose (100 mM), como inibidor e controle negativo, respectivamente. As hemácias humanas foram obtidas a partir de doadores sadios voluntários, de acordo com o termo de consentimento aprovado previamente pelo Comitê de Ética em Pesquisa (Protocolo CEP/FCFRP n° 231).

1.3.4 Estudo de estrutura-função da interação proteína-ligante

As mudanças conformacionais na estrutura secundária e terciária das proteínas foram analisadas por espectroscopia de dicroísmo circular (CD) na região espectral do UV-próximo, UV-distante e por radiação síncrotron, e espectroscopia de fluorescência.

Os espectros de CD foram adquiridos no espectropolarímetro Jasco J720 ou J815 (Jasco Corporation, Japan) acoplado a um módulo Peltier para o controle da variação de temperatura. As medidas foram feitas no intervalo de comprimentos de onda de 197 a 250 nm, a uma velocidade de varredura de 50 nm/min e sob um fluxo constante de N₂ purgado de acordo com as instruções do fabricante. No estudo de desnaturação térmica, variamos a temperatura entre 20 e 80°C em intervalos de 2°C. Utilizamos cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 mm. Os espectros medidos são resultado da média de oito varreduras acumulativas para melhorar a relação sinal/ruído. As concentrações das proteínas utilizadas estavam entre 3 e 5 µM em tampão PBS e, para o CRD-II e HGal-4, acrescentamos 1 mM de 2-ME. Os carboidratos utilizados nos estudos de interação proteína-carboidrato foram: lactose e sacarose. A concentração de carboidrato utilizada foi de aproximadamente 0,03 a 3 mM. Foi utilizado o programa Spectral Analysis da Jasco para subtrair o espectro do tampão do espectro da amostra e para eliminar a interferência causada pelo ruído gerado durante a aquisição dos dados. Os espectros são coletados em elipticidade, θ , e, então, transformados para elipticidade molar residual, $[\theta]$, ou seja, são normalizados pela concentração e pelo número de resíduos pela expressão $[\theta] = \frac{\theta \cdot 0,1 \cdot MW}{n-1} \cdot c \cdot l$, onde MW é a massa molecular da proteína (em Daltons), n é o número de resíduos, c é a concentração da amostra (em mg/mL) e l é o caminho óptico em cm.⁷²

Os experimentos de dicroísmo circular por radiação síncrotron (SRCD) foram realizados na linha UV-CD12 do Laboratório Síncrotron do ANKA-KIT (Karlsruhe, Alemanha). As medidas foram feitas no intervalo de comprimentos de onda de 280 a 180 nm, com intervalos de 0,5 nm, dwell time de 1,5 s, à 20°C. Utilizaram-se celas de quartzo ou Ca₂F desmontáveis (Hellma Ltd, UK) com caminho óptico de 10 ou 100 µm. Os espectros medidos são resultado da média de tres varreduras acumulativas. As concentrações das amostras utilizadas foram de 1,5 mg/mL (~25µM) em tampão PBS, para o CRD-II e HGal-4, acrescentamos 1 mM de 2-ME. Os carboidratos utilizados nos estudos de interação proteína-carboidrato foram: lactose e sacarose na concentração de 3 mM. Os espectros foram

processados usando-se o software *CDTools*⁷³, incluindo subtração de linha de base e média dos espectros. Os espectros finais estão em unidades de absorvidade molar ($\Delta\epsilon$).

Os espectros de emissão de fluorescência foram adquiridos em um fluorímetro Shimadzu RF-5301PC (Shimadzu Corporation, Japan). As medidas foram realizadas em cubetas de quartzo com caminho ótico de 1 cm e abertura das fendas utilizadas na excitação e emissão de 3 e 5 nm, respectivamente. As mudanças estruturais dos domínios CRD-I e CRD-II e da HGal-4 foram monitoradas frente à excitação do triptofano em 295 nm à temperatura ambiente. Os espectros de emissão foram monitorados de 300 a 500 nm. A concentração proteica utilizada foi de 3 μ M em tampão PBS e a concentração final de carboidrato foi de 100 mM. O software Personal Fluorescence ver 2.03 foi utilizado na aquisição de dados.

1.3.5 Termodinâmica de interação proteína-ligante

As afinidades da interação proteína-ligante de interesse foram investigadas por termoforese em micro-escala (MST) e calorimetria de titulação isotérmica (ITC) e, assim, obter os parâmetros termodinâmicos de interação.

As medidas de MST foram realizadas no NanoTemper Monolith NT.115 Blue/Red excitation (NanoTemper Technologies) no *Biophysics Facilities* do *Department of Biochemistry, University of Oxford*. As proteínas foram marcadas com o fluoróforo Alexa Fluor® 647 C2 Maleimide Dye (Life Technologies TM). Séries de titulação com diferentes carboidratos (lactose, N-Acetil-lactosamina, sacarose) foram preparados na proporção 1:1, mantendo-se a concentração de proteína marcada a 200 nM. Após 1 hora de incubação a 4°C, as amostras foram inseridas em capilar padrão usando-se 10, 30 ou 50% de potência do LED e 80% de potência de laser infravermelho (IR). Os tempos utilizados de laser “ligado” e “desligado” foram de 30 e 5 s, respectivamente.

Os experimentos de ITC foram realizados no microcalorímetro VP-ITC da empresa MicroCal Inc. (USA), em uma temperatura de 20 °C, onde 300 μ L de ligante presente na seringa de injeção foram titulados em uma cela de amostra de 1,4 mL contendo a proteína mantida sob agitação continua de 255 rpm. O volume de cada injeção da titulação foi de 10 μ L do ligante a cada 180 segundos. As concentrações das amostras variaram conforme a proteína: a concentração do ligante foi de 25 mM e da proteína de 10-40 μ M em tampão PBS. As amostras foram degaseificadas antes de serem injetadas na cela de amostra do calorímetro para prevenir a formação de bolhas durante o experimento. Tomamos o cuidado para que

tanto a proteína como o ligante estivessem no mesmo tampão e, sempre, utilizamos tampões recém preparados. A cela de referência foi preenchida com água. Experimentos controles foram realizados com os ligantes titulados em tampão, nas mesmas condições utilizadas anteriormente, de forma que o calor de diluição destes fosse subtraído do calor de ligação das proteínas no tratamento dos dados.

1.3.6 Interação proteína e modelos de membrana

Nos estudos de interação das proteínas de interesse com modelos de membrana, nos valem do uso de fosfolipídios marcados com sondas magnéticas inseridos em vesículas lipídicas unilamelares grandes. Os fosfolipídios marcados tornam os sistemas passíveis de investigação através da técnica de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE).

As vesículas unilamelares grandes (large unilamellar vesicle - LUV) foram preparadas seguindo-se o protocolo descrito por MacDonald et al ⁷⁴. Filmes lipídicos na composição desejada foram obtidos evaporando-se volumes adequados de soluções estoque de cada fosfolipídios, colesterol e/ou esfingomiéline em clorofórmio/metanol e adicionando-se também, quando necessário, o fosfolipídio contendo a sonda magnética (marcador de spin). As vesículas contendo os fosfolipídios marcados foram preparadas de forma a se obter uma concentração final de 0,5 mol% do marcador de spin. Os filmes foram, então, mantidos sob vácuo por pelo menos 2 h e, em seguida, ressuspensos no tampão desejado e hidratados por pelo menos 1,5 h. Dez ciclos de congelamento/descongelamento foram realizados e, em seguida, os lipossomos formados foram extrusados em um mini-extrusor Avanti utilizando um filtro de 100 µm. A amostra final contendo vesículas e proteína teve razão proteína:lipídio de 1:50 (mol:mol).

Por sua vez, os espectros de RPE foram adquiridos em espectrômetro Varian E109 (Varian, Inc., EUA). As amostras foram colocadas em capilares hematócitos. Foi empregada frequência de microondas da ordem de 9,4 GHz. A varredura de campo foi de 160 G, a amplitude de modulação de 1,0 G, constante de tempo de 0,064 s, modulação do campo magnético de 100 kHz e potência de microondas de 40 mW. Foi efetuado o número de varreduras necessário para obtermos espectros com relação sinal/ruído suficientemente alta para uma análise adequada. Os espectros finais foram normalizados pela sua área. A concentração de proteína utilizada nos experimentos de RPE foi em torno de 15 µM (~ 0,5 mg/mL).

1.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

1.4.1 Expressão e Purificação dos domínios CRDs

As proteínas recombinantes CRD-I e CRD-II foram expressas de forma heteróloga (em bactéria) e purificadas em coluna de afinidade contendo níquel imobilizado (Ni-NTA), uma vez que as construções codificadoras dos CRDs possuem uma cauda de histidinas na região N-terminal, e, uma etapa adicional, de cromatografia por exclusão molecular (Superdex75). O grau de pureza foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE).

A análise eletroforética e cromatográfica, afinidade e exclusão molecular, mostraram que as proteínas foram obtidas com um alto grau de pureza e massas moleculares próximas ao esperado: ~ 17 kDa para CRD-I (**Figura 8**). O CRD-I foi eluído com 300 mM de imidazol e as lavagens na presença de 0, 25 e 50 mM de imidazol foram eficientes para retirar boa parte dos contaminantes. O rendimento de purificação do CRD-I foi estimado em aproximadamente 1,5 mg por litro de cultura.

Figura 8 - Perfil de purificação do domínio CRD-I. (a) Análise por eletroforese em gel SDS-PAGE 15% da purificação do CRD-I: (1) eluição da proteína com 300 mM de imidazol por cromatografia de afinidade em coluna de Ni-NTA; (2) frações 12 e 13 da cromatografia de exclusão molecular. (b) Perfil cromatográfico da etapa de exclusão molecular em coluna Superdex75.

Fonte: Elaborada pela autora.

No processo de purificação do domínio CRD-II, devido à presença de cisteínas livres, foram acrescentados 14 mM do agente redutor β -mercaptoetanol em todos os passos da purificação. A eletroforese do domínio CRD-II (**Figura 9**) mostra, como esperado, uma banda com massa em torno de 16 kDa. A proteína é eluída na presença de 300 mM de imidazol e as lavagens na presença de 0, 25 e 50 mM de imidazol usadas para retirar os contaminantes da solução contendo esse domínio. O rendimento de purificação do CRD-II foi estimado em aproximadamente 10 mg por litro de cultura.

Figura 9 - Perfil de purificação do domínio CRD-II. (a) Análise por eletroforese em gel SDS-PAGE 15% da purificação do CRD-I: (1) eluição da proteína com 300 mM de imidazol por cromatografia de afinidade em coluna de Ni-NTA; (2) frações 13 e 14 da cromatografia de exclusão molecular. (b) Perfil cromatográfico da etapa de exclusão molecular em coluna Superdex75.

Fonte: Elaborada pela autora.

1.4.2 Expressão e Purificação da Galectina-4 Humana

A análise eletroforética e cromatográfica, afinidade e exclusão molecular, mostraram que a proteína HGal-4 foi obtida com um alto grau de pureza e massa molecular próxima ao esperado: ~ 36 kDa para HGal-4 (**Figura 10**). A galectina-4 humana foi eluída com 100 mM de lactose. O rendimento de purificação da HGal-4 foi estimado em aproximadamente 2,5 mg por litro de cultura.

Figura 10 - Perfil de purificação da HGal-4. (a) Análise por eletroforese em gel SDS-PAGE 15% da purificação da HGal-4: (1) eluição da proteína com 100 mM de lactose por cromatografia de afinidade em coluna de α -Lactose-Agarose; (2) frações 11 e 12 da cromatografia de exclusão molecular. (b) Perfil cromatográfico da etapa de exclusão molecular em coluna Superdex75.

Fonte: Elaborada pela autora.

1.4.3 Análise da atividade lectínica por ensaio de hemaglutinação

A atividade lectínica das proteínas recombinantes pode ser analisada pelo teste de aglutinação de eritrócitos, também denominado de hemaglutinação. No entanto, para que haja atividade hemaglutinante, é necessária a existência de, no mínimo, duas unidades de CRD para que a formação de “rede” seja estabelecida. Os resultados dos testes de hemaglutinação para as proteínas CRD-I, CRD-II e HGal-4, em diferentes concentrações e em triplicatas, são mostrados na **Figura 11** abaixo. Observamos que o domínio CRD-I não possui atividade hemaglutinante em nenhuma concentração proteica. Já o domínio CRD-II apresenta atividade positiva na concentração de 5 e 10 μM , o que sugere que a atividade lectínica de CRD-II possui uma dependência com a concentração de proteína, ou seja, em altas concentrações, uma interação não-covalente provavelmente via mecanismos similares àqueles observados na formação de oligômeros de galetinas do tipo proto (como galectina-1⁴⁴) ocorre entre subunidades CRDs, tornando-o, assim, ativo. Por fim, a HGal-4 é lectinicamente ativa até a concentração de 0,31 μM .

Os resultados mostrados na **Figura 11** evidenciam a participação assimétrica dos domínios CRDs no processo de hemaglutinação, sugerindo distintos mecanismos de interação com glicanos para cada domínio CRD. Isto está de acordo com resultados prévios obtidos em um estudo em que os autores, combinando em diferentes construções proteicas os domínios CRDs de galectina 1 (pertencente ao grupo proto) e de galectina 9 (pertencente ao grupo *tandem*), mostraram que apesar do domínio N-terminal e o peptídeo *linker* contribuírem para a potência em termos de morte de células T, é o domínio C-terminal (CRD-II) o fator determinante tanto para potência de morte celular quanto para processos como o reconhecimento de receptores celulares, como acontece na hemaglutinação, e *triggering* de vias de morte celular.⁷⁵ Além disto, a resposta hemaglutinante observada na **Figura 11** para a proteína inteira é distinta daquela oriunda do domínio CRD-II, o que sugere que o processo de hemaglutinação na HGal-4 não é ditado apenas por esse CRD.

Figura 11 - Testes de hemaglutinação em diferentes concentrações de proteínas. Verifica-se que CRD-I não possui atividade hemaglutinante, enquanto que CRD-II hemaglutina nas concentrações entre 5 e 10 μM com uma dependência de concentração. A HGal-4 exibe atividade aglutinante entre as concentrações de 0,31 e 10 μM .

Fonte: Elaborada pela autora.

Realizamos também um ensaio de hemaglutinação na presença de um ligante β -galactosídeo, a lactose, e um açúcar não-ligante, a sacarose, testando assim a competição entre os açúcares simples (ligantes ou não) com os glicanos na superfície das hemácias pelos sítios de ligação de carboidratos na estrutura proteica. Os resultados estão mostrados na **Figura 12**. Mantendo-se a concentração de cada proteína constante a 10 μM e titulando-se carboidratos na concentração inicial de 100 mM, observamos que, para o domínio CRD-II e HGal-4, a presença de sacarose não afeta o processo de hemaglutinação (**Figura 12a**). Este transcorre normalmente, mostrando que sacarose, como esperado, não compete com os glicanos das hemácias pelos sítios de ligação. Já na presença de lactose, a hemaglutinação é inibida nas concentrações de lactose de 50 e 100 mM. A inibição com lactose ocorre uma vez que os CRDs se ligam à lactose e não aos glicanos presentes na superfície das hemácias. Desta forma, observamos a deposição de hemácias no fundo do poço. Para concentrações de lactose

inferiores a 50 mM parece não haver lactose suficiente para a total inibição de atividade lectínica, ficando o CRD disponível para formação de redes que levam à hemaglutinação.

Inusitadamente, o domínio CRD-I na concentração de 10 μ M, que não havia apresentado atividade hemaglutinante anteriormente (**Figura 11**), com a titulação de lactose ou sacarose passa a apresentar tal atividade. No caso da lactose, somente em concentrações mais baixas de açúcar houve aglutinação (6,25, 3,12 e 1,56 mM) e, para a sacarose, a hemaglutinação ocorreu em todas as concentrações desse açúcar. Este dado sugere, que de alguma forma, certa quantidade de ligante específico ou não, favorece interações inespecíficas entre subunidades CRD-I, tornando-o lectinicamente ativo. A titulação do domínio CRD-I com lactose mostra que em altas concentrações deste açúcar o processo aglutinante não acontece. Entretanto, dado o resultado da **Figura 11** em que CRD-I não teve atividade na ausência de ligantes, é possível inferir que a falta de atividade observada para altas concentrações de lactose se deve à incapacidade do domínio de se oligomerizar e se ligar aos glicanos das hemácias e/ou ao fato do sítio de ligação do açúcar na proteína estar ocupado por lactose. Ambas as situações explicariam a inexistência de hemaglutinação como mostrado na **Figura 12**. Isto sugere que, no caso do CRD-I em estudo, a lactose deva estar ligada à proteína, mas que ainda assim não estejam se formando as estruturas oligoméricas que levam à multivalência da proteína com a consequente formação das estruturas em rede pela ligação com os glicanos nas superfícies das hemácias.

Na **Figura 12**, mais uma vez observamos o comportamento distinto de cada um dos domínios CRDs, desta feita sugerindo diferentes afinidades ou pelo menos diferentes mecanismos de ligação tanto à lactose quanto à sacarose. Foram necessárias altas concentrações de carboidrato para observarmos a inibição da atividade lectínica das proteínas aqui em estudo, dessa forma, indicando que as afinidades por açúcares simples deve ser baixa.

(a)

(b)

Figura 12 - Teste de hemaglutinação com concentração de proteína constante a 10 μ M e com titulação de lactose ou sacarose. (a) Titulação com sacarose. A hemaglutinação ocorreu em todas as concentrações de sacarose para as três proteínas; (b) Titulação com lactose. A atividade hemaglutinante de CRD-II e HGal-4 foi inibida nas concentrações de 50 e 100 mM de lactose e o CRD-I exibe atividade na presença de baixa concentração de lactose.

Fonte: Elaborada pela autora.

1.4.4 Interação proteína-ligante: dissecando mudanças conformacionais

1.4.4.1 Avaliação da estrutura secundária

Os resultados de hemaglutinação apresentados na seção anterior ensejam uma discussão acerca de quais seriam os fatores estruturais (mudanças conformacionais) determinantes do comportamento dos domínios CRDs e de HGal-4 frente à lactose e à sacarose. Sendo assim, iniciamos os estudos de correlação estrutura-função causados pela interação proteína-ligante pela técnica de Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD), mais especificamente, de CD na região espectral do UV-distante (180-250 nm). Através dos espectros de CD nessa região, é possível monitorarmos mudanças conformacionais e estimarmos conteúdos de estruturas secundárias existentes na estrutura proteica.⁷⁶

Os espectros de CD a 20°C dos domínios CRD-I e CRD-II e da HGal-4 (**Figura 13**) são característicos de proteínas com estrutura secundária majoritariamente do tipo folhas- β , com um amplo pico negativo em torno de 216 nm e um pico positivo em torno de 200 nm. De fato, a partir das estruturas tridimensionais dos domínios separados (**Figura 6**), nota-se que estas são majoritariamente formadas por folhas- β (cerca de 40%).

Figura 13 - Espectros de CD convencional na região do UV distante obtidos para CRD-I (—), CRD-II (—) e HGal-4 (—) a 20°C. Espectros característicos de proteínas majoritariamente compostas por folhas- β : largo pico negativo em torno de 216 nm e um pico positivo em torno de 200 nm.

Fonte: Elaborada pela autora.

A técnica de CD apresenta limitações no que se refere aos estudos de proteínas do tipo folha- β , já que os espectros de CD (que refletem a atividade ótica) de estruturas em folhas- β , ao contrário daqueles obtidos para estruturas helicoidais, dependem fortemente da orientação de fitas vizinhas (folhas paralelas ou antiparalelas), do grau de torções e de variações no comprimento dessas folhas- β .⁷⁷ A **Figura 14** retirada da referência ⁷⁷ mostra claramente a menor variação de espectros de CD de proteínas majoritariamente helicoidais em comparação com proteínas contendo significativas porções de folhas- β . Na literatura é reportado que eventos importantes relacionados a estruturas em folhas- β , voltas- β e *loops* se refletem mais claramente nos espectros de CD não na região do UV-distante (região mais convencional de medida e acessível em equipamentos de bancada), mas sim na região de baixos comprimentos de onda entre 175 e 208 nm, denominada de UV-vácuo.⁷⁸ Assim, mudanças conformacionais associadas com atividade ótica nessa região somente podem ser acessadas usando-se fontes de luz de altas energias capazes de produzir maior fluxo de fótons naquele intervalo de comprimentos de onda, como é o caso de fontes de radiação síncrotron.⁷⁹

Figura 14 - Espectros de SRCD de proteínas ricas em estrutura α -hélice e folha- β do banco de dados de CD SP175. Os espectros de SRCD mostrados são provenientes de proteínas contendo (a) $\sim 50\%$ α -hélices, onde os espectros são bem similares uns aos outros enquanto, (b) proteínas contendo $\sim 50\%$ folha- β , com baixo teor helicoidal, apresenta espectros variados.

Fonte: Adaptada de MICSONAI⁷⁷

A extensão dos experimentos para regiões de maior energia com a medida da atividade óptica associada é a base da variação metodológica conhecida como SRCD (do inglês *Synchrotron Radiation Circular Dichroism*). A SRCD tem sido empregada com sucesso quando se busca aumentar a resolução dos espectros convencionais de CD para além da distinção entre estruturas em hélice e não-hélice. A capacidade de se alcançar menores comprimentos de onda torna possível o acesso a transições eletrônicas adicionais e, conseqüentemente, a maiores informações como, por exemplo, a distinção entre mais tipos de estrutura secundária e outros motivos estruturais.⁷⁹ Alguns exemplos que constam na literatura mostram que SRCD tem sido utilizado no estudo de sistemas complexos tais como proteínas de membranas^{80, 81}, sendo uma alternativa mais viável do que NMR e cristalografia quando não se busca a determinação da estrutura proteica, mas sim mudanças conformacionais durante o processo de interação proteína-ligante⁸² e/ou estabilidade estrutural de mutantes.⁸³ Entretanto, nos casos estudados até o momento percebemos a falta de situações em que proteínas predominantemente constituídas por estruturas em folhas- β sejam o alvo da investigação. Aqui reside caráter metodológico diferenciado do presente trabalho centrado no uso da técnica de SRCD e na determinação de alterações conformacionais em proteínas contendo significativo percentual de folhas- β que não seriam detectadas ao usarmos apenas o método de CD convencional.

Dessa forma, medidas de SRCD foram realizadas com o intuito de buscar informações relevantes ao nosso sistema. A **Figura 15** abaixo mostra os espectros de SRCD das proteínas CRD-I, CRD-II e HGal-4. Os resultados claramente evidenciam uma das vantagens do uso da técnica de SRCD que reside na referida extensão do intervalo de medida que, no nosso caso, chegou até 185 nm (que se deve comparar com o alcance das medidas de CD convencional em torno de 200 nm para as medidas aqui mostradas). Com isto, imediatamente é possível observarmos que os espectros são diferentes e que a composição e/ou o arranjo de estruturas secundárias são distintos.

Figura 15 - Espectros de SRCD obtidos para CRD-I (—), CRD-II (—) e HGal-4 (—) a 20°C. A área em cinza destaca a região abaixo de 200 nm, onde estão as principais diferenças entre as estruturas secundárias das proteínas em estudo.

Fonte: Elaborada pela autora.

Comparando-se os domínios CRD entre si através do alinhamento sequencial, temos 30% de identidade na sequência de aminoácidos e, pelo alinhamento da estrutura 3D (utilizando a ferramenta online *TM align* ⁸⁴), temos 90% de correspondência entre as estruturas. Isto mostra que a espectroscopia de SRCD foi capaz de distinguir os 10% de diferença estrutural entre os domínios e que essa disparidade surge de diferenças entre comprimento, ângulo e torções de fitas, voltas- β e/ou *loops* ou ainda do arranjo tridimensional adotado por tais estruturas secundárias, características que são claramente observadas na região alcançada por SRCD (área em destaque na **Figura 15**).

Na **Figura 15**, podemos observar também que o espectro da HGal-4 parece ser basicamente uma combinação dos espectros individuais dos domínios CRD-I e -II. Portanto, assumindo a hipótese de que o espectro de HGal-4 seja a soma dos espectros individuais dos domínios e perfazendo tal operação, observamos que o resultado não reproduz o espectro experimental da HGal-4 (**Figura 16**). A subtração entre o espectro da HGal-4 e aquele obtido pela soma dos espectros dos CRDs (linhas pontilhadas na **Figura 16**) mostra a contribuição oriunda do peptídeo de ligação, que não está presente em nenhum dos domínios separadamente. O espectro de CD atribuído ao peptídeo de ligação não pode ser associado com nenhum espectro padrão de CD, o que sugere que essa região não possui estrutura

secundária organizada e/ou apresenta alta flexibilidade experimentando diversas conformações não detectáveis em face da falta de resolução temporal do método.

Figura 16 – Análise da diferença dos espectros de SRCD da HGal-4 e dos domínios CRDs. Espectro de SRCD da HGal-4 (—), soma teórica dos espectros dos domínios CRDs (—) e a subtração dos espectros de HGal-4 e a soma dos espectros dos domínios CRDs (--).

Fonte: Elaborada pela autora.

Através da desconvolução dos espectros de CD é possível estimarmos a composição de estrutura secundária em proteínas.^{85, 86} Esta análise é conveniente principalmente para proteínas que não tiveram sua estrutura tridimensional resolvida. No caso, dispomos das estruturas dos domínios CRDs separadamente, mas não da proteína integral HGal-4. Uma das ferramentas mais utilizada para este fim é o servidor online *DichroWeb*⁸⁷, que retorna os valores mostrados na **Tabela 3** para os conteúdos de estrutura secundária das proteínas em estudo nesta tese. Observamos que o(s) método(s) utilizado por essa plataforma produz(em) ajustes (curvas) teóricos coerentes com os espectros experimentais (curvas não mostradas). Entretanto, “falha” na estimativa de estrutura secundária para nossas proteínas, principalmente em relação à predição de estrutura helicoidal. Ou seja, nos retornam resultados incoerentes com os dados estruturais dos domínios separados (lembrando que a porcentagem de α -hélice estimada pela estrutura 3D dos domínios CRDs é de aproximadamente 3%). Isto também é observado ao se usar outros métodos de desconvolução, já que a maioria deles usa uma forma de decomposição vetorial para estimar os conteúdos de estrutura secundária e, ao

fazer isto, assume uma base vetorial composta por espectros de CD de proteínas cujas estruturas tridimensionais são conhecidas. Nessas bases, percebe-se a falta de proteínas com alto teor de estruturas- β ou de misturas de estruturas α/β , o que leva à menor eficiência dos métodos nesses casos.

Tabela 3 - Determinação experimental de composição de estrutura secundária dos domínios CRD e HGal-4. Desconvolução dos espectros de SRCD utilizando a ferramenta *DichroWeb* ⁸⁷.

	α -hélice	folhas- β	voltas	outros	NRMSD
CRD-I	7%	46%	10%	37%	0,028
CRD-II	6%	46%	10%	39%	0,014
HGal4	7%	49%	9%	34%	0,017

Fonte: Elaborada pela autora.

Mais recentemente, foi lançada a ferramenta, também online, chamada *β -Structure Selection (BeStSel)* que é destinada à estimativa de estrutura secundária levando-se em conta a heterogeneidade de estruturas- β .⁷⁷ Portanto, desconvoluindo-se os espectros de SRCD utilizando *BeStSel*, foi possível obtermos ajustes teóricos dos espectros experimentais de excelente qualidade (**Figura 17**) e, assim, estimarmos as composições de estrutura secundária para cada proteína de forma mais adequada (**Tabela 4**). Assim, temos que o *BeStSel* faz uma predição de α -hélice muito mais próxima da estrutura 3D do que o *DichroWeb* para nosso sistema. O parâmetro NRMSD (desvio quadrático médio normalizado, do inglês *normalized root mean-square deviation*) é um parâmetro de qualidade de ajuste dos espectros, sendo que valor menor que 0,1 indica que o espectro calculado corresponde bem ao experimental.^{87, 88}

Os valores mostrados na **Tabela 4** indicam que as principais diferenças encontradas entre os domínios isolados residem na quantidade de folhas- β e de estruturas que o programa chama de outros e que incluem 3_{10} -hélice, hélice- π , *loops* irregulares, pontes- β , *bends* e regiões desordenadas da estrutura proteica.⁷⁷ A comparação entre as estruturas dos domínios (**Figura 6**) leva a cerca de 90% de identidade (sobreposição) de tais estruturas. A análise conjunta desses resultados sugere, portanto, que deva haver regiões do domínio CRD-I que experimentam maior dinâmica conformacional quando em solução (nas condições do

experimento de SRCD), provavelmente atrelada à maior flexibilidade de porções da estrutura, como *loops* irregulares ou *bends*, sofrendo transições estruturais que resultam, em média, nos conteúdos de estrutura secundária apresentados na tabela. Essa diferença pode ser a responsável por distintas respostas dos domínios à ligação com ligantes observada nos ensaios de hemaglutinação. Quando combinados para formar a estrutura de HGal-4 completa, em que é incluído ainda o peptídeo *linker*, vemos que o percentual de elementos de estrutura secundária de HGal-4 fica bastante similar ao que é obtido para o domínio CRD-II, indicando que a composição com o *linker* e o arranjo global adotado provavelmente trazem o domínio CRD-I para uma conformação também mais próxima àquela do CRD-II.

Figura 17 – Espectros de SRCD experimental e teórico calculados pelo *BeStSel*: para CRD-I (—), CRD-II (—) e HGal-4 (—).

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 4 - Determinação experimental de composição de estrutura secundária dos domínios CRD e HGal-4. Desconvolução dos espectros de SRCD utilizando a ferramenta *BeStSel* ⁷⁷.

	α -hélice	folhas- β	voltas	outros	NRMSD
CRD-I	3%	39%	15%	43%	0,022
CRD-II	5%	55%	11%	29%	0,011
HGal4	5%	56%	9%	30%	0,011

Fonte: Elaborada pela autora.

Mudanças conformacionais em consequência da ligação de uma proteína com um ligante é parte essencial do ciclo funcional da proteína. Neste contexto, medidas de CD (convencional e por radiação síncrotron) na presença de ligantes foram realizadas. Os espectros de CD convencional correspondem aos espectros até o comprimento de onda de 200 nm (parte não rachurada da **Figura 18**). Mais uma vez, não foi possível observarmos alterações significativas nos espectros de CD convencional na presença de carboidratos para nenhuma das proteínas.

Para acessarmos as regiões onde se distinguem mais claramente mudanças associadas a elementos de estrutura- β e voltas, recorreremos novamente aos experimentos de SRCD. Os espectros de SRCD de cada proteína na ausência e na presença de lactose ou sacarose são apresentados na **Figura 18**. Observamos que em todas as condições analisadas, as maiores mudanças conformacionais devido à interação com o carboidrato são encontradas na região abaixo de 200 nm (parte em cinza na **Figura 18**) e os picos em torno de 190 e 200 nm indicam que as estruturas que estão sendo mais afetadas com esta interação são as voltas- β e os *loops*.

Para o domínio CRD-I (**Figura 18a**) na presença de carboidratos os espectros se diferem na intensidade do pico positivo em 200 nm e “ombros” na região de 190 nm, comparado à conformação apo (em preto). Isto mostra que ambos os açúcares, lactose e sacarose, interagem e perturbam a estrutura secundária da proteína. No entanto, a maior diferença se dá com a ligação da lactose (em vermelho), provavelmente, devido à afinidade por açúcares do tipo β -galactosídeo. O “ombro” em torno de 190 nm, que mantém a mesma forma que na conformação apo, juntamente com a variação de intensidade do pico em 200 nm, mostra que existe uma interação não-específica com a sacarose (em azul). Já nos espectros do domínio CRD-II, não observamos diferenças na presença dos carboidratos (**Figura 18b**). Isto sugere que a presença de ligantes não afeta de forma significativa as estruturas secundárias do CRD-II, o que está de acordo com as estruturas cristalográficas reportadas para esse domínio em sua forma apo e na presença de lactose⁵¹, nas quais se vêem apenas sutis modificações quando na presença dos ligantes. Nos espectros de SRCD da proteína HGal-4 (**Figura 18c**) notamos também diferenças espectrais na presença dos açúcares. Pelos espectros dos domínios, possivelmente, as principais perturbações na estrutura secundária são oriundas das interações do ligante com o domínio CRD-I.

(a)

(b)

(c)

Figura 18 - Espectros de SRCD das proteínas (a) CRD-I. (b) CRD-II e (c) HGal-4 na conformação apo (—), na presença de lactose (—) e na presença de sacarose (—).

Fonte: Elaborada pela autora.

Para quantificarmos as mudanças descritas qualitativamente no parágrafo anterior, procedemos com a desconvolução dos espectros da **Figura 18** utilizando o algoritmo *BeStSel* e os resultados estão mostrados na **Tabela 5**. Vemos que, como esperado em face da semelhança entre os espectros, as variações nos conteúdos de estrutura secundária do domínio CRD-II são mínimas quando da adição dos ligantes. Para o domínio CRD-I, há uma clara diminuição dos conteúdos de *turns* e outras estruturas (como *loops*) e o concomitante crescimento da proporção de folhas- β na presença dos ligantes, o que indica que a ligação em sítios específicos e/ou não-específicos (fora do sítio de ligação descrito para CRD-I) leva a uma diminuição da flexibilidade global do domínio e consequente estruturação em folhas- β . Fica mais uma vez evidente que os domínios, além de apresentarem diferentes arranjos de suas estruturas secundárias (provavelmente associados a variações em *bendings* e *twists* de suas folhas- β), também se distinguem pela resposta estrutural frente à ligação com açúcares, o que concorda com os dados de resposta funcional de suas atividades lectínicas reportados na **Figura 12**.

Para a proteína inteira HGal-4, vemos que seu comportamento em relação a mudanças estruturais na presença de ligantes como reportadas pelo conteúdo de estrutura secundária não corresponde ao comportamento de nenhum dos domínios tomados isoladamente, o que está de acordo tanto com os resultados de hemaglutinação apresentados na **Figura 12** quanto com os de SRCD mostrados na **Figura 16**, sugerindo, assim, a participação efetiva do peptídeo *linker*. Há uma pequena variação no conteúdo de α -hélices e de *turns*. Variação maior é observada nos conteúdos de folhas- β (que diminui de 56% na forma apo para 49% e 44% com adição de lactose e sacarose, respectivamente) e outras estruturas (que cresce de 30% para 35% e 42% na presença de lactose e sacarose, respectivamente). Levando em conta que o algoritmo *BeStSel* contabiliza como outras estruturas contribuições oriundas de regiões desordenadas, *loops* e *bends*⁷⁷, tais variações sugerem que os ligantes levam a uma mudança conformacional em que a proporção de estruturas mais ordenadas é diminuída e a de estruturas mais flexíveis, aumentada.

Tabela 5 - Determinação experimental de composição de estrutura secundária dos domínios CRDs e HGal-4 na ausência e presença de lactose e sacarose. Desconvolução dos espectros de SRCD utilizando a ferramenta *BeStSel*⁷⁷.

		α -hélice	folhas- β	turns	outros	NRMSD
CRD-I	Apo	3%	39%	15%	43%	0,022
	+lac	5%	48%	10%	37%	0,012
	+suc	5%	58%	9%	28%	0,008
CRD-II	Apo	5%	55%	11%	29%	0,011
	+lac	4%	54%	11%	31%	0,014
	+suc	2%	54%	12%	32%	0,013
HGal-4	Apo	5%	56%	9%	30%	0,011
	+lac	6%	49%	10%	35%	0,015
	+suc	3%	44%	11%	42%	0,020

Fonte: Elaborada pela autora.

1.4.4.2 Avaliação da estrutura terciária

Uma estratégia para estudos da estrutura terciária de proteínas por métodos biofísicos se baseia no monitoramento da resposta à radiação eletromagnética por parte dos resíduos de aminoácidos com cadeias laterais aromáticas. Em particular, são métodos adequados a espectroscopia de CD na região do UV-próximo (260-320 nm), que se vale da presença na estrutura proteica de resíduos com atividade óptica como tirosina (Tyr), triptofano (Trp) e fenilalanina (Phe), e a espectroscopia de fluorescência, majoritariamente centrada em resíduos de Trp, quando presentes. Cabe lembrar que HGal-4 possui três resíduos de Trp: dois deles no domínio CRD-I (Trp71 e 84) e um no domínio CRD-II (Trp256) (**Figura 19**). Além disso, em cada CRD, um desses Trps está entre os resíduos envolvidos na ligação com carboidrato, permitindo-nos monitorar o sítio de ligação através das técnicas supracitadas.

Figura 19 – Estrutura tridimensional dos domínios CRDs com os resíduos de triptofanos em destaque. São mostrados os resíduos (a) Trp71 e 84 no domínio CRD-I e (b) Trp256 no CRD-II.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os espectros de fluorescência foram adquiridos excitando-se a amostra em 295 nm de forma a selecionar os resíduos de Trp das proteínas (**Figura 20**). Com a titulação de sacarose às três proteínas em estudo (coluna da esquerda na **Figura 20**), observamos um decréscimo na intensidade dos espectros de fluorescência que, levando-se em conta o fato de sacarose não ser um ligante dos CRDs, poderia ser devido a mudanças na viscosidade do meio que levariam a um alargamento espectral oriundo do *tumbling* mais lento das moléculas proteicas na solução com açúcar. Não são percebidos deslocamentos nos máximos de emissão, o que sugere que a sacarose não se liga ao sítio de ligação canônico dos CRDs em nenhum caso.

Na titulação com lactose (**Figura 20** coluna à direita), observamos que os espectros de emissão dos domínios CRD-I e CRD-II isolados (**Figura 20a** e **b**, respectivamente) apresentaram comportamento qualitativo similar àquele observado para HGal-4 (**Figura 20c**): espectro de emissão da proteína com um pico máximo em 350 nm sofre um deslocamento para menores comprimentos de onda, concomitantemente com uma diminuição na intensidade de fluorescência. O deslocamento da banda indica que o resíduo de Trp, na presença da lactose, experimenta um ambiente mais hidrofóbico (menos polar), ou seja, mostra que a lactose está ligada à proteína. É importante salientar que a diminuição da intensidade de emissão neste caso pode advir tanto da alteração de viscosidade do meio, como visto para sacarose, quanto da mudança no rendimento quântico de fluorescência dos Trps na presença do ligante lactose.

Figura 20 - Espectros de Fluorescência intrínseca das proteínas (a) CRD-I, (b) CRD-II e (c) HGal-4 com titulação de sacarose (colunas da esquerda) e lactose (colunas da direita).

Fonte: Elaborada pela autora.

Uma maneira de quantificarmos as alterações observadas na **Figura 20** se baseia no uso do chamado centro de massa espectral (CM), onde o espectro é considerado como um todo e não somente o máximo de emissão. Considerando o centro de massa espectral, calculamos o grau de dissociação α , dado por: $\alpha = \frac{\sum_i v_i F_i}{\sum_i F_i}$, onde v_i é o número de onda dado por $1/\lambda_i$ (cm^{-1}), F_i é a intensidade de fluorescência em v_i e $\sum F_i$ é o somatório da intensidade de fluorescência em todos os comprimentos de onda.⁸⁹ Procedendo desta maneira, vemos na **Figura 21** as isotermas de ligação de lactose aos domínios CRDs e à HGal-4 que, após ajuste, permitiram a determinação das constantes de dissociação (K_d) para cada caso. Logo, os K_d s encontrados foram $K_d = 0,4$ mM para CRD-I, $K_d = 0,35$ mM para CRD-II e $K_d = 2$ mM para HGal-4, valores consistentes com o encontrado na literatura.⁵⁴

Os valores de K_d similares obtidos para os domínios isolados sugerem que os sítios de ligação de lactose apresentam estrutura local semelhantes nos domínios e que, portanto, as alterações nos conteúdos de estrutura secundária obtidas dos experimentos de SRCD (**Figura 18** e **Tabela 5**) devam acontecer em regiões dos domínios que não são adequadamente reportadas pelos resíduos de Trp cuja fluorescência foi usada na determinação de K_d . Já para a proteína HGal-4 vemos que o valor de K_d obtido é maior do que aquele observado para os domínios isolados, o que indica que a lactose se dissocia mais de HGal-4 do que dos domínios isolados. Os conteúdos de estrutura secundária obtidos dos experimentos de SRCD (**Tabela 5**) mostram que, na presença lactose, o percentual de folhas- β é diminuído e aquele associado a estrutura menos ordenadas (ou mais flexíveis) como *turns* e “outros” é aumentado. Este aumento de regiões sofrendo mudanças conformacionais aparentemente rápidas e que pode ser interpretado como um aumento de desordem pode ser a causa da maior dissociação de lactose da estrutura de HGal-4. A presença do peptídeo *linker* deve também contribuir para a maior flexibilidade da proteína como um todo.

(a)

(b)

(c)

Figura 21 - Gráficos da variação do centro de massa espectral *versus* concentração de lactose das proteínas: (a) CRD-I, (b) CRD-II e (c) HGal-4.

Fonte: Elaborada pela autora.

Outro método que permite a investigação da estrutura terciária e de possíveis interações de uma proteína através do uso de propriedades físicas de seus resíduos aromáticos é a técnica de CD realizada na região do UV-próximo. Embora modelos teóricos para determinação das contribuições de resíduos aromáticos ao espectro de CD no UV-próximo ainda não estejam totalmente disponíveis, vários resultados que permitem associar as diversas regiões do espectro a resíduos específicos já foram reportados.⁹⁰⁻⁹² Tais resultados mostram que, na região do UV-próximo, cada aminoácido tende a ter os seguintes perfis espectroscópicos: o Trp apresenta um pico em torno de 290 nm com uma estrutura fina entre 290 e 305 nm; a Tyr possui um pico entre 275 e 282 nm, com um pequeno “ombro” que pode ser sobreposto pela banda de Trp; a Phe possui um pico entre 255 e 270 nm (**Figura 22**). A

forma e a magnitude dos espectros dependem da quantidade de resíduos aromáticos, disposição espacial, mobilidade e a natureza do micro-ambiente de cada resíduo.⁹³

Figura 22 - Espectro de CD na região do UV-próximo da proteína dehidroquinase tipo II. O gráfico mostra os picos característicos correspondentes aos resíduos aromáticos de Phe, Tyr e Trp.

Fonte: Adaptada de KELLY⁹³

De uma maneira geral, os espectros de CD no UV-próximo dos domínios CRDs e de HGal-4 apresentam as mesmas bandas resultantes da atividade óptica de seus resíduos aromáticos (**Figura 23**): uma banda primordialmente positiva com um pico em torno de 265 nm e provavelmente oriunda dos resíduos Phe; outra banda positiva em torno de 295 nm, atribuível aos resíduos de Trp, e que assume o valor máximo dos espectros em boa parte das situações; e entre essas duas bandas, há uma região que assume valores negativos ou próximos a zero (na maior parte das vezes também sendo o menor valor do espectro), oriunda de contribuições dos resíduos de Tyr.

O domínio CRD-I possui 2 Trp, 9 Tyr e 12 Phe e, pelos resultados de CD no UV próximo (**Figura 23a**), observamos que os espectros se diferenciam, ligeiramente, em sua forma e em sua magnitude na presença de lactose ou sacarose quando comparados à forma apo. Na presença dos açúcares, percebemos uma melhor definição tanto do pico centrado em torno de 265 nm quanto do ombro à sua esquerda. A melhor resolução de picos normalmente se dá pela interação entre éxcitons, que nessa região correspondem a transições dos resíduos de Phe. Isto indica que na presença do açúcar, alguns dos resíduos de Phe são colocados em maior proximidade, aumentando a chance de que interajam. Considerando que a maior parte

dos resíduos de Phe está localizada na região entre as folhas- β , podemos atribuir essas mudanças espectrais a um rearranjo (ou acomodação) global da estrutura da proteína na presença de ambos os carboidratos. Exceto pela mudança em magnitude, a região do espectro correspondente aos resíduos de Tyr basicamente não é alterada pela presença dos ligantes. Na região associada à atividade óptica dos dois resíduos de Trp (Trp71 localizado no *loop* que conecta as fitas S4-S5 e Trp84 no sítio de ligação, **Figura 19a**), o espectro de CRD-I na presença de sacarose apresenta uma estrutura fina retratada como ombro de baixa intensidade acima de 300 nm. Esse ombro na presença de sacarose sugere que os 2 resíduos de Trp no CRD-I se aproximam com a ligação desse açúcar, provavelmente o Trp presente no *loop* (região mais flexível) se aproxima do sítio de ligação, indicando que a presença da sacarose altera a conformação terciária da proteína de forma a favorecer interações não específicas. Tal alteração espectral não aparece quando na forma apo e nem quando da adição de lactose, o que mostra a alta especificidade do sítio de ligação com a lactose, sem causar grandes perturbações no resíduo de Trp do *loop*. Como mostrado nos testes de hemaglutinação, em certas concentrações de açúcar, independentemente do tipo, o domínio CRD-I passa a ter atividade lectínica e tal perturbação (causada pela presença desses açúcares) está refletida na forma de alterações tanto nos espectros de CD no UV-distante como no UV-próximo. Contudo, a presença de sacarose ou lactose promove um rearranjo estrutural como um todo e sacarose parece perturbar a proteína de forma não específica, o que sugere um mecanismo de interação distinto daquele observado para lactose, o que concorda com os resultados de fluorescência intrínseca dos resíduos de Trp (**Figura 20**), nos quais lactose claramente desloca a banda no espectro de emissão de Trp e sacarose não, e com as alterações reportadas nos espectros de SRCD (**Figura 18 e Tabela 5**), onde vemos que sacarose leva a percentuais de folhas- β e “outros” diferentes de lactose. Ainda, essas mudanças conformacionais na estrutura terciária do domínio CRD-I na presença de sacarose podem estar favorecendo também contatos inter domínios, o que explicaria a oligomerização e atividade aglutinante observada nos experimentos de hemaglutinação.

(a)

(b)

(c)

Figura 23 - Espectros de CD UV-próximo das proteínas (a) CRD-I. (b) CRD-II e (c) HGal-4 na conformação apo (—), na presença de lactose (—) e na presença de sacarose (—).

Fonte: Elaborada pela autora.

O domínio CRD-II possui menos resíduos aromáticos comparado a CRD-I: 1 Trp, 4 Tyr e 11 Phe. De maneira geral, o espectro da proteína na forma apo e aquele obtido na presença de sacarose apresentam características similares e que são distintas daquelas observadas quando da adição de lactose (**Figura 23b**). Isto indica que lactose é capaz de induzir maiores alterações no arranjo tridimensional do CRD-II do que sacarose. Por possuir somente um resíduo de triptofano (Trp256, **Figura 19b**), exatamente aquele que participa da ligação ao carboidrato, a mudança espectral é notória na presença de lactose com aumento na intensidade do pico em torno de 295 nm, o que está de acordo com os resultados de fluorescência intrínseca do Trp mostrados na **Figura 20**. Como esperado a partir desses mesmos dados de fluorescência, sacarose não é capaz de alterar essa banda, indicando pouca perturbação ao sítio de ligação no CRD. O aparecimento da banda em 295 nm indica que a mesma banda observada no espectro do CRD-I deve ter sua origem no resíduo Trp no sítio de ligação daquele domínio. Na região associada aos resíduos de Phe, vemos uma perda de resolução dos picos após adição de sacarose, sugerindo uma mudança na distribuição espacial de tais resíduos, mas sem mudanças na magnitude da atividade óptica. A diminuição do pico em ~265 nm induzida por lactose pode indicar uma diminuição de estruturação em torno dos resíduos de Phe. Por fim, a região em torno de 280 nm e que aparentemente pode ser atribuída à contribuição dos resíduos de Tyr e Trp, apresenta um pequeno deslocamento da banda em 280 nm na presença de lactose e a perda, para ambos os ligantes, do ombro em cerca de 285 nm e que estava bem definido no espectro da forma apo. As mudanças observadas nos espectros do CRD-II após adição dos ligantes indicam que a lactose é capaz de alterar o sítio de ligação do açúcar, ao passo que ambos, lactose e sacarose, parecem induzir rearranjos da estrutura proteica como um todo que não puderam ser detectados quando monitoramos apenas alterações na estrutura secundária via SRCD (**Figura 18 e Tabela 5**). De fato, ao alinharmos a estrutura 3D do domínio CRD-II apo com a estrutura CRD-II na presença de lactose (PDB ID [5CBL](#)⁵¹), observamos que há mudanças conformacionais sutis na estrutura, de forma que as fitas e, consequentemente a folha- β , em que o sítio de ligação está contido se rearranjam espacialmente para acomodar a molécula de lactose.

Os espectros de CD no UV-próximo em geral mostram uma resultante da contribuição de todos os resíduos aromáticos presentes na estrutura proteica. Desta forma, os espectros de CD UV-próximo da HGal-4 (**Figura 23c**) nada mais são do que as contribuições de todos os resíduos aromáticos de CRD-I e CRD-II somadas à de uma tirosina que se encontra no peptídeo de ligação entre os domínios (3 Trp, 14 Tyr e 23 Phe). A forma do espectro de HGal-

4 apo apresenta maior similaridade com a forma do espectro do domínio CRD-II apo, o que sugere que, apesar de ter menos resíduos aromáticos, parece ser o CRD-II aquele que mais contribui para a atividade óptica geral da proteína inteira, o que concorda também com os resultados de SRCD que mostram percentuais de estrutura secundária do domínio CRD-II mais próximos daqueles vistos para HGal-4 do que para o domínio CRD-I (**Tabela 5**). Pelo que foi discutido acima, apesar dos domínios responderem de forma distinta à presença dos ligantes, por exemplo, com CRD-I mais suscetível à presença de sacarose do que CRD-II (também visto nos ensaios de hemaglutinação e nos espectros de SRCD) quando analisamos as alterações na estrutura de HGal-4 como um todo frente aos açúcares, fica claro que é a lactose aquele capaz de provocar as mudanças mais significativas (**Figura 23c**) e que tais mudanças acontecem não somente no sítio específico de ligação do açúcar, mas também se distribuem na estrutura proteica como um todo, o que sugere um mecanismo de ligação com efeitos menos pontuais do que inicialmente poderíamos imaginar.

1.4.5 Termodinâmica de interação proteína-ligante

Uma vez determinados os efeitos da presença de açúcares sobre as estruturas das proteínas em estudo, passamos para uma análise da termodinâmica de tal interação. Sendo assim, as afinidades por carboidratos dos CRDs e da proteína integral HGal-4 foram investigadas por calorimetria de titulação isotérmica (ITC) e por termoforese em micro-escala (MST).

Nos experimentos de titulação foram usados os açúcares lactose e sacarose. A titulação com sacarose foi realizada nas mesmas condições que a titulação com lactose (funcionando como controle negativo). As curvas de titulação dos domínios CRDs com lactose (**Figura 24a e b**) exibem um perfil característico de reações exotérmicas. Observamos que cada um dos domínios CRDs possui afinidade por lactose semelhante entre si com K_d da ordem de 0,5 mM, consistente com os dados aqui obtidos por Fluorescência (**Figura 21**). O mesmo comportamento é encontrado para os domínios CRDs independentes da galectina-4 de rato.⁵⁴ No entanto, o ajuste das curvas de titulação com uma função derivada de um modelo termodinâmico de *binding* no equilíbrio da proteína contendo múltiplos sítios idênticos e independentes nos retornou valores para o número de sítios de ligação (n) em torno de 9. Este valor pode ser um indício de uma oligomerização dos CRDs. Uma vez que os experimentos de ITC foram realizados a altas concentrações de proteína (~1,5 mg/mL), interações inespecíficas podem estar sendo favorecidas nessas condições. Na literatura, o número usual

de n reportado para cada domínio CRD interagindo com lactose está entre 1 e 2, alguns exemplos são: $n = 2$ para o domínio N-terminal da galectina-4 de camundongo⁵⁰ e $n = 1$ para galectina-1 bovino e galectina-7 humana⁹⁴. Então, considerando que existem dois sítios por CRD, é possível a formação de oligômeros com quatro unidades de CRD ou até maiores, se consideramos 1 sítio/CRD. Interessantemente, se olharmos com cautela para as estruturas cristalográficas do domínio CRD-II na forma apo e na presença de diversos ligantes, encontramos quatro monômeros na unidade assimétrica⁵¹⁻⁵³, lembrando que as condições para a formação de cristal também ocorrem em altas concentrações (~10 mg/mL), o que pode servir como evidência extra para formação de oligômeros dos domínios. Portanto, os resultados de ITC reforçam a hipótese de interação inespecífica entre os domínios, o que, juntamente com os resultados de hemaglutinação, explicaria a atividade lectínica apresentada pelos domínios CRDs isolados (**Figura 12**).

O ajuste da curva de titulação com lactose na HGal-4 íntegra foi tentado com funções derivadas de distintos modelos termodinâmicos e que incluíram, por exemplo, uma classe de sítios idênticos e independentes (como aquele usado para os domínios isolados), múltiplas classes de sítios idênticos e independentes e múltiplas classes de sítios idênticos e dependentes (cooperatividade). Dentre estes, o que retornou o melhor ajuste teórico foi aquele que assume duas classes de sítios (dois valores de constante de *binding*) independentes. Para a galectina-4 humana interagindo com lactose, determinamos $K_{d1} = 1,3 \mu\text{M}$ e $K_{d2} = 5,2 \mu\text{M}$ (**Figura 24c**). Na literatura não é reportado afinidade de interação HGal-4/lactose, encontramos somente o trabalho descrito por Krejcirikova et al⁵⁰, onde é mostrado a existência de dois sítios de interação com lactose para o domínio N-terminal da galectina-4 de camundongo, encontrando os seguintes valores de K_d : um sítio com maior afinidade ($K_{d1} = 600 \pm 70 \mu\text{M}$) e outro com menor afinidade ($K_{d2} = 28 \pm 10 \text{ mM}$).

Outro resultado inusitado obtido a partir do ajuste da curva de titulação de HGal-4 está no número de sítios em cada classe. Para uma delas, temos um n_1 de 3, e para n_2 um número bastante fora do normal de 42. Apesar de não termos uma explicação para tal discrepância, devemos lembrar que os modelos termodinâmicos têm limitações e que, apesar, do resultado quantitativo ser incerto, a indicação qualitativa da existência de vários sítios (quantidade superior a 2) pode estar correta. Além disso, a combinação baixa afinidade e sítio raso poderia ser um dos fatores para a não determinação exata de n para todas as proteínas em estudo.

(a)

(b)

(c)

Figura 24 - Curvas de ITC de titulação com lactose das proteínas (a) CRD-I, (b) CRD-II e (c) HGal-4.

Fonte: Elaborada pela autora.

Nossos resultados de ITC sugerem que exista uma homodimerização/oligomerização entre os CRDs, provavelmente de forma não covalente, assim como observado para galectina-1 (**Figura 25**). Baseado neste resultado, poderíamos propor um novo modelo de interação entre os domínios CRDs, similar à galectina-1, e, conseqüentemente, uma nova proposta de oligomerização da própria galectina-4. A hipótese de oligomerização tanto dos domínios isolados quanto de HGal-4 explicaria tanto o número de sítios altos obtido do ajuste dos dados de ITC quanto a atividade hemaglutinante dos domínios CRDs. Devemos lembrar que a atividade lectínica de ambos os domínios CRDs seria inesperada, tendo sido favorecida para o domínio CRD-II devido à altas concentrações de proteína (possibilitando a formação de oligômeros) e, muito provavelmente, o efeito para concentrações mais baixas seria o similar ao ocorrido para CRD-I (**Figura 11**).

A observação de resultados (**Figura 11** e **Figura 24**) que reforçam a hipótese de formação de oligômeros dos domínios CRDs e de HGal-4 vai ao encontro do que foi proposto por Yoshida et al.⁹⁵ para galectina-8 humana (também membro do grupo *tandem-repeat*). Baseado em resultados de estruturas cristalográficas, esses autores propõem um modelo similar de oligomerização para a galectina-8 humana, bem como a homodimerização de seu domínio CRD N-terminal (CRD-I). Até o presente momento, a construção da galectina-8 humana utilizada por eles (onde o peptídeo *linker* de 28 aa foi substituído por somente 2 aa) é a única estrutura tridimensional de galectina do grupo *tandem-repeat* (PDB ID [4FQZ](#)).

Figura 25 – Modelo de homodimerização de galectinas. (a) Homodímero da galectina-1 humana (PDB ID [1GZW](#)); (b) Modelo de oligomerização dos domínios CRDs e HGal-4 construído com base nos resultados apresentados no presente trabalho.

Fonte: Elaborada pela autora.

Em face dos resultados inusitados de ITC obtidos para a titulação de galectina-4 íntegra com açúcares, decidimos por utilizar outro método para determinação das constantes de ligação. Este outro método foi a termoforese em micro-escala (MST), uma tecnologia ainda inédita no Brasil. O MST é uma técnica relativamente nova utilizada para o estudo de interações moleculares.^{96, 97} A técnica é baseada no movimento de moléculas em um gradiente de temperatura, fenômeno físico conhecido como termoforese (conhecido também como termodifusão ou efeito Soret⁹⁸) para detectar mudanças na camada de solvatação, carga ou tamanho das moléculas e, então, se medir interações moleculares em condições próximas ao nativo.⁹⁷ O MST é uma técnica simples, requer pouca amostra (alguns microlitros e concentração na ordem de nM), independe do tamanho e/ou massa molecular e a coleta de dados é muito rápida (em torno de 10 min), tendo assim uma grande vantagem sobre outras técnicas como: ressonância plasmônica de superfície (SPR), espectroscopia de fluorescência de correlação (FCS) e calorimetria de titulação isotérmica (ITC).⁹⁶

Os experimentos de MST foram realizados marcando-se as cisteínas nativas das proteínas com o fluoróforo AlexaFluor-647 Maleimida. Desta forma, foi possível determinarmos as constantes de afinidade da galectina-4 humana com dois tipos de carboidratos β -galactosídeos: lactose e N-Acetil-Lactosamina (LacNAc). Foram realizadas triplicatas de cada medida e controle negativo, nas mesmas condições, com titulação de sacarose.

A titulação com lactose na proteína em concentração constante a [HGal-4] = 200 nM resultou em uma constante de dissociação de $K_d = (11 \pm 3)$ mM e a titulação com LacNAc em $K_d = (1,1 \pm 0,2)$ mM (**Figura 26**). Os valores determinados por MST para a interação de HGal-4 com lactose são da mesma ordem de grandeza que os valores aqui obtidos por fluorescência e, em relação a interação com LacNAc, está de acordo com o descrito na literatura⁹⁹.

Figura 26 – Curvas de ligação por MST da proteína galectina-4 humana. Concentração da HGal-4 constante a 200 nM e titulação com: (a) lactose e (b) N-Acetil-Lactosamina.

Fonte: Elaborada pela autora.

1.4.6 Estabilidade Térmica das proteínas

Uma vez que a ligação de carboidrato à proteína e as mudanças causadas na estrutura secundária e terciária de cada uma são conhecidas, podemos analisar também o efeito da ausência/presença de carboidratos na estabilidade térmica das proteínas.

O perfil de desnaturação térmica das proteínas foi construído através do monitoramento da atividade óptica no comprimento de onda de 216 nm no intervalo de temperatura de 20 a 80°C e representado na forma de variação de fração desnaturada (f_D) de proteína, sendo f_D dada por: $f_D = \frac{\theta_T - \theta_N}{\theta_D - \theta_N}$, onde θ_T é a elipticidade da amostra a uma temperatura T , θ_D e θ_N são os valores característicos da elipticidade dos estados desnaturado e nativo, respectivamente. Em todas as medidas com variação de temperatura aqui apresentadas, após o processo de desnaturação, a temperatura da amostra foi diminuída a 20°C e um espectro de CD novamente coletado a fim de se verificar a reversibilidade do processo. Em todos os casos, o espectro obtido após o resfriamento foi diferente do espectro inicialmente medido, indicando que se trata de processo de desnaturação irreversível. Sendo assim, o processo de desnaturação térmica, na ausência/presença de carboidratos, foi tratado como um processo

irreversível de dois estados $N \xrightarrow{k} D$, onde N e D representam os estados nativo e desnaturado da proteína, respectivamente, e k é a constante de reação.

No perfil de desnaturação térmica do domínio CRD-I (**Figura 27a**) observamos um comportamento tipo sigmoidal que passa por uma aparente transição entre dois estados na ausência e na presença de lactose ou sacarose. A temperatura de transição (T_m) na conformação apo e na presença de sacarose é de 60,0°C, enquanto que na forma conjugada com lactose, a T_m é igual a 62,7°C. Desta forma, podemos dizer que a presença de lactose torna o domínio CRD-I mais estável, mostrando, mais uma vez, que a lactose está ligado ao CRD-I.

Os espectros de CD do domínio CRD-II (**Figura 27b**) apresentam um ruído maior devido à presença de 1 mM do agente redutor 2-ME. Tentamos reduzir esta quantidade, porém isto não foi possível devido à baixa estabilidade da proteína na sua ausência. Mesmo com relação sinal-ruído menor, podemos observar que a curva de desnaturação mais uma vez segue um comportamento do tipo sigmoidal. As temperaturas de transição do CRD-II estão em torno de 70°C, independentes da presença e/ou tipo de carboidrato. Devido à baixa relação sinal/ruído, o perfil da desnaturação térmica também se apresenta ruidoso, assim, o erro na determinação dos T_m s, para este caso, aumenta (valores de T_m s indicado por * na **Tabela 6**). As temperaturas de transição altas indicam que este domínio já possui uma estabilidade estrutural térmica bastante alta na conformação apo e que a presença de carboidrato acaba não influenciando nesse parâmetro.

As curvas de desnaturação térmica da HGal-4 são apresentadas na **Figura 27c**. A temperatura de transição para a proteína em solução ficou em torno de 58°C e na presença de lactose houve uma variação na T_m para 61°C, propiciando uma maior estabilidade à proteína. Portanto, a galectina-4 humana em sua forma integral consegue distinguir carboidratos do tipo β -galactosídeos e que a ela conferem uma maior estabilidade conformacional, sendo que nenhuma mudança pode ser notada na presença da sacarose ($T_m \sim 58^\circ\text{C}$). Os valores de T_m determinados para os domínios CRDs e para a proteína integral, bem como a diferença de T_m (ΔT_m) entre a conformação apo e na presença de lactose, encontram-se sumarizados na **Tabela 6**.

(a)

(b)

(c)

Figura 27 – Curva de desnaturação térmica por CD convencional (216 nm) das proteínas (a) CRD-I. (b) CRD-II e (c) HGal-4 na conformação apo (—), na presença de lactose (—) e na presença de sacarose (—).

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 6 - Temperaturas de transição (T_m , °C) dos CRDs e HGal-4 na conformação apo e na presença de lactose ou sacarose, e variação da temperatura de transição (ΔT_m) entre a conformação apo e na presença de lactose. O * nos valores de T_m do CRD-II indicam maiores erros associados à determinação destes.

	apo	+ lactose	+ sacarose	ΔT_m
CRD-I	60,0°C	62,7°C	59,7°C	~3°C
CRD-II	70°C*	72°C*	71*	~*
HGal-4	58,4°C	61,0°C	58,9°C	~3°C

Fonte: Elaborada pela autora.

Além disso, e apesar da pior qualidade da curva de desnaturação obtida para o domínio CRD-II em face da presença do agente redutor 2-ME, podemos dizer que o domínio CRD-I e HGal-4 tem sua estabilidade térmica alterada por lactose, ao passo que o mesmo não acontece para o domínio CRD-II. Ou seja, a presença dos ligantes não parece afetar a estabilidade térmica do domínio CRD-II da mesma forma que não afetou o arranjo e conteúdo de estruturas secundárias como reportado pelos dados de SRCD na **Figura 18b** e na **Tabela 5**.

Além das temperaturas de transição que podem ser facilmente determinadas a partir das curvas de desnaturação, podemos nos valer de um modelo termodinâmico de transições irreversíveis para determinar tanto o valor de T_m quanto da energia de ativação da transição entre o estado enovelado e o desenovelado. Para tanto, usamos que a fração de proteína desnaturada (f_D) depende da temperatura de acordo com a relação $\ln \left[\ln \left(\frac{1}{f_D} \right) \right] = \left(\frac{E_a}{R} \right) \left(\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T} \right)$, onde T_m é a temperatura de transição e E_a é a energia de ativação.¹⁰⁰ Assim, construindo um gráfico do duplo logaritmo natural de f_D contra o inverso da temperatura e usando a equação citada, podemos estimar o valor de E_a e T_m . A partir dos coeficientes angular e linear de cada curva, obtivemos os seguintes valores de E_a e T_m (**Tabela 7**). Os dados da **Tabela 7** mostram primeiramente que os domínios em suas formas apo têm comportamento de desnaturação térmica diferentes tanto no que diz respeito aos valores de T_m (como já havia sido visto na análise qualitativa inicial) quanto nos valores da barreira energética entre os estados nativo e desnaturado. Ademais, vemos que a proteína HGal-4 em sua forma apo e na presença de sacarose apresenta valor de E_a diferente daqueles observados para os domínios isolados, indicando que o peptídeo *linker* desempenha papel estrutural.

Tabela 7 - Parâmetros termodinâmicos obtidos a partir do tratamento das curvas de desnaturação dos domínios CRD-I e CRD-II e da HGal-4 (* indica que o alto erro associado, ** indica que não foi possível obter esses valores).

		E_a (kJ K ⁻¹ mol ⁻¹)	T_m (K)
CRD-I	Apo	420	331,6 (58,6°C)
	+lac	300	334,4 (61,4°C)
	+suc	1085*	331,7 (58,7°C)
CRD-II	Apo	328	339,2 (66,2°C)
	+lac	— **	— **
	+suc	484	342,4 (69,4°C)
HGal-4	Apo	522	329,7 (56,7°C)
	+lac	590	333,2 (60,2°C)
	+suc	406	330,6 (57,6°C)

Fonte: Elaborada pela autora.

Uma segunda análise de estabilidade térmica foi realizada através das desnaturações térmicas por SRCD, a chamada análise de componente principal (PCA, do inglês *Principal Component Analyse*), somente das proteínas na conformação apo. A PCA é uma das técnicas mais populares de análise estatística multivariada e consiste em reduzir a dimensionalidade de um grande conjunto de dados por um número mínimo de variáveis que descrevem o conjunto de dados original sem perder nenhuma informação (maiores informações em Jolliffe¹⁰¹).

A **Figura 28** mostra os espectros de SRCD e, função da temperatura apresentados em 3D para cada uma das proteínas (CRD-I, CRD-II e HGal-4) e a componente f_D proveniente de PCA. Pelas curvas de nível (intensidade e forma dos contornos), podemos inferir regiões que são influenciadas majoritariamente pelo aumento da temperatura. Neste sentido, observamos que as voltas/*loops* (contornos em vermelho em torno de 195 nm) e as folhas- β (contornos em azul em torno de 216 nm) são as estruturas mais afetadas na estabilidade térmica.

Pela curva da variação do valor de f_D em função da temperatura determinada por PCA (**Figura 28** – coluna à direita), verificamos duas transições em cada sistema. Juntamente com os resultados da curva de nível, a desnaturação térmica apresenta duas etapas, sugerindo que cada uma das proteínas não se desenovela unicamente como um todo em um processo de dois estados como poderíamos inicialmente inferir a partir dos dados de CD convencional (**Figura 27**) e, sim, por partes e, muito provavelmente, uma etapa compreenderia o desenovelamento das folhas- β e, a outra, seria a desestruturação das voltas/*loops*. Assumindo que as estruturas em folhas- β , reportada pela atividade óptica em 216 nm (comprimento de onda também alcançado no CD convencional), sejam estruturalmente mais estáveis do que as voltas/*loops*, poderíamos associar a transição em mais baixa temperaturas às voltas/*loops* e aquela em mais alta temperaturas às folhas- β .

Ainda na **Figura 28**, percebemos comportamentos de estabilidade térmica distintos para cada proteína em estudo. O domínio CRD-II é aquele em que a primeira transição é menos evidente, sugerindo que a perda gradual de estruturação de voltas/*loops* e folhas. Para o CRD-I e HGal-4, há claramente duas variações mais abruptas de f_D que identificam as transições estruturais. Mais uma vez fica clara a vantagem de usarmos SRCD sobre CD convencional, já que a extensão do experimento para comprimentos de onda abaixo de 200 nm é que permite a identificação das duas faixas de transição mencionadas, além de possibilitar a percepção de que os domínios respondem de forma distinta à variação de temperatura e tais respostas também não correspondem exatamente ao que é observado para a proteína inteira.

(a)

(b)

(c)

Figura 28 - Análise PCA dos espectros de SRCD das proteínas (a) CRD-I. (b) CRD-II e (c) HGal-4. Coluna da esquerda: gráficos em 3D e curvas de nível dos espectros do desenovelamento térmico; Coluna da direita: transição térmica analisada por PCA.

Fonte: Elaborada pela autora.

1.4.7 Interação proteína e modelos de membrana

A principal função da galectina-4 é reconhecer carboidratos, essencialmente aqueles presente em superfícies celulares, onde participam, direta ou indiretamente, na transdução de sinal celular^{102, 103}, estabilização de *lipids rafts* devido à sua capacidade de *crosslinking*¹⁰⁴⁻¹⁰⁶, bem como recrutar e entregar alguns tipos de proteínas glicosiladas a domínios *rafts*.^{24, 107} Dentro deste contexto, primeiramente, investigamos o processo de ligação carboidrato-galectina em si: mudanças conformacionais/estruturais ocasionadas por tal atividade lectínica e afinidades por alguns ligantes (v. Seções anteriores). O passo seguinte na exploração dos mecanismos de interação relevantes para a função de galectinas é, portanto, a sua interação com açúcares posicionados na superfície celular, dando, assim, um passo adiante na complexidade dos sistemas em estudo. Para tanto, fizemos uso de uma estratégia minimalista em que pudéssemos nos concentrar em poucos aspectos do intrincado processo que rege a interação de uma proteína com membranas celulares. Assim, sistemas miméticos de membranas celulares com composição específica para nossos interesses foram empregados. Além de modelos minimalistas, optamos pelo uso da técnica de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) nesta parte do trabalho, pois este é um método que já se mostrou bastante eficaz em investigações de interações proteína/membrana.^{108, 109}

É descrito na literatura que galectina-4 reconhece e estabiliza domínios *rafts* e se liga a glicoesfingolípídeos contendo galactose 3-O-sulfatados.⁷⁰ *Lipid rafts* são definidos como microdomínios de membrana ordenados consistindo principalmente de glicoesfingolípídeos e colesterol presente na membrana plasmática.^{110, 111} Apesar da controversa existência destes microdomínios, estes originalmente foram propostos para explicar a ordenação/distribuição de proteínas e lipídeos na superfície celular. No entanto, mais recentemente, encontramos dados que relacionam os domínios *rafts* com transdução de sinal¹⁰³ e que descrevem que tais domínios podem ser e/ou conter parte da maquinaria de sinalização que quando ativados por receptores ou outras moléculas, desencadeia a cascata de sinalização.

Assim, a interação galectina-4/membrana foi testada em membranas miméticas de modelos *rafts* PC/SM/Chol contendo diferentes glicoesfingolípídeos. Escolhemos três glicoesfingolípídeos: cerebrosídeo sulfatado (SulfBrain), 3-Sulfo-C24:1 GalCer (SulfGalCer) e gangliosídeo GM1 (GM1). O cerebrosídeo sulfatado e o gangliosídeo GM1 são de fontes naturais, ou seja, são compostos por uma mistura de espécies lipídicas, onde predominam a espécie mostrada na **Tabela 8** abaixo. O 3-Sulfo-C24:1 GalCer é um composto sintético de

alta pureza (> 99%) e sua estrutura também é mostrada na mesma tabela. Os dois primeiros glicolipídeos na referida tabela possuem galactose 3-O-sulfatado ligada à cabeça polar, enquanto GM1 possui uma grande cadeia de carboidrato Gal β 1 $\rightarrow$ 3GalNAc ligada à mesma região. A composição de lipídeos utilizada foi PC/SM/Chol/Glicosf (50:30- x :20: x), onde x equivale à porcentagem dos diferentes glicosfingolipídeos (x variando de 3-5%), de forma a manter a proporção PC/SM/Chol (50:30:20).

Tabela 8 - Glicosfingolipídeos utilizados nas diferentes composições de modelos de membrana. Representação das estruturas químicas das espécies predominantes, no caso dos glicosfingolipídeos naturais.

Glicosfingolipídeos	Estrutura
Cerebrosídeo sulfatado (cérebro de porco) – SulfBrain	<p>Structure of predominant species</p>
3-Sulfo-C24:1 GalCer (sintético) – SulfGalCer
Gangliosídeo GM1 (cérebro de ovino) – GM1	<p>Structure of predominant species</p>

Fonte: Adaptado de AVANTI¹¹²

A **Figura 29** mostra os espectros de RPE de modelos de membrana miméticos de *lipid rafts* na composição PC/SM/Chol (50:30:20) contendo fosfolipídios PC marcados com sonda paramagnética no carbono 5 de sua cadeia acil (5-PC) na ausência e na presença da proteína galectina-4 humana. Nesta composição, a ausência de fosfolipídios com cabeças polares glicosiladas leva a mudanças apenas sutis nos espectros de RPE, indicando que HGal-4 altera pouco a organização dos modelos de membrana com tal composição.

Figura 29 - Espectros de RPE de modelos de membrana miméticos de *lipid rafts* na composição POPC/SM/Chol (50:30:20) contendo fosfolípidios marcados 5-PC na ausência (—) e na presença da proteína HGal-4 (—). A razão proteína:lipídeo utilizada foi de 1:50 e os espectros coletados a 20°C.

Fonte: Elaborada pela autora.

Com a adição do glicosfingolípídeo GM1 à composição mimética dos *lipid rafts*, espera-se que ocorra uma maior interação entre a proteína e os açúcares encontrados na superfície do modelo de membrana. Foram testadas diferentes proporções de GM1 (33,3, 10 e 3%) para verificarmos tanto a formação de vesículas, já que não sabíamos *a priori* se vesículas estáveis se formariam com GM1 presente, quanto a interação/afinidade da proteína com o novo sistema mimético. Os espectros de RPE são mostrados na **Figura 30**. Curiosamente, a adição da HGal-4 à solução de vesículas miméticas de *raft* contendo 33,3 e 10% de GM1 levou a uma precipitação imediata (a precipitação não foi documentada por foto) e os espectros medidos estão mostradas na **Figura 30a** e **b**, respectivamente. Somente para vesículas com 3% de GM1 (**Figura 30c**), a proteína não precipitou. Uma possível causa para este evento é a alta afinidade da proteína HGal-4 pelo GM1, dada à presença do carboidrato complexo na parte polar do esfingosídeo, de forma que ligações do tipo *crosslinking* possam estar ocorrendo num processo similar àquele observado nos experimentos de hemaglutinação. A alta afinidade de HGal-4 por GM1 também é descrita por Ideo et al.¹¹³ Uma alteração na forma de linha quando da adição de HGal-4 a modelos contendo POPC/Chol/GM1 (1:1:1) pode ser vista na **Figura 30a**. Percebe-se na linha de

campo baixo uma pequena, mas significativa, alteração. Nos demais casos, também parece haver alterações, entretanto a pior relação sinal-ruído impossibilita maiores conclusões a respeito.

Figura 30 – Espectros de RPE de modelos de membrana miméticos de *lipid rafts* contendo o fosfolípido marcado 5-PC na ausência (—) e na presença da proteína HGal-4 (—) nas composições: a) POPC/Chol/GM1 (1:1:1); b) POPC/SM/Chol/GM1 (50:20:20:10); c) POPC/SM/Chol/GM1 (50:27:20:3). A razão proteína:lipídeo utilizada foi de 1:50 e os espectros foram coletados à 20°C.

Fonte: Elaborada pela autora.

Prosseguindo com os glicolípídeos, composições miméticas de *lipid rafts* contendo os glicoesfingolípídeos que possuem galactose 3-O-sulfatado adicionados à composição POPC/SM/Chol/Glicosf (50:27:20:3) foram testadas. Embora a HGal-4 não tenha provocado nenhuma precipitação quando adicionada a essas composições e as afinidades por esse tipo de glicolípídeo já terem sido reportadas¹¹³, nenhuma mudança significativa nas linhas espectrais

pode ser observada nos espectros de RPE que reportam a perspectiva da membrana (**Figura 31**).

Figura 31 - Espectros de RPE de modelos de membrana miméticos de *lipid rafts* contendo o fosfolípido marcado 5-PC ausência (—) e na presença da proteína HGal-4 (—) nas composições POPC/SM/Chol/x (50:27:20:3), onde x equivale aos esfingolípídeos: a) SulfBrain e b) SulfGalCer. A razão proteína:lipídeo utilizada foi de 1:50 e os espectros foram coletados à 20°C.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os resultados acima indicam que a sonda magnética presente no sistema mimético de membrana não foi capaz, na maioria das situações testadas, de reportar alterações significativas na organização dinâmica dos lipídios após a adição de HGal-4. Sendo assim, passamos a monitorar em nossas análises a mesma interação proteína/membrana, mas agora de outra perspectiva, qual seja a da proteína em relação à membrana, isto é, a interação proteína/membrana com a proteína marcada com marcador de spin. A técnica de marcação de spin sítio dirigida (SDSL do inglês *Site Directed Spin Labeling*) tem sido utilizada em estudos estruturais e de dinâmica conformacional de proteínas^{114, 115} e tem como principal objetivo prover informações sobre a dinâmica da cadeia principal e/ou lateral quando a proteína em investigação realiza sua atividade biológica.^{116, 117} A SDSL consiste em selecionar um aminoácido nativo e substituí-lo por um resíduo de cisteína (via mutação sítio dirigida) de forma que esta seja modificada quimicamente por uma reação sulfidril com um radical nítróido adequado. O reagente metanotiosulfonato (MTSSL) tem sido o mais utilizado para fins de SDSL, embora outros tipos já tenham sido empregados.^{118, 119} Em nosso sistema,

utilizamos as duas cisteínas nativas presente na proteína galectina-4 humana para a marcação com o reagente MTSSL.

Os espectros de RPE da HGal-4 marcada com MTSSL e normalizados pela concentração (a partir da área do espectro de absorção) em solução e na presença dos modelos de membrana são mostrados a seguir. A normalização pela área tem o intuito de evidenciar as mudanças que aparecem no espectro devido ao alargamento das linhas de ressonância quando da diminuição da mobilidade (restrição de movimento) da sonda oriunda de, por exemplo, sua interação com outras moléculas.

Todos os espectros da HGal-4 marcada na ausência e na presença de modelos de membrana apresentam, como esperado, duas componentes espectrais associadas com a marcação dos dois resíduos de cisteína existentes na estrutura proteica. A componente mais facilmente identificável está representada pelas três linhas mais intensas no centro do espectro (seta com a letra *m* – móvel – identifica a linha de campo baixo dessa componente na **Figura 32**). A forma de linha deste espectro é reflexo de uma sonda experimentando uma dinâmica rápida, o que indica que este deva ser o espectro oriundo do resíduo de cisteína presente na região do peptídeo *linker* (Cys172), uma região mais flexível e menos estruturada como mostram nossos resultados de CD. A presença da segunda componente espectral pode ser detectada na forma de uma linha larga posicionada lateralmente à linha mais intensa na região de campo baixo (seta com a letra *i* – imóvel – identifica a linha de campo baixo desta componente na **Figura 32**). Espectros de RPE com linhas mais largas são resultado de sondas submetidas a algum tipo de restrição de movimento, o que leva a uma dinâmica rotacional mais lenta. A origem da restrição de movimento pode ser diversa, mas neste caso é provável que advenha da própria estruturação da região em que se localiza o resíduo de cisteína submetido à marcação de spin (resíduo Cys280 localizado no final da fita F3 de uma das folhas- β , ou seja, região estruturada e oposta ao sítio de ligação do açúcar). Vemos, portanto, que o processo de marcação sítio dirigida foi realizado com sucesso.

A **Figura 32** mostra, ainda, uma série de experimentos da HGal-4 foi colocada na presença de vesículas de composição mais simples contendo apenas o fosfolípido zwitteriônico DMPC (PCs são os componentes majoritários de membranas celulares e, portanto, boas escolhas iniciais para miméticos de membrana) na ausência e na presença do fosfolípido PE funcionalizado com lactose em sua cabeça polar (LacPE). Vemos que em

ambos os casos há uma leve diminuição da intensidade dos espectros o que sugere uma pequena diminuição de mobilidade de HGal-4 na presença das vesículas.

Figura 32 - Espectros de RPE da HGal-4 marcada com o marcador de spin MTSSL na ausência e na presença de miméticos de modelos de membrana nas composições: DMPC; DMPC/LacPE 5%. A razão proteína:lipídeo utilizada foi de 1:50 e os espectros foram coletados à 20°C.

Fonte: Elaborada pela autora.

Além da capacidade de açúcares promoverem a interação entre HGal-4 e modelos de membrana, também investigamos o papel desempenhado pela carga superficial desses modelos de membrana no processo de interação. Para tanto, lançamos mão de vesículas contendo fosfolipídios cujas cabeças polares são carregadas, como é o caso de POPA (cabeça polar negativa contém o ácido fosfatídico). Assim, na **Figura 33**, temos os espectros obtidos de HGal-4 marcada com a sonda MTSSL em seus resíduos de cisteína na presença de miméticos constituídos por POPA e por misturas POPA/DOPC e POPA/DOPC/LacPE. Vemos que a carga superficial isoladamente não é capaz de levar a mudanças espectrais, pois os espectros de HGal-4 na presença tanto de vesículas de POPA quanto de POPA/DOPC não mostram mudanças significativas, que somente aparecem quando estão combinados no mesmo sistema mimético a carga superficial propiciada por POPA e o grupo funcional de LacPE. Vimos na **Figura 32** acima que a presença de vesículas de DMPC/LacPE afeta de forma sutil mas significativa a dinâmica da sonda na HGal-4. Disto e dos resultados na **Figura 33**, vemos que é a combinação carga superficial, oriunda das moléculas de POPA, e

açúcar, propiciado por LacPE, que leva a mudanças mais drásticas no espectro de RPE e, consequentemente, no ambiente experimentado pela sonda na estrutura de HGal-4. A galectina-4 humana possui um caráter positivo nas condições do experimento (pI 9,21), o que favoreceria a sua interação com a superfície carregada negativamente das vesículas. A alteração espectral obtida na presença de POPA/DOPC/LacPE sugere forte restrição de movimento das sondas.

Figura 33 - Espectros de RPE da HGal-4 marcada com o marcador de spin MTSL na ausência e na presença de miméticos de modelos de membrana nas composições: POPA; POPA/DOPC; POPA/DOPC/LacPE 5%. A razão proteína:lipídeo utilizada foi de 1:50 e os espectros foram coletados à 20°C.

Fonte: Elaborada pela autora.

Em seguida, voltamos a investigar os miméticos de domínios *rafts* contendo glicosfingolipídios apresentados anteriormente e podemos observar que, à exceção daquele contendo o cerebrosídeo sulfatado (SulfBrain), há alterações espectrais em todos os casos (**Figura 34**). Dentre aqueles casos em que houve alterações, percebemos a existência de dois grupos de espectros associados com duas respostas distintas: no caso do modelo de membrana constituído por POPC/SM/Chol, o espectro de RPE de HGal-4 se torna mais intenso, o que indica maior mobilidade da sonda ligada à proteína na presença das vesículas; já para os casos em que o mimético de membrana contém o gangliosídeo GM1 ou o cerebrosídeo sintético (SulfGalCer), os espectros são alargados, o que sugere maior imobilização da região da sonda

proteica. Estes resultados indicam que HGal-4 interage com os modelos testados, mas que a presença de lipídios com cabeças polares funcionalizadas com açúcares, leva a alterações espectrais distintas quando comparamos as mudanças observadas na presença do mimético que não contém glicolipídeos. Aqui cabe lembrar que os resíduos de cisteína em HGal-4 estão localizados no peptídeo *linker* e no domínio CRD-II. Esta informação pode ajudar a interpretar as distintas respostas observadas como sendo oriundas de distintos mecanismos de ligação. No caso de vesículas de POPC/SM/Chol, HGal-4 deve interagir com a membrana via ligações não específicas, provavelmente envolvendo o domínio CRD-I, o que deixaria tanto o peptídeo *linker* quanto o domínio CRD-II com mobilidade pouco alterada ou ligeiramente aumentada. Já para vesículas contendo GM1 ou SulfGalCer, a interação deve ser mediada pelo domínio CRD-II, o que leva a uma maior imobilização da sonda magnética ali existente devido à formação de contatos entre o domínio proteico e os grupos glicosídicos.

Uma observação que pode ser derivada dos espectros na **Figura 34** diz respeito à aparente especificidade de HGal-4 por determinados grupos glicosídicos e advém da falta de mudanças no espectro de HGal-4 quando na presença de vesículas contendo cerebroside sulfatado (SulfBrain). Devemos lembrar que SulfBrain é, na realidade, uma mistura de fosfolipídios naturais de cérebro de porco e que o componente majoritário (apenas 36%) mostrado na **Tabela 8**, apesar de conter o mesmo grupo funcional em sua cabeça polar que aquele existente em 3-Sulfo-C24:1 GalCer, parece não estar presente em quantidade suficiente para levar à ligação de HGal-4. Além disso, os demais componentes da mistura SulfBrain não são capazes de promover a interação com HGal-4, o que explicaria a falta de alterações no espectro de RPE.

Por fim, interessante percebemos a relevância da existência de açúcares complexos ligados à cabeça polar dos fosfolipídios, já que a resposta reportada por HGal-4 marcada frente a vesículas contendo glicolipídeos com açúcar sulfatado (SulfGalCer) e açúcares complexos (GM1) é bastante distinta, comparada às outras condições. Dessa forma, essa é uma constatação da ligação/interação e preferência da HGal-4 por lipídeos contendo açúcares complexos e/ou sulfatados, como descrito na literatura.¹¹³ Além disso, parece ser o domínio CRD-II aquele responsável por tal interação.

Figura 34 - Espectros de RPE da HGal-4 marcada com MTSL em solução e na presença de modelos de membrana miméticos de *lipid rafts*. As composições utilizadas foram POPC/SM/Chol/x (50:27:20:3), onde x equivale aos glicoesfingolipídeos: GM1, SulfBrain e SulfGalCer. A razão proteína:lipídeo utilizada foi de 1:50 e os espectros foram coletados à 20°C.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os resultados da **Figura 34** mostraram um aspecto interessante da interação HGal-4 com membranas, qual seja a sua capacidade de se ligar a açúcares complexos que funcionalizam a cabeça polar do fosfolipídio. Esta habilidade em reconhecer açúcares complexos na cabeça polar de lipídeos também foi recentemente associada com uma potencial função de galectinas como agentes bactericidas. As bactérias geram uma grande variedade de glicolipídeos, sendo muitas delas com epítomos semelhantes a grupos sanguíneos humanos (antígenos ABO(H)).¹²⁰ Chamadas também de imuno lectinas inatas, galectinas expressas no trato intestinal, como Galectina-4 e -8 humanas, têm a capacidade de reconhecer antígenos semelhantes a grupos sanguíneos humanos (mais especificamente o antígeno-O) expressos por *E. coli* e matá-los.¹²¹ Essa capacidade bactericida provem do reconhecimento e ligação da galectina-4 ou -8 à membrana causando uma desestabilização e sua ruptura e, conseqüentemente, levando a bactéria à morte.¹²¹

Os antígenos sanguíneos nada mais são do que glicolipídios com uma cadeia polissacarídica de alto grau de complexidade ligada à cabeça polar do lipídio e são denominados de lipopolissacarídeos (LPS). Os LPS são os principais componentes de

membrana externa em bactérias Gram-negativas e possuem um papel importante na proteção da bactéria contra ambientes agressivos e tóxicos, incluindo antibióticos.¹²² Os LPS possuem três componentes em sua estrutura: Lipídeo A, *core* de oligossacarídeo e antígeno-O (**Figura 35**) e se diferenciam pela extensão da cadeia polissacarídica, ramificações diversas e os monossacarídeos que os compõem.

Figura 35 - Representação esquemática da estrutura de um LPS. Os LPS são formados por três componentes: Lipídeo A, *core* e antígeno-O (n pode variar de 4 a 40).

Fonte: Adaptada de DONG¹²²

Para investigarmos a influência de açúcares complexos presentes em glicolipídeos sobre a interação galectina/membrana, incorporamos alguns tipos de LPS na composição de nossos modelos de membrana, aumentando, assim, a complexidade do sistema membranar usado e tornando-os mais próximos de uma membrana natural. Os LPS foram produzidos e cedidos pela pós-doutoranda Dra. Lilian Cataldi Rodrigues, sob supervisão do Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi (Laboratório de Glicoimunobiologia, FCFRP/USP). Além disso, e em face da disponibilidade de outra galectina produzida pelo grupo do Prof. Baruffi, realizamos experimentos também com a galectina-1 humana (HGal-1). Aqui cabe lembrar que a galectina-1 é um dímero pertencente ao grupo proto, sendo sintetizada como um monômero contendo um CRD, que se homodimeriza não-covalentemente. A forma dimérica possui uma estrutura relativamente rígida e parece ser necessária para o seu funcionamento.¹²³ Sabe-se que a galectina-4 humana reconhece múltiplos domínios de glicanos e tem especificidade para

antígenos A e B de grupos sanguíneos humanos e não reconhece o grupo sanguíneo O(H). Enquanto que a galectina-1 humana não reconhece nenhum antígeno sanguíneo.¹²¹ É importante salientar que este efeito de lise celular só é observado em procariotos e, portanto, não ocorre em humanos.¹²¹

A nomenclatura e as características estruturais dos LPS utilizados neste estudo estão mostradas na **Tabela 9** e na **Figura 36**. Além disso, na **Tabela 9** é dada a resposta funcional de cada galectina já estudada em relação à sua capacidade de se ligar e de matar a bactéria, ou seja, romper a membrana, dependendo da galectina.

Tabela 9 – Lista dos LPS utilizados. A tabela mostra a fonte dos LPS de diferentes linhagens de *E. coli* e sua função relacionada a lise da membrana causada pelas galectinas-1 e/ou -4.

Tipo bacteriano		Função
LPS1	O86:waal	HGal-4 (não liga)
LPS2	O86:B7	HGal-1 (não liga)
	(selvagem)	HGal-4 (liga e mata)
LPS3	O:142	HGal-4 (baixa afinidade e não mata)
LPS4	O:143(A)	HGal-4 (baixa afinidade e não mata)

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 36 - Esquema das estruturas dos LPS1, 2, 3 e 4. Cada LPS se diferencia pela cadeia antígeno-O.

Fonte: Elaborada pela autora.

A partir da estrutura química dos diferentes tipos de LPS usados (**Figura 36**), podemos ver que: LPS1 não possui funcionalizações com antígenos em sua cabeça polar; LPS2 possui funcionalização mais complexa (sendo esta o LPS selvagem, encontrado em *E. coli*) e LPS3 e LPS4 são modificados em sua cabeça polar com glicosídeos mais simples do que aquele encontrado em LPS2. Os espectros de RPE de HGal-4 e HGal-1 marcadas com a sonda MTSSL e na ausência (apo) e na presença dos modelos de membrana contendo esses diferentes tipos de LPS estão mostrados na **Figura 37**.

Aqui cabe colocar que HGal-1 possui 6 resíduos de cisteína por CRD, distribuídos por várias fitas- β e um resíduo no N-terminal. O espectro de RPE de HGal-1 apresenta apenas uma componente espectral claramente identificada, o que sugere que as posições em que a sonda marcou os resíduos de cisteína dão origem a dinâmicas equivalentes, o que seria esperado para as posições localizadas nas fitas- β . Outro fator que não pode ser descartado é a não marcação de todos os resíduos de cisteína presentes na proteína. Para HGal-1 não é possível, portanto, correlacionar as alterações espectrais com a porção da estrutura que sofre mudança já que não temos seletividade em virtude dos vários resíduos de cisteína. De qualquer forma, as variações nos espectros de RPE podem ser tomadas como indicativo mais global da existência de mudanças estruturais/dinâmica.

Assumindo que a variação de intensidade dos espectros de RPE normalizados pela concentração está associada com a variação de mobilidade experimentada pela sonda magnética inserida na proteína, podemos ver que, em todos os casos (tanto para HGal-4 quanto para HGal-1), a presença do sistema de membrana contendo LPS leva a um aumento de intensidade do espectro, o que sugere um aumento de mobilidade da proteína, o que estaria de acordo com nossos resultados de SRCD (**Figura 18 e Tabela 5**), em que observamos uma maior contribuição de elementos de estrutura secundária menos ordenados na presença dos açúcares simples (lactose e sacarose). Apesar das técnicas de RPE e SRCD estarem monitorando sondas estruturais distintas e que, portanto, reportam efeitos da presença dos ligantes sobre propriedades estruturais distintas (a sonda magnética MTSSL “percebe” mudanças mais localizadas, ao passo que a ligação peptídica nos informa de alterações mais globais na estrutura proteica), ambos os conjuntos de resultados apontam para maior flexibilidade da HGal-4 quando na presença de ligantes. Fazendo uso da informação contida na **Tabela 9**, podemos ver que mesmo os casos de ligação de HGal-4 a tipos bacterianos com

baixa afinidade levam a alterações nas regiões da proteína monitoradas pela sonda MTSSL, que se tornam mais móveis na presença da membrana.

Analisando-se agora a ordem em que os espectros de RPE sofrem alterações podemos propor uma análise qualitativa da tendência de mudança de mobilidade como segue:

- (1) para HGal-4, a dinâmica na forma apo é menor do que na presença de LPS2 que, por sua vez, é menos do que aquela que resulta da presença de LPS1, LPS3 e LPS4, estes três últimos originando espectros basicamente similares: (apo) < LPS2 < LPS1=LPS3=LPS4;
- (2) para HGal-1, a ordem seria: (apo) < LPS2 < LPS3=LPS4 < LPS1.

Dessas alterações percebemos que a membrana contendo LPS1, aquele que não apresenta glicosídeos em sua cabeça polar e seria, portanto, similar à situação encontrada nos experimentos com lipossomos de POPC/SM/Chol, leva a alterações compatíveis com aquelas vistas na **Figura 34** para uma membrana sem componentes funcionalizados com açúcar e que aparecem como um aumento de mobilidade. Por outro lado, o LPS2, possuidor do glicano mais complexo, leva a sonda sempre a um estado intermediário de alteração na sua dinâmica. Por fim, os tipos de LPS que possuem cabeças polares menos complexas (LPS3 e LPS4), resultam em alterações espectrais semelhantes.

Os dados reportados por Stowell et al ¹²¹ e disponibilizados pelo Prof. Baruffi, sumarizados na **Tabela 9**, mostram que HGal-4 somente é capaz de se ligar de maneira eficiente para exercer sua atividade bactericida em bactérias contendo LPS do tipo LPS2. Em todos os outros casos, ou pela não ligação ou pela ligação com baixa afinidade, o efeito de morte bacteriana não é observado. Os espectros de HGal-4 na presença de lipossomos contendo LPS (**Figura 37a**) sugerem uma importante faceta que deve estar atrelada à capacidade de matar a bactéria: a ruptura da membrana. Os espectros de RPE evidenciam um aumento de mobilidade da sonda localizada na região do peptídeo *linker* (componente espectral mais intensa). Tal aumento é mais considerável para o caso de LPS1, LPS3 e LPS4, sendo intermediário para LPS2. Isto sugere que o efeito bactericida possa ser regulado pela dinâmica do peptídeo *linker*, de forma que uma dinâmica muito rápida dessa região deva impossibilitar a formação de *clusters* de HGal-4 que seriam os responsáveis pela desestabilização da membrana da bactéria, levando à sua morte. Um ajuste fino da dinâmica

da região seria, portanto, essencial para isso. A formação de *clusters* de HGal-4 foi também sugerida por nossos dados de ITC para a titulação de lactose em HGal-4 (**Figura 24**), o que indica que essas estruturas envolvendo várias moléculas da proteína possam existir mesmo em solução na presença do ligante, que poderia estar tendo papel similar àquele desempenhado pelo LPS2 no lipossomo.

Figura 37 - Espectros de RPE das proteínas (a) HGal-4 e (b) HGal-1, apo e na presença de miméticos de membrana miméticos de *lipid rafts*. As composições utilizadas foram POPC/SM/Chol/LPS (50:27:20:3), com os 4 tipos diferentes de LPS mostrados. A razão proteína:lipídeo utilizada foi de 1:50 e os espectros foram coletados à 20°C.

Fonte: Elaborada pela autora.

1.5 CONCLUSÕES

As galectinas são proteínas que se ligam a carboidratos e possuem afinidade por oligossacarídeos específicos. Os carboidratos estão presentes em todas as células (em sua superfície celular e em matriz extracelular) e quando ligados a lipídios ou proteínas (glicoconjugados) possuem funções específicas. A função específica das galectinas ainda não é bem conhecida. No entanto, uma variedade de papéis tem sido a elas atribuídos incluindo adesão celular, regulação de crescimento, apoptose, morte programada, migração e resposta imunológica. No presente capítulo foi proposto o estudo da interação da proteína galectina-4 humana, bem como seus domínios CRD-I e CRD-II isolados, com carboidratos simples e com miméticos de membranas.

As seções anteriores da presente tese versaram, basicamente, sobre a produção de informações acerca de características estruturais e de atividade funcional de galectina-4 humana através de uma abordagem bioquímica/biofísica contendo uma multitude de métodos experimentais, alguns dos quais de uso ainda incipiente ou mesmo inédito em nosso país, como é o caso do dicroísmo circular por radiação síncrotron (SRCD) e a termoforese em micro-escala (MST). Além disso, a diversidade de métodos aliou de forma produtiva técnicas que monitoram aspectos locais na estrutura proteica, como a marcação de spin sítio-dirigida e a fluorescência, com aquelas que reportam mudanças da estrutura mais globalmente, como é o caso do dicroísmo circular.

A utilização de construções de proteínas derivadas de HGal-4 e que representam seus domínios CRDs isolados, além da própria proteína HGal-4 inteira, nos permitiram analisar a respostas de tais proteínas frente a condições experimentais, como a presença de ligantes, assim tentando separar as relações de causa e efeito em cada caso.

Dos vários resultados apresentados até o momento vemos que a distinção entre os comportamentos, em solução e na forma apo, dos domínios CRD-I e CRD-II fica evidente como se depreende seus espectros de SRCD (**Figura 15 e Tabela 4**), de CD no UV-próximo (**Figura 23**) e da estabilidade térmica de cada domínio (**Figura 27 e Figura 28**). A assimetria estrutural é percebida mesmo levando-se em conta o alto grau de identidade estrutural (sobreposição) quando se comparam as estruturas cristalográficas determinadas para os domínios isolados.^{51, 53} A presença nos domínios em solução de regiões que apresentam maior grau de desordem ou que experimentam (coexistem em) diferentes conformações em uma

escala temporal muito rápida para que sejam percebidas pelos métodos aqui empregados, o que as levariam a serem contabilizadas como uma estrutura média provavelmente com maior desordem, podem ser as razões das diferenças observadas, por exemplo, entre os conteúdos de estrutura secundária obtidos para os domínios isolados pela desconvolução dos espectros de SRCD e mostrados na **Tabela 4**. A percepção dessa diferença de comportamento dos domínios quando em solução e na forma apo pode ser considerada como uma informação já que a assimetria entre os domínios é, normalmente, reportada via estudos que envolvem a interação com algum dos ligantes de galectina.⁶²

Dentro do contexto de interação com ligantes, vimos que os testes de hemaglutinação com os domínios isolados feitos na ausência (**Figura 11**) e na presença (**Figura 12**) de açúcares simples (competidores pelos sítios de ligação) mostram um comportamento distinto para cada um deles. Esses mesmos resultados evidenciam a capacidade hemaglutinante dos domínios, o que sugere sua capacidade de formar oligômeros para que se viabilize o processo de aglutinação das hemácias. Esta assimetria funcional dos domínios de galectina-4 concorda com resultados da literatura que reportam situações similares. Por exemplo, Bi et al⁷⁵ utilizando-se de construções híbridas em que se combinavam o domínio CRD de galectina 1 (membro do grupo proto) com os domínios CRD-I e -II de galectina 9 (membro do grupo *tandem*), mostraram que é o domínio CRD-II posicionado no C-terminal das construções híbridas que leva aos efeitos mais marcantes no que tange à morte de células T.

Nossos resultados biofísicos com os domínios isolados em solução e na presença de ligantes simples (lactose e sacarose) também apontam para distintas respostas à presença dos açúcares como percebemos pelos dados de CD no UV-distante e no UV-vácuo (**Figura 17** e **Tabela 5**), em que percebemos que o domínio CRD-I apresenta alterações nos espectros e conteúdos de estrutura secundária, ao passo que o CRD-II mantém sua estrutura secundária praticamente inalterada na presença dos ligantes. Ou seja, o domínio CRD-I sofre maiores mudanças conformacionais em sua constituição de estrutura secundária pela adição dos ligantes do que o domínio CRD-II. Entretanto, quando analisamos a resposta estrutural dos domínios isolados à presença dos ligantes monitorando regiões mais localizadas da proteína, como é feito com a técnica de CD no UV-próximo (resíduos Phe, Tyr e Trp), vemos que nossos resultados (**Figura 23**) indicam que o CRD-I responde à presença de lactose e de sacarose, e o CRD-II tem seu espectro alterado apenas por lactose, que seria o ligante natural de galectina-4. Isto nos sugere que o domínio CRD-I sofre alterações tanto em nível de estrutura secundária quanto terciária, enquanto o CRD-II parece passar apenas por uma

acomodação estrutural pela presença de lactose. Sabemos que os sítios de ligação de açúcar em galectinas, em geral, não apresentam alta constante de ligação.⁵⁴ A maior labilidade estrutural do domínio CRD-I, que responde com mudanças conformacionais aparentemente mais acentuadas na presença de ligantes, poderia levar a uma desestruturação mais significativa do já raso sítio de ligação do açúcar, o que faria do domínio CRD-II o mais adequado e determinante, por exemplo, em processos funcionais, como sugerido para outras galectinas.^{75, 124}

Em nosso trabalho também procuramos determinar a afinidade dos domínios isolados por açúcar como uma forma de complementar os resultados estruturais biofísicos. Na literatura encontramos que os valores de K_d para os domínios devem ser em torno de 0,5-1 mM⁵⁴, assim como nossos resultados indicaram valores de constante de dissociação da ordem de 0,5 mM para ambos os domínios. Os resultados de um dos métodos aqui usados para cálculo de K_d através da fluorescência intrínseca do resíduo de Trp (localizado no sítio de ligação do açúcar) mostram que, neste aspecto, os domínios respondem igualmente à adição de lactose com deslocamento da banda de emissão do Trp (**Figura 21**), ou seja, a alteração estrutural em torno do Trp é similar nos dois domínios e, portanto, leva a valores de K_d semelhantes. A técnica de ITC também nos levou a valores de K_d similares para os dois domínios (**Figura 24**). Apesar da discrepância em relação ao valor de K_d determinado, o ajuste dos dados de ITC revelou que o modelo termodinâmico que melhor representou as curvas de titulação dos domínios com lactose apontou para a existência de sítios de ligação em número superior ao que seria esperado para os domínios isolados. Isto nos sugere que processos de oligomerização dos domínios devam estar ocorrendo, o que ajudaria a entender a atividade lectínica positiva observada para os domínios quando em altas concentrações. A oligomerização de domínios CRDs de outras galectinas tanto do grupo proto quando *tandem* tem sido observadas⁹⁵, o que pode levar a implicações funcionais também para galectina-4.

Em relação à galectina-4 inteira (HGal-4), conduzimos os mesmos experimentos realizados para os domínios separados, além de outros que envolveram a interação de HGal-4 com miméticos de membrana biológica. Analisando os resultados na mesma sequência adotada acima para os domínios, vemos que na **Figura 11** e na **Figura 12** (competição com açúcares simples), a atividade lectínica de HGal-4 é distinta daquelas observadas para os domínios isolados, tornando-se similar à do domínio CRD-II apenas na condição em que este está em altas concentrações. Isto é uma indicação de que a combinação dos domínios CRDs via um peptídeo *linker* leva a mudanças funcionais.

A busca pelos determinantes moleculares dessa distinta resposta envolveu novamente o conjunto de métodos biofísicos anterior. Os espectros de SRCD de HGal-4 (**Figura 15** e **Tabela 4**) mostram que HGal-4 tem diferentes conteúdos de estrutura secundária quando comparada ao domínio CRD-I, principalmente. Percebemos, ainda, que o espectro de SRCD da HGal-4 não é simplesmente a soma dos espectros individuais dos domínios (**Figura 16**). O espectro obtido pela subtração entre o espectro de HGal-4 e a soma dos espectros dos domínios não resulta em um padrão de CD que possa ser associada a algum elemento peculiar de estrutura secundária. Apesar dos erros encontrados em processos de subtração espectral, esse resultado indica que a atividade óptica do peptídeo *linker* somada àquela oriunda dos possíveis arranjos estruturais dos domínios ocasionados pela formação da estrutura da proteína inteira levam à diferenças estruturais claras. A mesma conclusão é apontada pelos valores dos conteúdos de estrutura secundária obtidos a partir da desconvolução dos espectros de SRCD (**Tabela 4**), em que vemos que os percentuais de HGal-4 correspondem mais àqueles obtidos para o CRD-II do que para o CRD-I, o que sugere que o CRD-I possa sofrer mudanças conformacionais ao se ligar ao peptídeo *linker* e ao CRD-II formando a proteína inteira.

Além das alterações nos espectros de SRCD, observamos também que a estabilidade térmica de HGal-4 parece corresponde de forma mais próxima àquela vista para o domínio CRD-I (**Tabela 6** e **Tabela 7**). Isto fica ainda mais claro quando a variação térmica é feita em experimentos de SRCD e o método de PCA usado para análise dos resultados. Neste caso, a curva de f_D em função da temperatura (**Figura 28**) apresenta sempre duas transições estruturais (uma associada à desnaturação de voltas/*loops* e outra às folhas- β) melhor definidas para o CRD-I e para HGal-4.

Em relação à ligação com ligantes simples, a HGal-4 apresenta uma resposta biofísica reportada pelos experimentos de SRCD que não se assemelha aos domínios (**Figura 18** e **Tabela 5**). Na presença dos ligantes, HGal-4 tem seu conteúdo de folhas- β diminuído com o concomitante aumento do percentual de voltas e loops, o que sugere que estruturas mais ordenadas, como as folhas, decrescem sua presença, dando lugar a regiões de maior mobilidade. A relevância funcional da maior dinâmica estrutural também foi sugerida por Earl et al¹²⁴ para galectina-9 e o mesmo deve acontecer para HGal-4.

Os experimentos que monitoram mudanças conformacionais em nível de estrutura secundária (CD e SRCD) foram complementados por aqueles que se voltam para a avaliação

da estrutura terciária como reportada pelos resíduos Trp, Tyr e Phe. Assim, nos espectros de CD no UV-próximo (**Figura 23**), vemos que o espectro de HGal-4 não sofre alterações na presença de sacarose, mas experimenta mudanças após adição de lactose, em resposta qualitativamente mais similar ao do domínio CRD-II. Este resultado, juntamente com aquele discutido acima referente ao conteúdo de estrutura secundária e suas variações na presença de ligantes, nos indicam que seria o domínio CRD-II aquele que ditaria o comportamento de HGal-4, assim como foi também sugerido por Bi et al⁷⁵ para a galectina-9. Entretanto, olhando para os resultados de estabilidade térmica via CD (**Figura 27**) e via PCA (**Figura 28**), percebemos que a resposta qualitativa de HGal-4 é mais próxima à de CRD-I. Isto nos leva a crer que ou nossos resultados biofísicos não sejam capazes de definir qual domínio determina o comportamento de HGal-4 ou que, diferentemente de galectina-9, HGal-4 não tem seu ciclo funcional dominado por um dos CRDs apenas.

A estimativa do valor da constante de dissociação de lactose para HGal-4 foi feita também por fluorescência, que resultou em um valor de cerca de 2 mM, e por ITC, que não levou a um ajuste satisfatório da curva de titulação obtida. Em face disto, realizamos ainda a determinação de K_d pelo método de MST, que nos rendeu um valor de 11 mM para K_d . Vemos que em ambos os casos, os valores são da ordem de mM e maiores do que aqueles obtidos para os domínios isolados. Isto levanta uma questão relacionada às vantagens que haveria, então, em se combinar os domínios CRDs na forma de HGal-4 já que a lactose se dissocia mais desta última. Earl et al¹²⁴ e Bi et al⁷⁵, utilizando construções envolvendo os domínios de galectina-1 e -9 conectados por peptídeos *linker* de diferentes tamanhos e características, mostraram que a liberdade rotacional do CRD e a possibilidade de formação de oligomerizações são mais importantes para a habilidade da galectina em reter receptores glicoproteicos na superfície de células T¹²⁴ e na regulação de morte celular⁷⁵ do que movimentos laterais intramoleculares de cada CRD. Em nosso caso, a presença do peptídeo *linker* em HGal-4 e o arranjo global dos domínios na proteína inteira seriam também os fatores determinantes das vantagens funcionais em se ter a construção inteira de HGal-4.

Outro aspecto funcional interessante que pode se derivar a partir dos resultados de ITC está nos valores dos números de sítios de ligação obtidos. Apesar do pior ajuste da curva de titulação de HGal-4 com lactose (**Figura 24**), o melhor resultado sugeriu a necessidade de existência de múltiplas classes (diferentes afinidades) de múltiplos sítios de ligação. Levando em consideração a indicação apenas qualitativa da presença de vários sítios e do fato dos ajustes para as curvas dos domínios isolados também terem retornado com a presença de

vários sítios, poderíamos imaginar que HGal-4 seria capaz de formar dímeros ou mesmo oligômeros de ordem superior como representado na **Figura 25**. A formação desses oligômeros estenderia a capacidade de ligação a glicanos na superfície da célula e se valeria fortemente da maior flexibilidade conferida pelo peptídeo *linker*, o que pode ser uma característica mais geral de galectinas do tipo *tandem-repeat*.^{95, 124}

Nossos resultados sugerem, ainda, que as vantagens em se ter dois domínios conectados por um peptídeo *linker* em HGal-4, além da flexibilidade conformacional adquirida, estariam também em se ter domínios que podem se ligar a diferentes glicanos, mas que dividiriam a função de ligação a glicano com a de formação de oligômeros, o que poderia ser oriundo das diferenças estruturais entre os domínios CRDs e entre estes e HGal-4 observadas em nossos estudos biofísicos. Essa hipótese de um domínio envolvido na ligação ao açúcar e outro envolvido com multimerização foi sugerida em vários trabalhos¹²⁵⁻¹²⁷ e resultaria na formação de uma rede interconectada de galectinas/glicoproteínas na superfície celular, o que poderia levar a efeitos biológicos maiores em concentrações menores de galectina em um dado tecido.

Dessa forma, isoladamente os domínios têm respostas diferentes à presença de carboidratos o que concorda também com estudos recentes com galectina-4 de camundongo (sequência de aminoácidos da galectina-4 de camundongo e de humano possui 91% de similaridade e 76% de identidade), em que se observou a especificidade de ligação com carboidratos para cada domínio e em que se sugere uma possível função de ‘*crosslink*’ entre dois tipos diferentes de ligantes.⁵⁰ E mais, Marková e colaboradores mostraram que o peptídeo de ligação encontrado nos membros do grupo *tandem-repeat* da família das galectinas possui um papel estrutural no reconhecimento de ligantes.⁶² Nossos estudos têm mostrado que os domínios CRDs diferem no mecanismo de ação frente a diferentes carboidratos e que o peptídeo de ligação pode realmente possuir um papel importante no reconhecimento específico da ligação com carboidratos na proteína inteira, já que a resposta da HGal-4 difere daquelas observadas para os domínios isolados em várias das situações testadas, indicando que o elemento estrutural de ligação entre tais domínios possa sim ter papel nos mecanismos citados.

Na última etapa de evolução da complexidade dos sistemas de interesse de nosso trabalho e com os quais HGal-4 deve interagir em seu ciclo funcional, passamos à investigação da interação HGal-4 e membranas. Para isto, mais uma vez nos valem de um

método biofísico, desta feita a Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE). A técnica de RPE é uma das mais utilizadas em estudos de interações entre moléculas e, em casos de proteína-membrana, oferece a grande vantagem de podermos monitorar tais interações tanto da perspectiva da membrana (quando usamos lipídios marcados com sonda magneticamente ativa) e/ou da proteína (quando usamos SDSL de resíduos de cisteína). Os sistemas de interesse envolveram miméticos de membrana celular cuja composição foi sendo paulatinamente acertada para que englobássemos membranas contendo desde somente o fosfolipídio mais comum em membranas (do tipo PC) até membranas que contivessem lipopolissacarídeos (LPS) de vários tipos.

Os espectros de RPE obtidos de amostras em que marcamos as membranas modelo com sondas posicionadas no carbono 5 da cadeia acil do fosfolipídio mostraram mudanças apenas sutis nas situações testadas (**Figura 29** e **Figura 30**), o que indica que a presença de HGal-4 afeta pouco a organização lipídica na membrana.

Um conjunto de dados mais interessante foi obtido ao marcarmos os resíduos de cisteína da HGal-4. Na primeira sequência de experimentos, vimos que a presença de um fosfolipídio funcionalizado com lactose em sua cabeça polar leva a mudanças na dinâmica da proteína (**Figura 32**). A adição à composição da membrana de um fosfolipídio com cabeça polar negativa (POPA) levou a uma significativa redução da mobilidade das sondas em HGal-4 (**Figura 33**), o que indica que a presença de carga superficial negativa somada à de lactose leva ao efeito mais pronunciado de restrição de movimento, provavelmente do peptídeo *linker* (onde se encontra uma das sondas). Para tornar o modelo de membrana mais próximo à membrana celular, realizamos, em seguida, experimentos com membranas cuja composição continha o elementos que se acredita sejam importantes para a formação dos chamados domínios *rafts* (POPC/SM/Chol) na ausência e na presença de lipídios funcionalizados com diferentes grupos glicosídicos (GM1, SulfBrain e SulfGalCer). Os espectros de RPE medidos (**Figura 34**) mostram que HGal-4 responde de forma diferente às diferentes composições, com as membranas contendo GM1 e SulfGalCer levando a uma maior imobilização da sonda.

As membranas miméticas de *rafts* foram, ainda, adicionados diferentes tipos de lipopolissacarídeos (LPS) purificados de bactéria *E. coli* de diferentes linhagens. Tais LPS possuem distintas características físico-químicas (**Tabela 9**), o que permitiu analisarmos a influência dos grupos funcionais sobre a ligação de HGal-4 à membrana. Outra adição a esta parte do trabalho foi o uso também de galectina 1 (grupo proto) em experimentos

semelhantes. Na **Figura 37**, vemos os espectros de RPE de HGal-4 e HGal-1 marcadas na ausência e na presença dos diversos modelos de membrana. O resultado mais facilmente percebido é o de aumento da dinâmica da sonda em todas as situações. Mais especificamente, pudemos identificar um aumento gradual de mobilidade em função do tipo de LPS e, com base nisto e nas informações da **Tabela 9**, propor um modelo de interação que justificasse os resultados obtidos.

Ao final deste capítulo, fomos, portanto, capazes de explorar diversas facetas estruturais e de interação de HGal-4 com ligantes relevantes para seu ciclo funcional. A abordagem biofísica/bioquímica permitiu que fossem monitorados aspectos por diferentes perspectivas e que modelos de mudanças conformacionais fossem propostos em todos os casos. Na sequência de complexidade dos sistemas em estudo, o passo natural seguinte seria o uso não de membranas modelo, mas sim de membranas celulares. Isto foi feito e os resultados estão apresentados e discutidos no capítulo que segue.

Capítulo 2

Estudos funcionais da galectina-4 humana

2.1 INTRODUÇÃO

No Capítulo 2 deste trabalho, damos prosseguimento à estratégia inicialmente traçada de aumentar a complexidade dos sistemas em estudo envolvendo HGal-4. Assim, partindo dos estudos biofísicos da HGal-4 e de seus domínios CRDs independentes já apresentados no capítulo anterior, estendemos agora nossa investigação ao reconhecimento de carboidratos na superfície de diferentes células tumorais, bem como seu envolvimento na morte dessas células e/ou no tratamento quimioterápico com cisplatina.

O número de proteínas conhecidas que se ligam a carboidratos tem crescido nos últimos anos, estando dentre elas as galectinas. Estas proteínas reconhecem carboidratos inatos que estão diretamente ligados à patogenicidade e respostas imunes.¹²⁸⁻¹³⁰ As galectinas-1 e -3 são os membros mais extensivamente estudados e conhecidos da família das galectinas, sendo essas pertencentes aos grupos proto e quimera, respectivamente, e capazes de formar (homo)oligômeros bi ou multivalentes. Já as galectinas do grupo *tandem-repeat*, por disporem de dois CRDs distintos, são capazes de interagir com diferentes ligantes, formando um *crosslink* e, portanto, possuir um número ainda maior de funções devido a esta heterogenidade, como discutido extensivamente no capítulo anterior.

Além disso, a galectina-4 humana é sintetizada como proteína citosólica, mas pode ser externalizada por vias não-clássicas. Desta forma, pode ser encontrada tanto no núcleo, no quanto no interior ou no exterior da célula, indicando que a HGal-4 pode ter diferentes funções dependendo da sua localização. Em células normais, a galectina-4 é expressa somente no trato alimentar (da língua até o intestino grosso). É, ainda, frequentemente encontrada em complexos relativamente insolúveis, como componente tanto de junções celulares ou em domínios do top *lipid rafts* em membranas.⁵⁵ No entanto, níveis altos de expressão de HGal-4 podem ser induzidos em outros tipos de tecidos, o que pode estar relacionada com malignidades, como por exemplo câncer de fígado e mamas.⁶⁵ Entretanto, como (e se) esta heterogenidade, localização e função podem influenciar as atividades biológicas da galectina-4 permanece um aspecto ainda não compreendido.

Nessa conjuntura e, fazendo uso dos conhecimentos biofísicos/bioquímicos aqui construídos, apresentamos neste capítulo resultados referente à interação de HGal-4 com diferentes células tumorais (U87MG, T98G, HT-29) com dois intuitos: um de explorar a interação galectina-glicano na superfície de membranas dessas células, dando continuidade ao

aumento de complexidade de sistemas iniciado no capítulo anterior; e outro, na investigação da influência da localização (endógena/exógena) da HGal-4 sobre a viabilidade celular de cada uma das linhagens tumorais, bem como sua influência em tratamentos quimioterápicos de células. Para tanto, anticorpo policlonal contra galectina-4 humana foi aqui produzido para dar suporte à investigação.

2.2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

Com o intuito de abranger diferentes facetas do problema glectina-carboidrato, abordamos essas interações em um âmbito mais funcional. Dessa forma, os objetivos específicos deste capítulo são:

- Produção de imunoglobulina policlonal de coelho anti-galectina-4 humana (Anti-HGal4);
- Imunodeteção de galectina-4 humana em células tumorais;
- Interação galectina-4 humana com diferentes células tumorais;
- Avaliação do quimioterápico cisplatina na presença endógena e/ou exógena de galectina-4 humana.

2.3 MATERIAIS E MÉTODOS

As etapas procedentes de manipulação de animal foram devidamente acompanhadas por profissionais junto ao Laboratório de Glicoimunobiologia, chefiado pelo Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi e do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP). Os experimentos de viabilidade celular (MTT e citometria de fluxo) foram realizados em colaboração com a pós-doutoranda Dra. Thalita Bachelli Riul, sob supervisão do Prof. Dr. Baruffi.

2.3.1 Animal

Os experimentos foram realizados utilizando-se um coelho albino, macho e adulto (New Zeland) pesando em torno de 2,5 kg, adquirido junto ao Biotério Central do Campus da Universidade de São Paulo, campus de Ribeirão Preto. O animal foi mantido em biotério convencional, com livre acesso à água e alimento, no Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP).

O presente projeto possui aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA – USP, Campus de Ribeirão Preto) com o protocolo de número 12.1.1571.53.6.

2.3.2 Produção de Imunoglobulina Policlonal de Coelho Anti-Galectina-4 Humana

2.3.2.1 Imunização de Animal e Obtenção do Soro de Coelho

Para a produção de imunoglobulina policlonal anti-galectina-4 humana, um coelho albino, macho e adulto (New Zealand) foi imunizado com galectina-4 humana recombinante emulsificada com adjuvante completo ou incompleto Freund (Sigma-Aldrich, USA) conforme protocolo descrito por Harlow e Lane.¹³¹

A primeira imunização foi realizada com a injeção de HGal-4 emulsificada com adjuvante completo Freund (Sigma-Aldrich, USA) na proporção 1:1 no dorso do animal. Previamente à primeira imunização, foram colhidos 5 mL de sangue total do coelho para obtenção do soro pré-imune. Foram realizadas mais seis imunizações (totalizando sete imunizações) uma a cada 15 dias, sendo injetada intramuscularmente uma emulsão de HGal-4 e adjuvante incompleto Freund (Sigma-Aldrich, USA) na proporção 1:1, de forma que, a cada imunização, uma alternância de injeção entre as quatro patas foi realizada. Anteriormente a cada nova imunização, foram colhidos 5 mL de sangue total a fim de se determinar a

quantidade de anticorpos anti-HGal-4 no soro para a análise da eficiência do procedimento de hiperimunização.

O sangue total foi mantido por 1 hora a temperatura ambiente para a formação de coágulo e posterior coleta do soro. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 1060 g por 10 minutos a 20°C. Separado o soro, aqueceu-se a 56°C por 30 minutos para inativação das proteínas de Sistema Complemento, foi aliqotado e armazenado a -20°C. Após a confirmação do procedimento de hiperimunização, por ELISA (*Enzyme-linker Immunosorbent Assay*) e/ou *Western-blotting*, foi realizada a “sangria branca”, procedimento pelo qual o coelho foi devidamente anestesiado para a coleta máxima de sangue total via punção cardíaca. O soro hiperimune foi obtido como descrito anteriormente e armazenado à -80°C até o momento da purificação.

2.3.2.2 Purificação das Imunoglobulinas Anti-HGal-4 do Soro de Coelho

O soro de coelho hiperimune obtido contendo as imunoglobulinas anti-HGal-4 foi purificado via precipitação por solução saturada de sulfato de amônio 40% (m/v), adicionada, gota a gota, sob leve agitação por 30 minutos. O material foi mantido a 4°C por 12 horas e, em seguida, centrifugado a 3000 g por 10 minutos, ressuspenso em água e dialisado contra tampão PBS a 4°C, durante 2 dias, trocando-se o tampão 3 vezes ao dia. O soro dialisado foi esterilizado por filtração com o uso de membrana de 0,22 µm e quantificado por medida de absorção óptica em 280 nm. Então, foi utilizada uma coluna de resina de proteína G (Protein G Sepharose TM 4 Fast Flow, GE Healthcare) para a obtenção de imunoglobulinas da classe G (IgG) a partir do soro-imune anti-HGal-4. O material biológico foi aplicado na coluna, previamente equilibrada com tampão PBS, lavada com o mesmo tampão PBS e os anticorpos ligados à coluna foram eluídos com solução 0,1 M glicina pH 2,8. As alíquotas coletadas da coluna foram neutralizadas com 1 M K₂HPO₄ pH 10. A eluição foi concentrada em concentrador VivaspínTM (GE Healthcare) MWCO 100 kDa e dialisado contra tampão PBS. A solução de anticorpos foi filtrada em membrana de 0,22 µm em ambiente estéril, aliqotadas e armazenadas a 4°C. As amostras de anticorpos foram quantificadas pela medida de sua absorção óptica em 280 nm e a concentração calculada utilizando-se o coeficiente de extinção $\epsilon_{280\text{nm}} = 1,35$.¹³²

2.3.3 Obtenção e Cultura de Células

As células tumorais neurais humanas da linhagem T98G, U251 e U87MG foram cedidas gentilmente pelo Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi (FCFRP-USP) e mantidas em meio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*, Invitrogen, USA), suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal e 1% de penicilina e estreptomicina, em câmara úmida a 5% CO₂ a 37°C, e trocado a cada 3 dias por meio completo. As células de carcinoma coloretal humano da linhagem HT-29 foram doadas gentilmente pelo Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Junior da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, vinculada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP) e foram mantidas nas mesmas condições que as células tumorais neurais. O subcultivo celular foi realizado em garrafas de 25 ou 75 cm² (Costar-Corning, USA) e com uso de solução de tripsina-EDTA (Invitrogen, USA) por 10 minutos e, então, adicionou-se meio completo para a inativação da tripsina.

2.3.4 Western-Blotting

As culturas celulares foram tripsinizadas e lavadas com tampão PBS e, então, as proteínas foram extraídas com tampão RIPA (*Radio immunoprecipitation assay*) e mantidos sob agitação durante 20 minutos a 4°C. Subsequentemente, centrifugou-se a 10.000 rpm a 4°C e, cuidadosamente, transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo, armazenando-se o material a -80°C até o momento do uso.

As amostras (5 µg do extrato de cada célula) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE) e eletrotransferência, por 80 minutos, do gel para a membrana de nitrocelulose, utilizando-se o sistema Mini Trans-Blot® Cell (BioRad), a 70V constantes e corrente de 350 mA. Após a transferência, a membrana foi submetida à etapa de bloqueio em tampão TBS-T (Tris buffer solution contendo 0,05% de Tween-20) acrescido de 5% (m/v) de leite em pó desnatado durante 12 horas, sob agitação branda, a temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi lavada 5 vezes com tampão TBS-T, com 5 minutos para cada lavagem. Então, a membrana foi incubada com o anticorpo primário anti-HGal-4 (1:1000) em tampão TBS-T e 5% (m/v) de leite em pó desnatado por 2 horas, a temperatura ambiente, sob agitação. A membrana foi lavada 5 vezes e, em seguida, incubada com o anticorpo secundário anti-rabbit (peroxidase-conjugated affinipure goat anti-rabbit IgG, Jackson ImmunoResearch, EUA), na proporção 1:2500, em tampão de bloqueio por 1 hora, a temperatura ambiente, sob agitação. Ao término da incubação, as membranas foram lavadas e

as proteínas foram detectadas por quimioluminescência pela adição da solução de detecção LuminataTM Forte Western HRP Substrate (Merck MilliPore), segundo as instruções do fabricante. A detecção foi realizada por exposição da membrana em um fotodocumentador ChemiDoc (BioRad) ou por revelação em filme fotográfico.

2.3.5 Avaliação da ligação de galectina-4 na superfície de células tumorais por citometria de fluxo

A interação de galectina-4 em superfícies das células tumorais foi analisada por citometria de fluxo no aparelho BD FACSCanto I (BD Biosciences) no Laboratório de Citometria de Fluxo do Centro de Multiusuários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP) e os dados foram tratados e analisados pelo programa BD FACSDiva (BD Biosciences).

Para estes ensaios, primeiramente, a proteína foi marcada com o fluoróforo isotiocianato de fluoresceína (FITC), em tampão borato 50 mM, pH 8,5 na presença de 100 mM de lactose, para evitar a ligação do fluoróforo em aminas livres no sítio de ligação dos CRDs e, assim, preservar a atividade lectínica. A solução foi incubada sob abrigo de luz, à temperatura ambiente por uma hora e, então, submetida à cromatografia de exclusão molecular em coluna HiTrap Desalting (5 mL) para a remoção de excesso de FITC livre e de lactose, obtendo-se assim a proteína marcada HGal-4-FITC.

Em seguida, 10^5 células tumorais de cada uma das linhagens (HT29, U87MG e T98G) foram incubadas com HGal-4-FITC (0,2, 1 e 5 μ M), na presença ou não de lactose ou sacarose, em banho de gelo, por 60 minutos em tubos próprios para citometria de fluxo. Após esse tempo, as células foram lavadas de 1 a 2 vezes com PBS (centrifugadas a 1.000 g, 10 min) e ressuspensas em 200 μ L de PBS para, então, as medidas serem realizadas.

2.3.6 Avaliação do envolvimento da galectina-4 na morte de linhagens tumorais induzidas por cisplatina

Células das linhagens tumorais U87MG, T98G e HT-29 foram colocadas em placas de cultura de 96 poços (1×10^4 células por poço) em 200 μ L de meio DMEM suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal e 1% de penicilina e estreptomicina, em câmara úmida a 5% CO₂ a 37°C. Após a aderência dessas células (cerca de 24 horas), o meio de cultura foi retirado e substituído por meio contendo diferentes concentrações de cisplatina (Sigma-

Aldrich, USA) (37,5, 75 e 150 μ M), ou na concentração de 75 μ M de cisplatina na presença ou ausência de diferentes concentrações de HGal-4 (5, 1 ou 0,2 μ M). Após 48 horas, foram adicionados 20 μ L de uma solução 5 mg/mL de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide, Sigma-Aldrich, USA) e as células foram então incubadas novamente por 37°C por mais 4 horas. O meio de cultura foi removido e os cristais de formazan dissolvidos com 100 μ L de dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich, USA). A absorbância da solução obtida foi lida em 570 nm em espectrofotômetro SpectraMax – Molecular Devices. Células não tratadas com cisplatina foram utilizadas como controle de viabilidade do experimento.

Alternativamente, 5×10^5 células de cada linhagem foram adicionadas em placa de 24 poços e foram tratadas com as mesmas concentrações de cisplatina e/ou HGal-4 por 48 horas. A viabilidade das células sob diferentes tratamentos foi avaliada por marcação com anexina V-GFP e iodeto de propídeo por citometria de fluxo. Brevemente, após os tratamentos as células foram tripsinizadas, lavadas com tampão para anexina-V (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1m M $MgCl_2$ e 1,8 mM $CaCl_2$), suspensas em 100 μ L do mesmo tampão e incubadas por 15 minutos com cerca de 1 μ g de anexina-V-GFP (produzida e cedida pelo Laboratório de Glicoimunobiologia da FCFRP) em tubos próprios para citometria de fluxo. No momento da aquisição, 2 μ L de uma solução 10 μ g/mL de iodeto de propídeo foram adicionados ao tubo, e as populações celulares positivas para os dois marcadores (Anexina-V e iodeto de propídeo) foram consideradas como mortas.

2.3.7 Análise Estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada com o programa GraphPad Prism[®] 6 (GraphPad Software, USA). Foi usada a análise de variância entre os grupos (ANOVA) “one way” e o teste complementar de Bonferroni, considerando um nível de significância de $p < 0,05$.¹³³

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

2.4.1 Produção de Imunoglobulina Policlonal Anti-galectina-4 humana

A imunização do animal com galectina-4 humana foi realizada com sucesso como descrito anteriormente. Ensaios imunoenzimáticos, como ELISA e *Western-blotting*, comprovaram a eficiência da imunização através de reações controladas por diluições do soro pré-imune, em que HGal-4 imobilizada não foi reconhecida. Desta forma, foi demonstrado que os soros imunes apresentavam concentrações crescentes de anticorpo anti-galectina-4 humana (anti-HGal-4) em função do tempo de hiperimunização (dados não mostrados) e que o processo de “sangria branca” do animal para a coleta do soro total poderia ser realizado.

Após a obtenção do anticorpo policlonal anti-HGal-4 através da purificação do soro hiperimune por afinidade, foi avaliado o nível de reação deste anticorpo para outros membros da família das galectinas (galectina-1 humana, HGal-1; galectina-3 humana, HGal-3 e galectina-12 humana, HGal-12; amostras cedidas pelo grupo do Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi) na quantidade de 250 ng de cada galectina, por *Western-blotting* (**Figura 38**). Podemos observar na **Figura 38** que o anticorpo anti-HGal-4 reconheceu somente a galectina-4 humana, assim como seus domínios individuais (colunas 3, 4 e 5, respectivamente) e não as outras galectinas HGal-1, HGal-3 ou HGal-12, indicando alto nível de especificidade desse anticorpo para HGal-4 e para seus domínios.

Figura 38 – Análise da imunoreatividade do anticorpo anti-HGal-4 para outras galectinas humanas por *Western blot*. Amostras nas colunas: (1) HGal-1; (2) HGal-3; (3) HGal-4; (4) CRD-I da HGal-4; (5) CRD-II da HGal-4; (6) HGal-12, proteínas a uma quantidade de 250 ng. (Amostras cedidas pelo grupo do Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi).

Fonte: Elaborada pela autora.

2.4.2 Imunodeteção de Galectina-4 em Diferentes Linhagens Celulares Tumorais

Primeiramente, foram verificados os níveis de expressão da proteína galectina-4 em diferentes linhagens celulares: T98G, U251, U87MG e HT-29. Com a obtenção do anticorpo anti-HGal-4 funcional, foi realizada a imunodeteção via *Western blot* de galectina-4 em cada uma das células. Assim, foi comprovada a presença de HGal-4 somente nas células HT-29 e não nas demais células tumorais (**Figura 39**), indicando que HT-29 expressa galectina-4 de forma endógena. Já é descrito na literatura que as células de adenocarcinoma HT-29 superexpressam galectina-4¹³⁴ e as células de glioblastoma T98G, U251 e U87MG não expressão ou expressam muito pouco essa proteína.¹³⁵

Figura 39 - Imunodeteção de HGal-4 em diferentes linhagens celulares por *Western blot*. Amostras nas colunas: (1) T98G, (2) U251, (3) U87MG, (4) HGal-4 e (5) HT-29 testadas para imunoreatividade com anticorpo anti-HGal-4.

Fonte: Elaborada pela autora.

2.4.3 Interação da galectina-4 na superfície celular de diferentes linhagens celulares

A galectina-4 marcada com isotiocianato de fluoresceína (FITC), HGal-4-FITC, em várias concentrações, foi incubada com as diferentes células (T98G, U87MG e HT-29) para a investigação de interação da proteína com a superfície celular de tais células por meio de citometria de fluxo.

Observamos pelos histogramas na **Figura 40** que a mediana da intensidade de fluorescência das células aumenta com o aumento da concentração de proteína HGal-4-FITC adicionada ao tubo e ligada à superfície das células o que mostra que a proteína reconhece glicanos presentes na superfície celular. O mesmo experimento, nas mesmas condições, na presença de lactose ou sacarose, também foi realizado. Desta forma foi possível observarmos

que a lactose inibe a ligação da galectina às células, isto é, o excesso de lactose na solução (100 mM) desloca a ligação de HGal-4 da superfície das células, diminuindo a intensidade de fluorescência observada, o que concorda também com nossos resultados de hemaglutinação (**Figura 12**). Assim como observado a partir de alguns resultados do capítulo anterior, podemos inferir que lactose compete com os glicoconjugados pelos sítios de ligação na galectina-4, talvez indicando maior preferência de HGal-4 pelos ligantes disponíveis em solução. E, na presença de sacarose, esse efeito não é observado, o que também concorda com os nossos resultados de hemaglutinação (**Figura 12**). Ainda, podemos notar que o efeito de reconhecimento/ligação da proteína-glicano é ainda mais proeminente na célula HT-29 (barra preta). Este resultado indica que existe uma inter-relação entre a presença de galectina-4 endógena e a presença de ligantes com a HGal-4 exógena no reconhecimento/ligação desta com a superfície de células HT-29, uma vez que esta é a única linhagem utilizada neste trabalho que expressa HGal-4. Cabe ressaltar que HT-29 são células tumorais de intestino e que já foi reportado que células de intestino possuem os componentes necessários para a formação de domínios *rafts*.⁶³ Nossos resultados utilizando sistemas miméticos de membrana *rafts* e contendo lipídios funcionalizados com açúcar (GM1 e LPS, **Figura 34** e **Figura 37**) indicam que tal composição de membrana é aquela que leva às maiores alterações estruturais em HGal-4. O conjunto de resultados obtidos com miméticos de membrana e com células tumorais sugere que a composição lipídica contendo colesterol e esfingomielina juntamente com a presença de glicoconjugados funcionalizando a cabeça dos lipídios de membrana podem ser os fatores moleculares determinantes da maior resposta observada para células HT-29.

Figura 40 – Interação galectina-4 humana marcada com FITC (HGal-4-FITC) com as linhagens celulares U87MG (▤), T98G (▥) e HT-29 (■) na ausência ou presença de 100 mM de lactose ou sacarose nas concentrações de proteína de 0,2, 1 e 5 mM.

Fonte: Elaborada pela autora.

2.4.4 Avaliação da viabilidade das diferentes células tumorais frente ao tratamento com cisplatina

A cisplatina é uma das drogas mais potentes e mais amplamente utilizadas em tratamentos quimioterápicos em alguns tipos de câncer sólido, como câncer nos testículos, próstata, ovário, cabeça e pescoço.¹³⁶ A cisplatina é um composto inorgânico neutro que reage com o DNA induzindo alguns efeitos biológicos que culminam nos processos de reparação do DNA e no ciclo celular ou ativando o programa de apoptose irreversível.¹³⁶

As células tumorais foram tratadas com cisplatina em diferentes concentrações (37,5, 75 e 150 μ M) por 72h, com análise em sequência da viabilidade das células por citometria de fluxo, em que buscamos a taxa de morte/apoptose frente ao tratamento com o quimioterápico. O resultado da citometria das células marcadas com Anexina V (AnV+) e Iodeto de propídeo (PI+) são mostrados no histograma da **Figura 41**. Observamos que a quantidade de células mortas aumenta gradativamente com o aumento da dosagem de cisplatina para as três linhagens celulares (U87MG, T98G e HT-29), mostrando que essas células possuem uma

resposta dose-dependente frente ao tratamento. De posse desse resultado, estabelecemos uma dose de 75 μM de cisplatina para os estudos subsequentes de tratamento das células com esse fármaco na presença de HGal-4 exógena.

Figura 41 - Avaliação da viabilidade das linhagens celulares U87MG (▤), T98G (▥) e HT-29 (■) frente ao tratamento de cisplatina em diferentes concentrações por citometria de fluxo. As células positivas para a marcação de AnexinaV+/PI+ são consideradas mortas/apoptóticas. As células foram tratadas por 72h com cisplatina e células sem tratamento foram consideradas como controle de viabilidade (CV).

Fonte: Elaborada pela autora.

2.4.5 Efeito da galectina-4 humana na viabilidade das células tumorais frente ao tratamento com cisplatina

Os experimentos de interação da galectina-4 com diferentes células tumorais mostraram que esta reconhece e se liga a glicoconjugados presentes na superfície dessas células e que as células tratadas com a cisplatina são levadas à morte/apoptose. A partir desse cenário, foi investigado, através de citometria de fluxo, o efeito da presença de galectina-4 exógena e/ou endógena no tratamento quimioterápico.

Antes disso, verificamos se a cisplatina interfere nos níveis de expressão da HGal-4 nas células HT-29 e T98G por *Western-blotting*. As células foram tratadas por 72 horas com diferentes concentrações de cisplatina (37,5, 75 e 150 μM) e depois foi feito um extrato proteico dessas células. Utilizando o anticorpo anti-HGal-4 foi realizada a imunodeteção da galectina-4 nas células tratadas com cisplatina e podemos observamos na **Figura 42** a

detecção desta somente nas células HT-29. Além disso, os níveis de expressão de HGal-4 não são alterados com o tratamento de cisplatina, independente da dosagem utilizada. Na **Figura 42** é mostrada também a banda em torno de 50 kDa referente à α -tubulina, presente em todas as células, usada como controle do experimento.

Figura 42 - Imunodeteção de HGal-4 e α -tubulina em diferentes linhagens celulares frente ao tratamento de cisplatina em concentrações diferentes. Amostras nas colunas de (1-4) células HT-29: (1) sem tratamento, tratamento com cisplatina a (2) 37,5 μ M; (3) 75 μ M e (4) 150 μ M; Amostras nas colunas de (5-8) células T98G: (5) sem tratamento, tratamento com cisplatina a (6) 37,5 μ M; (7) 75 μ M e (8) 150 μ M. Ao centro, a galectina-4 funcionando como controle positivo.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os ensaios de MTT mostram a viabilidade celular frente ao tratamento com cisplatina e a presença de HGal-4. A **Figura 43** mostra os resultados dos ensaios de MTT com células tratadas com 75 μ M de cisplatina e na presença de diferentes concentrações de HGal-4 (0,2, 1 e 5 μ M). Podemos observar que a presença somente de HGal-4 quase não altera a viabilidade das três linhagens celulares (as três barras da direita de cada célula). No entanto, verificamos que a taxa de viabilidade celular das células U87MG e T98G, que não expressam HGal-4, é ligeiramente menor quando o tratamento é realizado na presença de galectina-4 comparado à viabilidade celular na ausência desta. Já as células HT-29, que expressam HGal-4, apresentam um discreto aumento na viabilidade das células com o aumento da concentração de HGal-4 exógena.

Figura 43 – Avaliação da viabilidade das linhagens celulares U87MG (▤), T98G (▥) e HT-29 (■) frente ao tratamento com cisplatina e galectina-4 por ensaios de MTT. As células foram tratadas com 75 μ M de cisplatina e/ou galectina-4 nas concentrações de 0,2, 1 e 5 μ M, por 72 horas.

Fonte: Elaborada pela autora.

Esses dados mostram que a presença de galectina-4 não parece desempenhar nenhum papel de potencializar a morte celular no caso de U87MG. Entretanto, para as células T98G, que assim como U87MG não produzem galectina-4, se observa uma diminuição gradual da viabilidade celular quando galectina-4 é associada à cisplatina. Apesar da variação no percentual de viabilidade celular diminuir apenas sutilmente entre doses vizinhas na **Figura 43**, podemos perceber que a variação entre a amostra apenas com cisplatina e aquela contendo cisplatina e a dose máxima de galectina-4 está fora da barra de erro estatística, o que sugere que possa haver um limite mínimo de dose de galectina para que algum efeito de potencializar a morte celular possa ser percebido. Ou seja, a partir de uma dada concentração de galectina-4 externa, maior a mortalidade dessas células.

As células HT-29, que produzem galectina endógena, apresentam uma resposta distinta à presença de galectina-4 quando comparada com as células U87MG e T98G. Vemos na **Figura 43** que a presença de HGal-4 exógena nas células HT-29 funciona como uma proteção a elas, ou seja, o tratamento cisplatina+galectina-4 mata menos células HT-29.

Novamente, a variação percentual de viabilidade celular entre amostras contendo doses sequenciais de galectina-4 é pequena. Entretanto, a variação observada entre a amostra tratada com a dose máxima de galectina e aquela tratada apenas com cisplatina parece ser significativa, o que indicaria que o efeito ocorreria a partir de uma dose de galectina-4, não sendo observado para concentrações de HGal-4 abaixo de um limiar. Podemos inferir também, pelos ensaios de MTT, que a viabilidade celular está intimamente ligada à presença interna e externa da galectina-4 nas células. Em outras palavras, este é um indício de que a adição de HGal-4 ao tratamento quimioterápico pode ajudar e/ou potencializar a ação da droga para aqueles tipos de tumor onde a expressão de HGal-4 é baixa ou não detectada.

Para uma melhor avaliação do efeito de cisplatina na presença de HGal-4 exógena na viabilidade das linhagens tumorais, foi realizada também a análise por citometria de fluxo nas mesmas condições que os ensaios de MTT. O resultado da citometria das células marcadas com AnV+ e PI+ são mostrados no histograma da **Figura 44** (as células U87MG não mostraram resultados comparáveis e, portanto, não foram aqui incluídas). Os resultados obtidos na citometria de fluxo mostram que o tratamento com cisplatina na presença de galectina-4 aumenta ligeiramente a morte das células da linhagem T98G, porém esse aumento só é significativo em relação aos controles sem tratamento. Já para as células HT-29, esse efeito é mais pronunciado: o número de células mortas aumenta significativamente com o aumento de HGal-4 exógena no meio, na presença de 75 μ M de cisplatina. Como mostrado também no ensaio de MTT, a presença apenas de HGal-4 exógena no meio não altera a viabilidade das duas linhagens testadas. Este pode ser um indício de que as células HT-29, que expressam Gal-4 constitutivamente (**Figura 42**), possam ter mais ligantes para essa lectina (como mostrado na **Figura 40**) e, assim, serem mais sensíveis à ação da cisplatina na presença de HGal-4 exógena, como mostrado na **Figura 44**. No entanto, essa hipótese ainda deverá ser estudada mais a fundo futuramente.

Figura 44 - Avaliação da viabilidade das linhagens celulares T98G (□) e HT-29 (■) frente ao tratamento de cisplatina (75 μ M) na presença de diferentes concentrações de galectina-4 humana (0,2, 1 e 5 μ M). As células positivas para a marcação de AnexinaV+/PI+ são consideradas mortas/apoptóticas. As células foram tratadas por 72h com cisplatina e células sem tratamento foram consideradas como controle de viabilidade (CV). Os valores de p indica valores comparáveis, sendo que * indica $p < 0,05$, ** indica $p < 0,01$ e *** indica $p < 0,001$.

Fonte: Elaborada pela autora.

2.5 CONCLUSÕES

A produção de anticorpo policlonal anti-galectina-4 humana (anti-HGal4) foi realizada com êxito, comprovada pela alta reatividade e especificidade no reconhecimento somente da própria proteína, assim como de seus domínios CRDs isolados (**Figura 38**). Desta forma, utilizamos esses anticorpos para a detecção de expressão endógena de HGal-4 em células tumorais HT-29 (**Figura 39**).

É conhecido que células tumorais possuem maiores quantidades de glicanos/glicoconjugados em sua superfície de membrana.¹³⁷ Usufruindo da principal atividade das galectinas no que diz respeito a reconhecimento de glicanos, há um grande interesse farmacológico em se utilizar galectinas como biomarcadores em prognóstico em alguns tipos de cânceres e terapias.⁵⁵ Neste contexto, primeiramente, utilizamos as células tumorais U87MG, T98G e HT-29 na investigação de interação galectina-glicano em sistemas de membranas mais complexos, uma vez que já exploramos a interação em sistemas miméticos mais simples. Os dados estatísticos dos experimentos de citometria de fluxo (**Figura 40**) mostram que galectina-4 reconheceu todas as três linhagens celulares tumorais. Assim como foi realizado nos ensaios de hemaglutinação, procedemos o experimento de ligação/reconhecimento com as células tumorais na presença de lactose e sacarose. E, como de praxe, a adição de lactose no sistema foi capaz de inibir a interação com a membrana das células tumorais e, com a adição de sacarose, nenhum efeito foi observado. Este efeito é maior com o aumento de concentração de galectina no sistema e, no caso da HT-29, célula que expressa HGal-4, a ligação/reconhecimento é ainda maior e mais efetiva. Podemos relacionar esse maior e/ou melhor reconhecimento da HGal-4 nas células HT-29 ao fato da presença endógena e exógena de galectina-4 no meio e/ou galectina-4 ser um marcador de domínios *rafts* lipídicos em sua membrana. Como já mencionado, HT-29 são células tumorais intestinais e, portanto, devem possuir domínios do tipo *raft*. Como mostramos no capítulo 1, HGal-4 tem efeito de interação com miméticos de membrana do tipo *raft* e na presença de glicolipídios (GM1 e LPS).

Em segundo momento, investigamos o efeito da presença de HGal-4 no tratamento quimioterápico com cisplatina. A cisplatina é hoje um dos quimioterápicos mais utilizados em terapias anticâncer.¹³⁶ Nesse âmbito, examinamos a viabilidade celular frente ao tratamento com cisplatina, que mostrou eficácia de morte para as células aqui em estudo. Subsequentemente, adicionamos e variamos a concentração de galectina-4 externa à célula.

Assim como no reconhecimento de células tumorais, observamos dois aspectos distintos das respostas aos tratamentos: um para células que não expressam HGal-4 (U87MG e T 98G), onde não foi observado maiores mudanças com/sem galectina-4 exógena; e outro para aquela que expressa HGal-4, as células HT-29. Novamente, a resposta mais proeminente foi para a HT-29.

Muitos pesquisadores têm explorado a possível utilização de galectinas como marcadores de câncer. Não só a possibilidade, mas empresas como a *Galectin Therapeutics* (<http://galectintherapeutics.com/>) e a *Galecto Biotech* (<http://galecto.com/>) já se utilizam deste advento para terapias personalizadas de tratamento de cânceres. As galectinas mais investigadas até o presente momento são as galectina-1 e galectina-3, pertencentes ao grupo proto e químera, respectivamente. Entretanto, são restritas as informações acerca de galectinas do grupo *tandem-repeat*, do qual a galectina-4 faz parte. Características como multivalência e reconhecimento de diferentes tipos de ligantes fazem com que se tenham um interesse ainda maior por galectina-4. Além de marcador de malignidade em alguns tipos de câncer, em outros, onde está presente internamente, a HGal-4 pode ser não um marcador, mas um alvo a ser inibido. Inibir sua atividade pode ser um componente importante no tratamento anti-câncer.⁵⁵

Com os resultados obtidos nos Capítulos 1 e 2, acreditamos ter alcançado informações relevantes e abrangentes sobre o problema interação galectina-glicano, que vão desde a biofísica/bioquímica da proteína em si até a sua interação com sistemas mais complexos de células tumorais.

Capítulo 3

Investigação estrutural da região C-terminal do receptor
neurotensina 1

3.1 INTRODUÇÃO

No Capítulo 3, apresentamos parte do trabalho realizado durante um ano de estágio na *University of Oxford*, sob orientação do Prof. Dr. Anthony Watts. O grupo do Prof. Watts vem desde muito tempo realizando trabalhos pioneiros na interface Biologia, Química e Física, com publicações verdadeiramente multi e transdisciplinares em problemas de interesse biológico e biotecnológico, tais como pesquisa de alimentos, processamento de lipídeos e produção de bioativos relacionados a doenças diversas, desenvolvimento de pesticidas e transporte de fármacos. A abordagem empregando uma pletora de métodos biofísicos/bioquímicos, como RMN, RPE, ultracentrifugação, difração de raios-X, calorimetria, tem oferecido respostas detalhadas às questões em investigação.

Usufruindo do amplo conhecimento do grupo do Prof Watts e a infraestrutura da Universidade, trabalhamos em um dos seus principais projetos: o receptor de neurotensina-1 (NTS1). Este trabalho foi realizado em conjunto com a então aluna de doutorado Patricia M. Dijkman e, até o momento, encontra-se em processo de publicação. O trabalho completo está descrito adiante.

3.1.1 Proteínas de membrana

Em sistemas biológicos, o interesse em se determinar o arranjo estrutural de macromoléculas e como este está relacionado com funções específicas dentro das células é conhecido como paradigma estrutura-função. Dois métodos experimentais têm contribuído significativamente para desvendar aspectos desse paradigma: cristalografia por difração de raio-X e ressonância magnética nuclear (RMN). Em ambos os casos, e respeitando suas limitações, informações em nível atômicas sobre as moléculas de interesse podem ser obtidas como, por exemplo, a descrição da estrutura tridimensional. No entanto, a determinação de estrutura de macromoléculas de altas massas moleculares e instáveis, como proteínas de membrana, ainda é um desafio para esses métodos de determinação estrutural. Além disso, em muitos casos tem-se interesse não somente na descrição das distâncias inter e intramoleculares, mas também nas variações das distâncias que ocorrem próximo à condição fisiológica correspondente a mudanças em regiões relevantes relacionadas à função da proteína.

Portanto, assumindo que o entendimento de processos biológicos é determinado pela estrutura tridimensional das moléculas e pelas mudanças conformacionais que a estrutura experimenta, segue-se imediatamente que os métodos que permitem a determinação estrutural e/ou monitoram mudanças conformacionais têm um papel fundamental neste contexto. Como referido anteriormente, dois métodos são bem estabelecidos para este propósito e são altamente eficazes para proteínas globulares e solúveis. No entanto, alguns processos biológicos requerem a formação de complexos supramoleculares, e que continuam sendo um desafio para os métodos de raio-X e RMN pois envolvem proteínas que são muito difíceis de se cristalizar ou que não se reorientam rapidamente em solução, fatores limitantes para cada método, respectivamente. Há algumas estruturas de proteínas complexas disponíveis na literatura, mas que são exceções e ressaltam a importância de se desenvolverem novos métodos para tal propósito.

A determinação de estrutura de proteínas de membrana com resolução atômica tem grande interesse na biologia estrutural. As proteínas de membrana correspondem a um terço de todas as proteínas codificadas e expressas num genoma^{138, 139}, sendo também o alvo farmacológico de várias drogas utilizadas no mercado. Além disso, as mutações em proteínas de membrana podem promover doenças cardíacas, neurológicas, asma, enxaquecas, dentre outras disfunções.¹⁴⁰

3.1.2 Receptor Neurotensina 1 (NTS1)

As proteínas de membrana são responsáveis por mediar processos biológicos importantes como transporte, transdução de energia em sistemas respiratório e transdução de sinal. Em outras palavras, essas proteínas servem como interface de comunicação entre o meio externo e interno das células. Os receptores acoplados à proteína G (*G-protein coupled receptor*, GPCRs), tais como hormônios e neurotransmissores, são a maior e mais diversa família de proteínas de membrana envolvidas em respostas celulares, sendo responsáveis pela visão, olfato e paladar.¹⁴¹ Eles funcionam pela detecção de um amplo espectro de sinais extracelulares (fótons, íons, pequenas moléculas e proteínas inteiras) e, no estado ativo, os GPCRs passam por mudanças conformacionais que podem causar uma resposta celular durante o processo de sinalização.¹⁴⁰ Além disso, dada sua variedade, os GPCRs são potenciais alvo farmacológicos para o desenvolvimento de novos fármacos.

Os GPCRs são caracterizados pela presença de sete hélices transmembranas (TM) interligadas por *loops* alternados inter e extracelulares (**Figura 45a**). Eles são classificados com base em suas sequências e similaridade estrutural em 5 subfamílias: classe A (semelhante à rodopsina), classe B (semelhante à secretina), classe C (metabotrópicos de glutamato/feromônios), receptores de adesão e receptores *frizzled*.¹⁴¹ Embora possuam a mesma topologia, possuem uma baixa identidade sequencial (~20%) e diferem principalmente na região N-termial.¹⁴²

A classe A (semelhante à rodopsina) é a maior e mais estudada subfamília dentre os GPCRs e acredita-se que seus membros funcionam de forma similar no mecanismo de sinalização celular. O representante canônico dessa classe é a rodopsina, proteína GPCR mais bem conhecida e estudada até o momento. A **Figura 45b** mostra a estrutura 3D da rodopsina bovina como modelo apresentando as sete α -hélices TM conectadas por loops e a hélice 8 (H8) citoplasmática em destaque. Além disso, o motivo [NPxxY(x)5,6F] é altamente conservado na região que conecta a hélice transmembrana 7 (TM7) e a hélice 8 citoplasmática. Esta região é importante para a interação no estado ativado da rodopsina. Mutações nessa região têm mostrado alterações nos níveis de expressão do receptor, na afinidade de ligação e no acoplamento da proteína G.¹⁴³⁻¹⁴⁶

Figura 45 – Modelo de estrutura das proteínas GPCR. (a) esquema bidimensional mostrando as sete α -hélices transmembranas conectadas por loops imersas em membrana; (b) Estrutura tridimensional da rodopsina bovina (PDB ID [1F88](#)), em destaque a hélice 8.

Fonte: Adaptada de WIKIMEDIA¹⁴⁷

Além da rodopsina, a Classe A dos GPCRs também tem entre seus representantes os receptores de neurotensina. Três receptores de neurotensina foram identificados: NTS1 e NTS2 (classe A da família de GPCRs) e NTS3 (ou SORT1, membro da família sortilina).¹⁴⁸⁻¹⁵⁰ Os receptores de neurotensina são ativados pelos neurotransmissores (pequenos peptídeos conhecidos como neurotensina, NT) encontrados no sistema nervoso e tecidos periféricos que possuem papel importante numa grande variedade de atividades biológicas, tais como a modulação de neurotransmissores, hipotermia, carcinogênese, doença de Parkinson e esquizofrenia.¹⁵¹⁻¹⁵⁴ A NTS1 media a maioria dos efeitos conhecidos da ligação no NT via proteína-G_q, preferencialmente.

O receptor de neurotensina 1 (NTS1) é constituído por 424 aminoácidos formando um monômero de ~47 kDa. É uma dos poucos GPCRs que pode ser expresso em sistema bacteriano (*E. coli*) e purificado em sua forma funcional.¹⁵⁵ Recentemente, duas estruturas cristalográficas em altíssima resolução do receptor NTS1 na forma ativada foram determinadas. A primeira estrutura foi determinada por White et al.¹⁵⁶ (PDB ID [4GRV](#), **Figura 46a**) e, pela primeira vez, a estrutura de um dos membros do grupo β , da classe A da GPCR foi determinado e mostrou como o peptídeo agonista se liga à NTS1, revelando mudanças conformacionais devido à ativação. A estrutura da proteína, como esperado, possui sete hélices TM. No entanto, a região C-terminal, correspondente a hélice 8 anfipática, não apresentou densidade eletrônica. A segunda estrutura foi determinada por Egloff et al.¹⁵⁷ também no estado ativado, mostrando a estrutura canônica das GPCRs (PDB ID [3ZEV](#), **Figura 46b**). Apesar dos diferentes sistemas de produção da proteína e das condições e métodos de cristalização, as estruturas mostram uma substancial diferença entre si: a presença ou não da hélice 8 anfipática.

A presença da H8 tem sido observada em praticamente todas as estruturas de GPCR, exceto para os receptores CXCR4 e PAR1, nos quais essa região aparece de forma desordenada/desestruturada.¹⁵⁸ O NTS1 possui o motivo com a sequência [NPxxY(x)_{5,6}F] altamente conservado, em sequência a hélice TM7, com predição de formação de estrutura helicoidal que pode interagir com a membrana. Além disso, possui um par de resíduos de cisteína semi-conservativo no C-terminal, alvo de palmitoilação, que pode ancorar o C-terminal à membrana.¹⁵⁹

Figura 46 - Estruturas cristalográficas do receptor NTS-1 na forma ativada: (a) PDB ID 4GRV (b) PDB ID 3ZEV.

Fonte: Elaborada pela autora.

Estudos têm mostrado que a presença da H8 é importante para o acoplamento correto à proteína-G¹⁵⁸, bem como a interação com a membrana para o funcionamento correto do receptor. Neste parte da tese, investigamos a presença da hélice 8 do receptor NTS1 reconstituído em lipossomos compostos por lipídeos mais próximos ao natural na presença e na ausência do agonista NT, verificando mudanças estruturais e de dinâmicas decorrentes dessa interação.

3.2 OBJETIVO E JUSTIFICATIVA

O presente capítulo tem como objetivo buscar um conjunto de informações sobre a estrutura e dinâmica da região C-terminal do receptor de neurotensina-1. Desse modo, a fim de monitorar mudanças conformacionais na hélice 8, aferir a hipótese da formação de hélice propriamente nessa região e a possível finalidade no seu mecanismo funcional.

Os objetivos específicos são:

- Mutação sítio-dirigida resíduo-a-resíduo da (possível) hélice-8 na região C-terminal por resíduos de cisteína;
- Expressão e purificação de cada um dos mutantes;
- Marcação de spin sítio-dirigida dos resíduos de cisteína;
- Reconstituição em lipídios;
- “Scan de nitróxido” via espectroscopia de RPE.

3.3 MATERIAS E MÉTODOS

3.3.1 Mutantes da Hélice 8 do Receptor de Neurotensina 1 (NTS1-H8)

O NTS1 na forma funcional foi obtido através da expressão do receptor acoplado à proteínas de fusão no N- e C-terminal de forma a facilitar o direcionamento, inserção na membrana, estabilidade proteica e purificação da proteína.^{160, 161} A construção fusionada do receptor neurotensina 1 de rato (chamado de NTS1B) foi previamente descrita por Grisshammer et al.¹⁶² e White et al.¹⁶³. A construção fusionada de NTS1 de rato possui: os resíduos de 1-43 truncados, a proteína ligadora de maltose (*maltose binding protein*, MBP) ligado no N-terminal e, ligado no C-terminal, a tioredoxina (Tdx) e uma cauda deca-His estão presentes. Além disso, a NTS1B inclui dois sítios proteolíticos *tobacco etch virus* (Tev), um entre a sequência de MBP e NTS1 e, outro entre NTS1 e Tdx, permitindo a remoção das fusões no N- e C-terminal após a expressão e purificação, resultando no receptor NTS1 isolado. A presença do sítio de clivagem Tev não afeta os níveis de expressão da proteína.¹⁶² A representação da construção da proteína NTS1B é mostrada na **Figura 47** abaixo.

Figura 47 – Esquema da proteína de fusão usada par a expressão do receptor NTS1 funcional em *E. coli*.
A NTS1B consiste em MBP truncado ligado ao N-terminal e um *tag* deca-His, no C-terminal. E ainda, sítio de clivagem Tev entre MBP e NTS1 e NTS1 e Tdx para a remoção proteolítica dos parceiros de fusão.

Fonte: Adaptada de TUCKER¹⁶¹

A sequência de aminoácidos da NTS1B, imersa na membrana, é mostrada na **Figura 48**. Há cinco resíduos de cisteína nativa que foram substituídos por resíduos de alanina (Ala, A) ou serina (Ser, S), indicados em vermelho na **Figura 48**. A sequência de aminoácidos de NTS1 foi alinhada com a sequência de outros receptores da família de GPCR, que possuem a hélice 8, para a predição dos resíduos que possivelmente formariam a hélice. Baseados neste alinhamento foram escolhidos 11 resíduos (destacados em azul na **Figura 48**) para a mutação sequencial de resíduo-a-resíduo por cisteína.

Figura 48 - Representação do receptor NTS1 em membrana. Em vermelho são mostrados os resíduos de cisteína nativa mutados por Ala ou Ser e em azul claro, os resíduos mutados subsequentemente por cisteínas uma-a-uma.

Fonte: Adaptada de SHIBATA¹⁶⁴

Cada um dos 11 mutantes da hélice 8 da neurotensina-1 (especificados na **Tabela 10**) foram produzidos seguindo-se o protocolo do kit QuikChange[®] Site-Directed Mutagenesis (Stratagene). Este kit tem alta eficiência e é muito utilizado para produzir mutações pontuais, trocar aminoácidos e deletar ou introduzir um ou mais resíduos. O método utilizado pelo kit QuikChange[®] consiste em uma reação em cadeia da polimerase (PCR) e utilizando a PfuTurbo[®] High Fidelity DNA polimerase de alta fidelidade. Brevemente, o procedimento básico utiliza dupla fitas de DNA como molde e dois *primers* de oligonucleotídeos sintéticos contendo a mutação desejada. Para cada mutante, *primers* de oligonucleotídeos foram “desenhados” e sintetizados pela Sigma-Aldrich (Apêndice A). O DNA resultante da reação de PCR foi transformado em células competentes de *E. coli* DH5 α e o DNA plasmidial foi purificado utilizando-se o kit QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen). Todos os mutantes foram confirmados pelo sequenciamento de DNA (Source BioScience, UK).

Tabela 10 - Os 11 mutantes da hélice H8 da proteína NTS1: cada um dos mutantes foi nomeado com a letra do resíduo nativo, posição sequencial e a letra C correspondendo à mutação por cisteína.

Mutantes da hélice 8 do NTS1	
-- A N F R Q V F L S T L --	
A374C	F380C
N375C	L381C
F376C	S382C
R377C	T383C
Q378C	L384C
V379C	

Fonte: Elaborada pela autora.

3.3.2 Expressão e Purificação dos mutantes H8-NTS1

Cada um dos 11 mutantes da construção fusionada do receptor de neurotensina-1 de rato (NTS1B) foi expresso e purificado seguindo o protocolo descrito por Attrill et al ¹⁶⁵ com algumas modificações. O NTS1B foi transformado em *E. coli* BL21 (DE3) por choque térmico e plaqueado em LB-Ágar contendo 100 µg/mL de ampicilina (amp). Para a expressão proteica, 5 mL de cultura foi superexpresso para inocular 500 mL de meio extrato de levedura-triptona duas vezes (2xTY) suplementado com 0,2% (w/v) de glicose na presença de 100 µg/mL de amp, em frascos de 2 L e incubados sob agitação a 200 rpm, à 37°C. As culturas foram crescidas até a DO_{600nm} atingir ~ 0,3 e, então, a temperatura foi reduzida a 26°C e a expressão induzida com 0,25 mM de IPTG quando a DO_{600nm} atingiu 0,5 e mantidas sob agitação *overnight*. As células foram centrifugadas a 7000 g por 10 minutos, congeladas em N₂ líquido e armazenadas em -80°C.

Todos os passos da purificação foram realizadas à 4°C. Cada ~ 20g de *pellet* de célula foi ressuspensionado em 40 mL de tampão de solubilização 2x (100 mM Tris pH 7,40, 400 mM NaCl e 60% glicerol (v/v)), inibidores de protease (Leupeptina, Pepstatina A e Aprotinina, todos a 1 µg/mL) e homogeneizadas. Foi adicionado lisozina na concentração final de 1 mg/mL e mantido sob agitação branda por 20 minutos e sob refrigeração. Em seguida, os estoques de detergente DDM (10% (w/v)) e CHAPS/CHS (5%/1% (w/v)) foram adicionados gota a gota, e sob agitação branda, para a concentração final de 1% (w/v) e 0.5%/0.1% (w/v), respectivamente. Água MilliQ foi adicionada para o volume final de 80 mL e a solução

mantida sob agitação branda, por 6 horas em câmara fria. Após essas etapas, as células foram isoladas do meio de cultura por centrifugação a 70.000 g e a 4 °C por 90 minutos. O sobrenadante foi filtrado em filtro 0,22 µm e suplementado com inibidores de protease e imidazol à concentração final de 50 mM.

O material solubilizado foi purificado por cromatografia de afinidade com metal imobilizado (IMAC - *Immobilised Metal Affinity Chromatography*) em coluna 5 mL HisTrap HP (GE Healthcare, EUA). A coluna foi previamente equilibrada com tampão NiA (50 mM Tris pH 7,40, 200 mM NaCl, 50 mM imidazol, 10% glicerol, 0,5% CHAPS, 0,1% DDM, 0,1% CHS) suplementado com inibidores de protease. O material solubilizado foi então passado pela coluna e, posteriormente, a coluna foi lavada com aproximadamente 50 volumes de coluna (CV) com NiA e a proteína eluída com tampão NiB (tampão NiA acrescida de 500 mM de imidazol). As frações eluídas de proteína foram agrupados e diluída com tampão NiO (50 mM Tris pH 7,4, 15% glicerol, 0,1% DDM (w/v), 0,01% CHS (w/v)) para a concentração final de imidazol a 100 mM.

A proteína eluente da etapa de IMAC foi tratada com Tev protease (protocolo de produção da Tev protease encontra-se em Apêndice X), para a clivagem das proteínas de fusão MBP e Trx da proteína NTS1, incubando-se o NTS1B com a Tev protease na razão mola 1:1 e a adição de 10 mM de ditioneitol (DTT), sob agitação a 4°C *overnight*. A mistura de clivagem foi filtrada em filtro 0,22 µm e passada por uma coluna NT (coluna produzida pela Dra Dijkman ¹⁶⁶) pré-equilibrada com tampão NT0. Essa mistura foi incubada na coluna por 3 horas numa roda giratória a 4°C. A coluna de NT foi lavada com aproximadamente 50 mL de tampão NT70 e NT150 (tampão NT0 com adição de 70 mM e 150 mM de NaCl, respectivamente). A proteína NTS1 foi eluída com tampão NT1 (tampão NT0 com adição de 1 M de NaCl) e frações de 2 mL foram coletadas. O grau de pureza e clivagem foi analisado por SDS-PAGE 15% e a quantificação das proteínas foram feitas medindo-se a absorção em 280 ($\epsilon_{\text{clivado}} = 56840 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). As frações da eluição da proteína foram unidas apropriadamente.

3.3.3 Marcação de Spin dos mutantes H8-NTS1

A solução final de proteínas obtida depois da coluna NT é, tipicamente, bem diluída. Desta forma, ao invés de se concentrar as amostras em um concentrador de centrífuga, que também concentraria linearmente a quantidade de detergentes, afetando a atividade proteica, utilizamos colunas de 1 mL de Ni para ligar todas as proteínas na coluna e, então, eluí-las em um volume relativamente menor, para a remoção do sal e tê-las mais concentradas para o processo de marcação. Além disso, a construção NTS1 possui seis resíduos de histidina extras no C-terminal para a realização desta etapa.

A proteína eluente da coluna de NT foi incubada com 10 mM de DTT para reduzir as cisteínas enquanto equilibra-se a coluna de Ni 1 mL HisTrap HP (GE Healthcare, EUA) com tampão NTA0 (50 mM Tris pH 7,40, 200 mM NaCl, 15% glicerol, 0,1% DDM, 0,01% CHS). Esta mistura foi passada pela coluna de Ni e lavada aproximadamente com 75 mL de tampão NTA0. A eluição da proteína foi realizada com 80% de tampão NTB0 (tampão NTA0 com adição de 500 mM de imidazol) em frações de 0,350 mL. As frações que contêm proteínas foram agrupadas e a concentração calculada.

Para a marcação de spin das proteínas, as amostras foram incubadas com o marcador de spin MTSL em excesso molar de 20 vezes por 1 hora a temperatura ambiente. A remoção do excesso de marcador foi realizada por cromatografia de exclusão molecular (em coluna 5 mL HiTrap Desalting, GE Healthcare, EUA) em tampão SE (50 mM Tris pH 7,40, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 15% glicerol, 0,1% DDM (w/v), 0,01% CHS (w/v)).

3.3.4 Reconstituição em Lipídeos dos mutantes H8-NTS1

Os lipídeos polares de cérebro (Avanti Polar Lipids) foram solubilizados em uma mistura de 50:50 metanol:clorofórmio em um frasco de fundo redondo para a concentração final de 5 mg/mL. A mistura foi secada em um fluxo de nitrogênio para a formação de um filme de lipídeo e, posteriormente, deixada *overnight* num dessecador. O filme foi ressuspenso em tampão de reconstituição (50 mM Tris pH7,40, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA) e sonificado 3 vezes por 1 minuto. Então, dez ciclos de congelamento/descongelamento foram realizados antes de se proceder com a extrusão usando-se filtro de 0,1 µm.

Os lipídeos foram adicionados à razão proteína:lipídeo de 1:1500 e incubados por 1 hora a 4°C sob agitação branda. Bio-beads (Bio-beadsTM SM-2 Adsorbent, BioRad) foi

adicionado na concentração final de 240 mg de bio-beads por mL e incubados *overnight* a 4°C. Foi retirado todo o líquido restante e a amostra centrifugada a 100.000 g por 3 horas. O pellet foi ressuspenso em tampão de reconstituição final (50 mM Tris pH 7,40, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA) e, só então, as amostras estão prontas para as medidas de RPE

3.3.5 “Scan de nitróxidos” por Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)

Os experimentos de RPE foram conduzidos no *Centre of Advanced Electron Spin Resonance (CAESR), Department of Chemistry, University of Oxford, Oxford, UK*. Os espectros de CW-RPE foram coletados em banda-X no espectrômetro Bruker EMX (Bruker Corporation, EUA). Os proteolipossomos marcados foram inseridos em tubos capilares. Os espectros foram coletados a uma potência de 10 mW com a modulação de 2,0 G nas temperaturas de 277 e 170 K. Os espectros foram normalizados pela área.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A sequência de resíduos da hélice H8 foi predita pelo alinhamento sequencial do NTS1 com todas as sequências de GPCRs com estrutura tridimensional já determinada e disponíveis no PDB (utilizando-se a ferramenta online Jpred3¹⁶⁷). Todas as estruturas resolvidas de GPCR conhecidas, até o momento, possuem a hélice H8 citosólica imediatamente seguida da TM7 e paralela à superfície de membrana (exceto a CXCR4 e PAR1, mencionado anteriormente). Consequentemente, cada substituição por resíduo de cisteína foi realizada utilizando-se o receptor NTS1 nativo sem cisteínas livres para a produção dos onze mutantes H8-NTS1. Todos os mutantes foram produzidos com sucesso como apresentado nas seções subsequentes.

3.4.1 Expressão, Purificação, Marcação de Spin e Reconstituição dos mutantes H8-NTS1

O receptor de neurotensina-1 é um dos poucos da classe A de GPCRs que pode ser expresso em *E. coli* e purificado na sua forma funcional.^{155, 168-171} Além disso, é possível a produção de mutantes como aqueles aqui apresentados e que permitem estudos como os de marcação de spin sítio dirigida (SDSL). Os mutantes H8-NTS1 foram expressos e purificados com alto grau de pureza como mostrado no gel SDS-PAGE do mutante A347C (**Figura 49**). Todos os mutantes apresentaram o mesmo perfil de purificação, portanto, apresentamos somente um gel típico obtido para um dos mutantes. O rendimento de purificação ficou em torno de 2-5 nmol em cada 10 L de cultura para cada construção.

Figura 49 - Análise por eletrofores em gel SDS-PAGE 15% da purificação do mutante A374C-NTS1. A seta indica a massa aparente do mutante ~44 kDa.

Fonte: Elaborada pela autora.

3.4.2 “Scan de nitróxido” por Ressonância Paramagnética Eletrônica de Onda Contínua (CW-RPE)

A inserção do resíduo de cisteína em determinados lugares na proteína através da mutação sítio-dirigida e a sua subsequente marcação de spin dá origem a proteínas RPE-ativas com uma cadeia lateral de nitróxido que pode ser utilizada para obter informações do ambiente local em que a sonda se encontra. Esta é a ideia básica do chamado método de marcação de spin sítio-dirigida (SDSL). Nesta parte do trabalho, realizamos “scan de nitróxido” numa série de onze mutantes do receptor NTS1 reconstituído em modelos de membrana. O “scan de nitróxido” permite modelar a estrutura da proteína com resolução espacial em nível de cadeia principal.¹⁷² A acessibilidade ao solvente e a mobilidade da cadeia lateral do resíduo onde se encontra o radical nitróxido podem ser determinadas pelo segundo momento do espectro $\langle H^2 \rangle^{-1}$ e/ou pela largura da linha central do espectro de RPE (ΔH_0^{-1}) .^{172, 173}

No caso de interesse, examinamos a mobilidade dos marcadores de spin ligados aos resíduos de cisteínas nas posições 374 a 384 na região C-terminal, correspondentes à hélice 8. Para isso, cada mutante foi expresso, purificado, marcado com sonda magneticamente ativa e reconstituído em BPLs, como descrito anteriormente, e os subsequentes espectros de CW-RPE foram coletados e analisados. A **Figura 50** mostra os espectros de RPE para cada mutante em função da posição de cada resíduo. As linhas dos espectros são tipicamente características de marcador de spin em regime de movimento lento a intermediário, onde a ordem de grandeza do movimento é de microsegundos. Os espectros mostram que os mutantes foram eficientemente marcados e os marcadores, de fato, reportam a dinâmica local do receptor em proteolipossomos.

Baseados na análise qualitativa das linhas espectrais, podemos dividir os espectros em dois grupos gerais. Os espectros dos resíduos 377, 383 e 384 são característicos de movimentos intermediários e apresentam uma segunda componente espectral. Espectros com multicomponentes têm sido associados a contatos terciários experimentados pelo resíduo. Contudo, movimentos mais rápidos quando comparados com resíduos em outras posições indicam que esses três resíduos são aqueles com as cadeias laterais (onde os spins estão localizados) que apontam para fora do proteolipossomo, dando origem a movimentos menos restritos. Todos os outros espectros estão num regime de movimento mais lento, limitados numa situação mais imobilizada.

Figura 50 - Espectros de CW-RPE dos mutantes da hélice 8 do receptor NTS1.

Fonte: Elaborada pela autora.

De forma a obtermos mais informações a respeito do tipo de estrutura secundária adotada pela hélice 8 no lipossomo, realizamos uma análise semiquantitativa baseada na variação do parâmetro ΔH_0^{-1} em função da posição residual. O inverso da largura da linha central é facilmente determinado e é um parâmetro confiável para caracterizar estrutura secundária em proteínas.¹⁷² A **Figura 51** mostra o gráfico dos valores de ΔH_0^{-1} *versus* número residual e, claramente, exibe uma função senoidal com periodicidade associado à mobilidade de estruturas do tipo α -helicoidal (período de aproximadamente 3,6). Esta é uma indicação notória de que os resíduos na região H8 estão de fato formando uma estrutura α -helicoidal no proteolipossomo. Nossos resultados sugerem fortemente que a estrutura em hélice é adotada nessa região e, baseado na presença ubíquota nas GPCRs, deve possuir um papel funcional na via de transdução de sinal característico dessa família de proteínas de membrana.

Figura 51 - Análise da periodicidade da hélice 8 por CW-RPE. O parâmetro ΔH_0^{-1} foi determinado através dos espectros de cw-RPE coletados a 277 K, e plotados em função do número residual.

Fonte: Elaborada pela autora.

Posteriormente, foi realizada a mutação dos 9 resíduos subsequentes na sequência de aminoácidos do receptor NTS1 para verificar se a hélice 8 se estenderia para mais alguns resíduos (esta parte do trabalho foi realizada pela Dra. Dijkman, sob orientação do Prof. Watts, *University of Oxford*). Os resíduos mutados para cisteína de 385 a 393 são indicados na **Figura 52** abaixo e seguiram o mesmo protocolo de expressão e purificação que os demais mutantes. O painel completo de todos os parâmetros ΔH_0^{-1} dos vinte resíduos analisados é mostrado em preto na **Figura 53**. Observamos que existe um padrão senoidal com período de $\sim 3,6$ do resíduo 374 ao 385 e, após este, a periodicidade é perdida. Esta periodicidade implica que o receptor NTS1 possui a α -hélice na região C-terminal, sendo que esta hélice estende-se dos resíduos 374 a 385.

Figura 52 – Sequência e número dos resíduos de aminoácidos que seguiram a mutação sítio-dirigida para a subsequente análise de formação da hélice 8.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 53 – Painel completo dos vinte mutantes para análise da periodicidade da hélice 8 por CW-RPE. O parâmetro ΔH_0^{-1} foi determinado através dos espectros de CW-RPE coletados a 277 K, e plotados em função do número residual. Em preto, mutantes do receptor NTS1 na conformação apo e, em vermelho, na presença do agonista NT. Em ambas as condições, observamos uma função senoidal, que se estende do resíduo 374 a 385, com periodicidade $\sim 3,6$.

Fonte: Elaborada parte pela autora e parte pela Dra. Patricia M Dijkman¹⁶⁶

Investigamos também o efeito do agonista NT na estruturação de H8. Observamos que a periodicidade do parâmetro de mobilidade na presença do agonista NT (em vermelho na **Figura 53**) manteve-se inalterada comparada à conformação apo (em preto), indicando que a hélice 8 mantém a mesma conformação helicoidal. Analisando os espectros de CW-RPE de cada um dos mutantes separadamente, na ausência e na presença do agonista, verificamos que os espectros apresentam diferenças para alguns resíduos (**Figura 54**). Este dado indica que o micro-ambiente de cada um dos mutantes sofre pequenas alterações devido à ligação de NT.

Fazendo uma análise dos espectros similar àquela adotada para HGal-4 (**Figura 37**), podemos perceber que há mudanças nas intensidades espectrais para os resíduos 377, 378, 379, 380, 382, 385, 387, 388 e 389. Em particular, as maiores diferenças na forma de linha dos espectros quando da adição do agonista estão sempre na componente espectral mais móvel (o assinalamento no espectro de componente móvel e imóvel segue a definição anterior de HGal-4 na **Figura 32**). Nos demais casos as alterações não são significativas. Os resíduos cujos espectros de RPE apresentam mudanças podem ser divididos em dois grupos: aqueles em que a mobilidade da sonda foi aumentada (sinal mais intenso) ou diminuída (menos intenso).

Lembrando que a hélice H8 compreende os resíduos 374 ao 385, podemos notar que os resíduos 377 ao 382 localizados nesta região sofrem um aumento de mobilidade quando o agonista se liga ao receptor no lado externo da membrana. A restrição maior de movimento ocorre nos resíduos subsequentes 385, 387 e 389, sendo mais pronunciada apenas neste último. Tais mudanças indicam que a porção da estrutura do receptor em que se localiza a hélice H8 mantém sua estrutura conformacional (**Figura 53**) e tem sua dinâmica ligeiramente aumentada quando da adição do agonista. A maior dinâmica experimentada pela hélice H8 pode ser o mecanismo molecular adotado pelo NTS1 para facilitar a ligação com a proteína-G, assim iniciando o processo de transdução de sinal.

De forma a complementar esses estudos, os membros do grupo do Prof. Watts continuaram a investigação utilizando um peptídeo sintético equivalente à sequência dos resíduos de S373 a C388 da hélice 8 do receptor NTS1. O intuito foi examinar a interação/dependência desse mimético da hélice H8 com a membrana através das técnicas de CD e de simulações de dinâmica molecular (MD). O espectro de CD obtido mostra que o peptídeo correspondente à hélice 8 não apresenta estrutura em água. Com a adição de miméticos de membrana (diferentes composições), o peptídeo passa a apresentar espectros de CD compatível com uma estrutura helicoidal. Além disso, a estabilidade estrutural do peptídeo depende do tipo de lipídeos constituintes do lipossomo.¹⁶⁶ Esses resultados suportam os resultados de RPE com o receptor NTS1 e indicam que a presença dos sistema membranas é capaz de estabilizar a estrutura da hélice H8.

Figura 54 - Espectros de CW-RPE de cada um dos mutados referente a região de 374 a 387 no C-terminal.
Na conformação apo (—) e na presença do agonista NT (—).

Fonte: Elaborada parte pela autora e parte pela Dra. Patricia M Dijkman¹⁶⁶

3.5 CONCLUSÕES

Os receptores acoplados à proteína G (GPCR) são parte de uma importante família de proteínas de membrana que está envolvida em vários processos de sinalização celular e possui um enorme interesse farmacológico, sendo o principal alvo de vários fármacos disponíveis no mercado (mais de 30% dos fármacos conhecidos).¹⁷⁴ Portanto, as estruturas das GPCRs são extremamente informativas em termos de compreensão de interação entre GPCR e efetores intracelulares e, conseqüentemente, ricas fontes de dados sobre a forma de como a sinalização celular ocorre.

Neste contexto, o receptor de neurotensina 1 (NTS1) é um bom sistema-modelo pois é uma das poucas proteínas de membrana que possui protocolo de expressão/purificação heteróloga bem estabelecidos para a sua produção de forma funcional. Isto permite que sejam realizados estudos desse receptor em ambientes diversos e sob condições físico-químicas variadas. A presente parte desta tese de doutorado envolve, portanto, o estudo *in vitro* do receptor NTS1. Mais especificamente, realizamos a mutação sítio-dirigida de 11 resíduos da hélice H8 do receptor NTS1, onde os resíduos nativos foram substituídos por cisteínas, que por sua vez, foram marcados com marcador de spin para os subseqüentes experimentos de CW-RPE. O objetivo principal foi obter informação estrutural sobre a hélice H8 quando a proteína como um todo é reconstituída em lipossomos que mimetizam condições próximas às fisiológicas. Os mutantes, a marcação sítio dirigida e os experimentos de RPE foram realizados com sucesso. O valor do inverso da largura da linha central do espectro de RPE das proteínas mutantes marcadas foi usado como medida de dinâmica e estrutura da hélice H8. O comportamento deste parâmetro mostra claramente uma periodicidade de 3,6, entre os resíduos 374 a 385, que é compatível com estruturas α -helicoidais. Desta forma, comprovamos a existência da hélice 8 na região N-terminal, em solução, do receptor NTS1, que até então era controverso. Além disso, a análise qualitativa do comportamento experimentado pela sonda magnética ao longo da sequência de resíduos que contém a hélice H8 mostra que a presença do agonista é capaz de levar a alterações da dinâmica de algumas porções dessa região da proteína. Em particular, é observado um aumento da dinâmica de resíduos que compõem a hélice H8, o que pode ser o gatilho molecular que permite a interação entre o receptor NTS1 e a proteína-G.

Além da produção de resultados novos acerca da conformação adotada pela hélice H8 do receptor NTS1, esta parte do projeto permitiu a consolidação do trabalho com métodos

biofísicos como a marcação de spin sítio dirigida, técnica que teve participação pioneira de nosso grupo para sua implementação no Brasil, e que foi, neste trabalho, utilizada em sua plenitude com a investigação de uma proteína integral de membrana que incluiu o planejamento, a produção, a marcação e a reconstituição em protolipossomos de mutantes dessa proteína para os subsequentes experimentos de RPE. O estabelecimento de uma sólida colaboração com um grupo de excelência, como o do Prof. Watts, e a disseminação do *know-how* assim adquirido têm consequências amplas no que tange à formação de pessoal em nosso grupo e, conjuntamente, com os resultados científicos produzidos finalizam o projeto de forma bastante satisfatória.

REFERÊNCIAS

- 1 MARTH, J. D. A unified vision of the building blocks of life. **Nature Cell Biology**, v. 10, n. 9, p. 1015-1016, 2008.
- 2 SHARON, N.; LIS, H. Lectins as cell recognition molecules. **Science**, v. 246, n. 4927, p. 227-234, 1989.
- 3 CUMMINGS, R. D.; PIERCE, J. M. The challenge and promise of glycomics. **Chemistry & Biology Review**, v. 21, n. 1, p. 1-15, 2014.
- 4 GABIUS, H. J.; KAYSER, K. Introduction to glycopathology: the concept, the tools and the perspectives. **Diagnostic Pathology**, v. 9, p. 4-18, 2014. Doi: 10.1186/1764-1596-9-4.
- 5 DUBE, D. H.; BERTOZZI, C. R. Glycans in cancer and inflammation-potential for therapeutics and diagnostics. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 6, p. 477-488, 2005.
- 6 OHTSUBO, K.; MARTH, J. D. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. **Cell**, v. 126, n. 5, p. 855-867, 2006.
- 7 WYMAN, M. P.; SCHNEITER, R. Lipid signaling in disease. **Nature Reviews of Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 2, p. 162-176, 2008.
- 8 NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 5th ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2013.
- 9 SPIRO, R. G. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. **Glycobiology**, v. 12, n. 4, p. 43R-56R, 2002.
- 10 STEPPER, J. et al. Cystein S-glycosylation, a new post-translational modification found in glycopeptide bacteriocins. **FEBS Letter** v. 585, n. 4, p. 645-650, 2011.
- 11 DRICKAMER, K.; TAYLOR, M. E. Biology of animal lectins. **Annual Review of Cell Biology**, v. 9, p. 237-264, 1993. DOI 10.1146/annurev.cb.090110193.00132
- 12 SHARON, N.; LIS, H. Lectins: Cell-agglutinating and sugar-specific proteins. **Science**, v. 177, n. 53, p. 949-959, 1972.

- 13 VARKI, A. et al. **Essentials of glycobiology**. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009.
- 14 LIS, H.;SHARON, N. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. **Chemical Reviews** v. 98, n. 2, p. 637-674, 1998.
- 15 ZELENSKY, A. N.;GREADY, J. E. The C-type lectin-like domain superfamily. **FEBS Journal**, v. 272, n. 24, p. 6179-6217, 2005.
- 16 ODOM, E. W.;VASTA, G. R. Characterization of a binary tandem domain F-type lectin from striped bass (*Morone saxatilis*). **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 3, p. 1698-1713, 2006.
- 17 VASTA, G. R. et al. Structural and functional diversity of the lectin repertoire in teleost fish: relevance to innate and adaptive immunity. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 35, n. 12, p. 1388-99, 2011.
- 18 COOPER, D. N. W. Galectinomics: finding themes in complexity. **Biochimica et Biophysica Acta** v. 1572, n. 2-3, p. 209-231, 2002.
- 19 COOPER, D. N. W.;BARONDES, S. H. God must love galectins; he made so many of them. **Glycobiology**, v. 9, n. 10, p. 979-984, 1999.
- 20 KASAI, K.;HIRABAYASHI, J. Galectins: a family of animal lectins that decipher glycodes. **Journal of Biochemistry**, v. 119, n. 1, p. 1-18, 1996.
- 21 DAM, T. K.;BREWER, F. C. Maintenance of cell surface glycan density by lectin-glycan interactions: a homeostatic and innate immune regulatory mechanism. **Glycobiology**, v. 20, n. 9, p. 1061-1064, 2010.
- 22 RABINOVICH, G. A.;TOSCANO, M. A. Turning 'sweet' on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 5, p. 338-352, 2009.
- 23 LIU, F. T.;RABINOVICH, G. A. Galectins: regulators of acute and chronic inflammation. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 1183, p. 158-182, 2010. Doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.05131.x
- 24 DELACOUR, D. et al. Galectin-4 and sulfatides in apical membrane trafficking in enterocyte-like cells. **Journal of Cell Biology**, v. 169, n. 3, p. 491-501, 2005.

- 25 LIU, F. T.;RABINOVICH, G. A. Galectins as modulators of tumour progression. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 1, p. 29-41, 2005.
- 26 GRASSADONIA, A. et al. 90K (Mac-2 BP) and galectins in tumor progression and metastasis. **Glycoconjugate Journal**, v. 19, n. 7-9, p. 551-556, 2004.
- 27 CARLSSON, S.;CARLSSON, M. C.;LEFFLER, H. Intracellular sorting of galectin-8 based on carbohydrate fine specificity. **Glycobiology**, v. 17, n. 9, p. 906-912, 2007.
- 28 TAKENAKA, Y.;FUKUMORI, T.;RAZ, A. Galectin-3 and metastasis. **Glycoconjugate Journal**, v. 19, n. 7-9, p. 543-549, 2004.
- 29 HUGHES, R. C. Galectins in kidney development. **Glycoconjugate Journal**, v. 19, n. 7-9, p. 621-629, 2004.
- 30 WATT, D. J.;JONES, G. E.;GOLDRING, K. The involvement of gal-1 in skeletal muscle determination differentiation and regeneration. **Glycoconjugate Journal**, v. 19, n. 7-9, p. 615-9, 2004.
- 31 HIRASHIMA, M. et al. Galectin-9 in physiological and pathological conditions. **Glycoconjugate Journal**, v. 19, n. 7-9, p. 593-600, 2004.
- 32 SATO, S.;J., N. Seeing strangers or announcing 'danger': galectin-3 in two models of innate immunity. **Glycoconjugate Journal**, v. 19, n. 7-9, p. 583-591, 2002.
- 33 RABINOVICH, G. A.;RUBINSTEIN, N.;TOSCANO, M. A. Role of galectins in inflammatory and immunomodulatory processes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1572, n. 2-3, p. 274-284, 2002.
- 34 ADAMS, L.;SCOTT, G. K.;WEINBERG, C. S. Biphasic modulation of cell growth by recombinant human galectin-1. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1312, n. 2, p. 137-144, 1996.
- 35 KOPITZ, J. et al. Negative regulation of neuroblastoma cell growth by carbohydrate-dependent surface binding of galectin-1 and functional divergence from galectin-3. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 38, p. 35917-23, 2001.
- 36 SANFORD, G. L.;HARRIS-HOOKER, S. Stimulation of vascular cell proliferation by beta-galactoside specific lectins. **The FASEB Journal**, v. 4, n. 11, p. 2912--8, 1990.

- 37 GALVAN, M. et al. Expression of a specific glycosyltransferase enzyme regulates T cell death mediated by galectin-1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 22, p. 16730-7, 2000.
- 38 PERILLO, N. L. et al. Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. **Nature**, v. 378, n. 6558, p. 736-739, 1995.
- 39 ELOLA, M. T. et al. Galectin-1 receptors in different cell types. **Journal of Biomedical Science**, v. 12, n. 1, p. 13-29, 2005.
- 40 WADA, J.; MAKINO, H. Galectins , galactoside-binding mammalian lectins: clinical application of multi-functional proteins. **Acta Medica Okayama**, v. 55, n. 1, p. 11-17, 2001.
- 41 RABINOVICH, G. A. et al. Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? **TRENDS in Immunology**, v. 23, n. 6, p. 313-320, 2002.
- 42 GUARDIA, C. M. A. et al. An integrated computational analysis of the structure, dynamics, and ligand binding interactions of the human galectin network. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 51, n. 8, p. 1918-1930, 2011.
- 43 MASSA, S. M. et al. L-29 an endogenous lectin binds to glycoconjugate ligands with positive cooperativity. **Biochemistry**, v. 32, n. 1, p. 260-267, 1993.
- 44 LOPEZ-LUCENDO, M. F. et al. Growth-regulatory human galectin-1: crystallographic characterisation of the structural changes induced by single-site mutations and their impact on the thermodynamics of ligand binding. **Journal of Molecular Biology**, v. 343, n. 4, p. 957-970, 2004.
- 45 HIRABAYASHI, J.; KASAI, K. Effect of amino acid substitution by site-directed mutagenesis on the carbohydrate recognition and stability of human 14-kDa beta-galactoside-binding lectin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 35, p. 23648-23653, 1991.
- 46 LEFFLER, H.; BARONDES, S. H. Specificity of binding of three soluble rat lung lectins to substituted and unsubstituted mammalian beta-galactosides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 22, p. 10119-10126, 1986.
- 47 HUFLEJT, M. E. et al. Strikingly different localization of galectin-3 and galectin-4 in human colon adenocarcinoma T84 Cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 22, p. 14294-14303, 1997.

48 HUANG, X.;MILLER, W. A time-efficient, linear-space local similarity algorithm. **Advances in Applied Mathematics**, v. 12, n. 3, p. 337-357, 1991.

49 RECHRECHE, H. et al. Cloning and expression of the mRNA of human galectin-4, an S-type down-regulated in colorectal cancer. **European Journal of Biochemistry**, v. 248, n. 1, p. 225-230, 1997.

50 KREJCIRIKOVA, V. et al. Structure of the mouse galectin-4 N-terminal carbohydrate-recognition domain reveals the mechanism of oligosaccharide recognition. **Acta Crystallographica Section D**, v. 67, n. 3, p. 204-211, 2011.

51 RUSTIGUEL, J. K. et al. Recombinant expression, purification and preliminary biophysical and structural studies of C-terminal carbohydrate recognition domain from human galectin-4. **Protein Expression and Purification**, v. 118, p. 39-48, 2016. Doi: 10.1016/j.pep.2015.09.026.

52 BUM-ERDENE, K. et al. Structural characterization of human galectin-4 C-terminal domain: elucidating the molecular basis for recognition of glycosphingolipids, sulfated saccharides and blood group antigens. **FEBS Journal**, v. 282, n. 17, p. 3348-67, 2015.

53 RUSTIGUEL, J. K. **Caracterização estrutural e avaliação de aspectos funcionais de galectinas humanas do grupo *tandem-repeat***. 2014. 180 p. (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

54 ODA, Y. et al. Soluble lactose-binding lectin from rat intestine with two different carbohydrate-binding domains an the same peptide chain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 8, p. 5929-5939, 1993.

55 HUFLEJT, M. E.;LEFFLER, H. Galectin-4 in normal tissues and cancer. **Glycoconjugate Journal**, v. 20, n. 4, p. 247-255, 2004.

56 HIRABAYASHI, J. et al. Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography. **Biochimica et Biophysica Acta** v. 1572, n. 2-3, p. 232-254, 2002.

57 BREWER, C. F. Binding and cross-linking properties of galectins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1572, n. 2-3, p. 255-262, 2002.

58 WASANO, K.;HIRAKAWA, Y. Two domains of rat galectin-4 bind to distinct structures of the intercellular borders of colorectal epithelia. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 47, n. 1, p. 75-82, 1999.

- 59 WU, A. M. et al. Fine specificity of domain-I of recombinant tandem-repeat-type galectin-4 from rat gastrointestinal tract (G4-N). **Biochemical Journal**, v. 367, n. Pt 3, p. 653-664, 2002.
- 60 WU, A. M. et al. Lectins as tools in glycoconjugate research. **Glycoconjugate Journal**, v. 26, n. 8, p. 899-913, 2009.
- 61 SORME, P. et al. Fluorescence polarization as an analytical tool to evaluate galectin-ligand interactions. **Analytical Biochemistry**, v. 334, n. 1, p. 36-47, 2004.
- 62 MARKOVÁ, V. et al. Role of the carbohydrate recognition domains of mouse galectin-4 in oligosaccharide binding and epitope recognition and expression of galectin-4 and galectin-6 in mouse cells and tissues. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 18, n. 1, p. 65-76, 2006.
- 63 BRACCIA, A. et al. Microvillar membrane Microdomains exist at physiological temperature - Role of galectin-4 as lipid raft stabilizer revealed by "superrafts". **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 18, p. 15679-15684, 2003.
- 64 HANSEN, G. H. et al. Lipid rafts exist as stable cholesterol-independent microdomains in the brush border membrane of enterocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 34, p. 32338-44, 2001.
- 65 KONDOH, N. et al. Identification and characterization of genes associated with human hepatocellular carcinogenesis. **Cancer Research**, v. 59, n. 19, p. 4990-4996, 1999.
- 66 HIPPO, Y. et al. Differential gene expression profiles of scirrhous gastric cancer cells with high metastatic potential to peritoneum or lymph nodes. **Cancer Research**, v. 61, n. 3, p. 889-895, 2001.
- 67 SAUSSEZ, S. et al. Toward functional glycomics by localization of tissue lectins: immunohistochemical galectin fingerprinting during diethylstilbestrol-induced kidney tumorigenesis in male Syrian hamster. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 123, n. 1, p. 29-41, 2005.
- 68 ZIMBARDI, A. L. L. R. et al. Cloning, expression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the N-terminal carbohydrate-recognition domain of human galectin-4. **Acta Crystallographica Section F**, v. 66, n. Pt 5, p. 542-545, 2010.
- 69 GILL, S. C.; VON HIPPEL, P. H. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. **Analytical Biochemistry**, v. 182, n. 2, p. 319-326, 1989.

70 IDEO, H. et al. High-affinity binding of recombinant human galectin-4 to SO₃- $\rightarrow$ 3Gal β 1 $\rightarrow$ 3GalNAc pyranoside. **Glycobiology**, v. 12, n. 3, p. 199-208, 2002.

71 HIRABAYASHI, J. **Isolation and binding assay of galectins**. 2014. Disponível em: < <http://jcggdb.jp/GlycoPOD/protocolShow.action?nodeId=t123> >. Acesso em: 08 dez 2015.

72 WALLACE, B. A.; JAMES, R. W. **Modern techniques for circular dichroism and synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy**. Amsterdam: IOS Press, 2009.

73 LEES, J. G. et al. CDtool-an integrated software package for circular dichroism spectroscopic data processing, analysis, and archiving. **Analytical Biochemistry**, v. 332, n. 2, p. 285-9, 2004.

74 MACDONALD, R. C. et al. Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles. **Biochimica et Biophysica Acta** v. 1061, n. 2, p. 297-303, 1991.

75 BI, S. et al. Structural features of galectin-9 and galectin-1 that determine distinct T cell death pathways. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 18, p. 12248-12258, 2008.

76 FASMAN, G. D. **Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules**. New York: Springer US, 1996.

77 MICSONAI, A. et al. Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 112, n. 24, p. E3095-103, 2015.

78 LEES, J. G. et al. Novel methods for secondary structure determination using low wavelength (VUV) circular dichroism spectroscopic data. **BMC Bioinformatics**, v. 7, p. 507, 2006. Doi: 10.1186/1471-2105-7-507

79 MILES, A. J.; WALLACE, B. A. Synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy of proteins and applications in structural and functional genomics. **Chemical Society Reviews** v. 35, n. 1, p. 39-51, 2006.

80 SILIGARDI, G. et al. Ligand- and drug-binding studies of membrane proteins revealed through circular dichroism spectroscopy. **Biochimica et Biophysica Acta** v. 1838, n. 1 Pt A, p. 34-42, 2014.

- 81 POWL, A. et al. Synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy-defined structure of the C-terminal domain of NaChBac and its role in channel assembly. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 107, n. 32, p. 14064-14069, 2010.
- 82 WALLACE, B. A.;JANES, R. W. Circular dichroism and synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy: tools for drug discovery. **Biochemical Society Transaction**, v. 31, n. Pt 3, p. 631-633, 2003.
- 83 EVANS, P. et al. The P23T cataract mutation causes loss of solubility of folded gammaD-crystallin. **Journal of Molecular Biology**, v. 343, n. 2, p. 435-44, 2004.
- 84 ZHANG, Y.;SKOLNICK, J. TM-align: a protein structure alignment algorithm based on the TM-score. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 7, p. 2302-9, 2005.
- 85 PROVENCHER, S. W.;GLOCKNER, J. Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. **Biochemistry**, v. 20, n. 1, p. 33-37, 1981.
- 86 SREERAMA, N.;WOODY, R. W. A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism. **Analytical Biochemistry** v. 209, n. 1, p. 32-44, 1993.
- 87 WHITMORE, L.;WALLACE, B. A. DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. Web server issue, p. W668-W673, 2004.
- 88 BRAHMS, S.;BRAHMS, J. Determination of protein secondary structure in solution by ultraviolet circular dichroism. **Journal of Molecular Biology**, v. 138, n. 2, p. 149-178, 1980.
- 89 SILVA, J. L. et al. Dissociation of a native dimer to a molten globule monomer: effects of pressure and dilution on the association equilibrium of arc repressor. **Journal of Molecular Biology**, v. 223, n. 2, p. 545-555, 1992.
- 90 WOODY, A. Y.;WOODY, R. W. Individual tyrosine side-chain contributions to circular dichroism of ribonuclease. **Biopolymers**, v. 72, n. 6, p. 500-513, 2003.
- 91 FRESKGARD, P.-O. et al. Assignment of the contribution of the tryptophan residues to the circular dichroism spectrum of human carbonic anhydrase II. **Biochemistry**, v. 33, n. 47, p. 14281-14288, 1994.

92 BOXER, D. H. et al. Sensing of remote oxyanion binding at the DNA binding domain of the molybdate-dependent transcriptional regulator, ModE. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 2, n. 19, p. 2829-2837, 2004.

93 KELLY, S. M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochimica et Biophysica Acta** v. 1751, n. 2, p. 119-39, 2005.

94 AHMAD, N. et al. Thermodynamic binding studies of cell surface carbohydrate epitopes to galectins-1, -3, and -7: evidence for differential binding specificities. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 80, n. 8, p. 1096-1104, 2002.

95 YOSHIDA, H. et al. X-ray structure of a protease-resistant mutant form of human galectin-8 with two carbohydrate recognition domains. **FEBS Journal**, v. 279, n. 20, p. 3937-3951, 2012.

96 JERABEK-WILLEMSSEN, M. et al. Molecular interaction studies using microscale thermophoresis. **Assay and Drug Development Technologies**, v. 9, n. 4, p. 342-53, 2011.

97 SEIDEL, S. A. et al. Microscale thermophoresis quantifies biomolecular interactions under previously challenging conditions. **Methods**, v. 59, n. 3, p. 301-15, 2013.

98 LUDWIG, C. Diffusion zwischen ungleich erwärmten Orten gleich zusammengesetzter Lösungen. **Sitzungsber Akad Wiss Wien Math-Naturwiss**, v. 20, n. 539, 1856.

99 DAM, T. K. et al. Galectins bind to the multivalent glycoprotein asialofetuin with enhanced affinities and a gradient of decreasing binding constants. **Biochemistry**, v. 44, n. 37, p. 12564-12571, 2005.

100 SILVA-LUCCA, R. A. et al. Structural and thermodynamic studies of KM+, a D-mannose binding lectin from *Artocarpus integrifolia* seeds. **Biophysical Chemistry**, v. 79, n. 2, p. 81-93, 1999.

101 JOLLIFFE, I. T. **Principal component analysis**. 2nd ed. New York: Springer, 2002.

102 DI LELLA, S. et al. When galectins recognize glycans: from biochemistry to physiology and back again. **Biochemistry**, v. 50, n. 37, p. 7842-7857, 2011.

103 SIMONS, K.; TOOMRE, D. Lipid rafts and signal transduction. **Nature Reviews**, v. 1, n. 1, p. 31-41, 2000.

104 DANIELSEN, E. M.;VAN DEURS, B. Galectin-4 and small intestinal brush border enzymes form clusters. **Molecular Biology of the Cell**, v. 8, n. 11, p. 2241-2251, 1997.

105 DANIELSEN, E. M.;HANSEN, G. H. Lipid raft organization and function in the small intestinal brush border. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 64, n. 4, p. 377-382, 2008.

106 MORELLE, W. et al. Glycosilation pattern of brush border-associated glycoproteins in enterocyte-like cells: involvement of complex-type N-glycans in apical trafficking. **Biological Chemistry Journal**, v. 390, n. 7, p. 529-544, 2009.

107 STECHLY, L. et al. Galectin-4 regulated delivery of glycoproteins to the brush border membrane of enterocyte-like cells. **Traffic**, v. 10, n. 4, p. 438-450, 2009.

108 MARSH, D. **ESR probes for structure and dynamics of membranes**. Amsterdam: Elsevier, 1985.

109 _____. Electron spin resonance in membrane research: protein-lipid interactions from challenging beginnings to state of the art. **European Biophysical Journal**, v. 39, n. 4, p. 513-25, 2010.

110 SIMONS, K.;VAN MEER, G. Lipid sorting in epithelial cells. **Biochemistry**, v. 27, n. 17, p. 6197-6202, 1988.

111 SIMONS, K.;IKONEN, E. Functional rafts in cell membrane. **Nature**, v. 387, n. 6633, p. 569-572, 1997.

112 AVANTI polar lipids, Inc., Disponível em: < <http://www.avantilipids.com/> >. Acesso em: 20 dez 2015.

113 IDEO, H.;SEKO, A.;YAMASHITA, K. Galectin-4 binds to sulfated glycosphingolipids and carcinoembryonic antigen in patches on the cell surface of human colon adenocarcinoma cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 6, p. 4730-7, 2005.

114 HUBBLE, W. L. et al. Recent advances in site-directed spin labeling of proteins. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 8, n. 5, p. 649-656, 1998.

115 HUBBELL, W. L.;CAFISO, D. S.;ALTENBACH, C. Identifying conformational changes with site-directed spin labeling. **Nature Structural Biology**, v. 7, n. 9, p. 735-739, 2000.

- 116 COLUMBUS, L. et al. Molecular motion of spin labeled side chains in alpha-helices: analysis by variation of side chain structure. **Biochemistry**, v. 40, n. 13, p. 3828-3846, 2001.
- 117 COLUMBUS, L.;HUBBELL, W. L. A new spin on protein dynamics. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 27, n. 6, p. 288-295, 2002.
- 118 COSTA-FILHO, A. J.;SHIMOYAMA, Y.;FREED, J. H. A 2D-ELDOR study of the liquid orderer phase in multilamellar vesicle membranes. **Biophysical Journal**, v. 84, n. 4, p. 2619-2633, 2003.
- 119 COLLADO, M. I. et al. Domain formation in sphingomyelin/cholesterol mixed membranes studied by spin-label electron spin resonance spectroscopy. **Biochemistry**, v. 44, n. 12, p. 4911-4918, 2005.
- 120 SPRINGER, G. F.;WILLIAMSON, P.;BRANDES, W. C. Blood group activity of Gram-negative bacteria. **Journal of Experimental Medicine**, v. 113, n. 6, p. 1077-1093, 1961.
- 121 STOWELL, S. R. et al. Innate immune lectins kill bacteria expressing blood group antigen. **Nature Medicine**, v. 16, n. 3, p. 295-301, 2010.
- 122 DONG, H. et al. Structural basis for outer membrane lipopolysaccharide insertion. **Nature**, v. 511, n. 7507, p. 52-6, 2014.
- 123 LIAO, D.-I. et al. Structure of S-lectin, a developmentally regulated vertebrate beta-galactoside-binding protein. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 91, n. 4, p. 1428-1432, 1994.
- 124 EARL, L. A.;BI, S.;BAUM, L. G. Galectin multimerization and lattice formation are regulated by linker region structure. **Glycobiology**, v. 21, n. 1, p. 6-12, 2011.
- 125 SATO, M. et al. Functional analysis of the carbohydrate recognition domains and a linker peptide of galectin-9 as to eosinophil chemoattractant activity. **Glycobiology**, v. 12, n. 3, p. 191-197, 2002.
- 126 CARLSSON, S. et al. Affinity of galectin-8 and its carbohydrate recognition domains for ligands in solution and at the cell surface. **Glycobiology**, v. 17, n. 6, p. 663-676, 2007.
- 127 MIYANISHI, N. et al. Carbohydrate-recognition domains of galectin-9 are involved in intermolecular interaction with galectin-9 itself and other members of the galectin family. **Glycobiology**, v. 17, n. 4, p. 423-432, 2007.

- 128 CASH, H. L. et al. Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. **Science**, v. 313, n. 5790, p. 1126-1130, 2006.
- 129 FIGDOR, C. G.;VAN KOOYK, Y.;ADEMA, G. J. C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 2, p. 77-84, 2002.
- 130 VAN KOOYK, Y.;RABINOVICH, G. A. Protein-glycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses. **Nature Immunology**, v. 9, n. 1, p. 593-601, 2008. Doi: 10.1038/ni.f.203.
- 131 HARLOW, E.;LANE, D. **Antibodies - a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988.
- 132 FASMAN, G. D. **Practical handbook of biochemistry and molecular biology**. Boca Raton: CRD Press, 1989.
- 133 MOORE, D. S.;MACCABE, G. P. **Introduction to the practice of statistic**. 4th ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2003. 828.
- 134 SATELLI, A. et al. Galectin-4 functions as a tumor suppressor of human colorectal cancer. **International Journal of Cancer**, v. 129, n. 4, p. 799-809, 2011.
- 135 LAHM, H. et al. Tumor galectinology: Insights into the complex network of a family of endogenous lectins. **Glycoconjugate Journal**, v. 20, n. 4, p. 227-238, 2004.
- 136 SIDDIK, Z. H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. **Oncogene**, v. 22, n. 47, p. 7265-79, 2003.
- 137 BABA, A. I.;CĂTOI, C. **Comparative oncology**. Bucharest: The Publishing House of the Romanian Academy, 2007.
- 138 WHITE, S. H.;WIMLEY, W. C. Membrane protein folding and stability: physical principles. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 28, p. 319-65, 1999. Doi: 10.1146/annurev-biophys.28.1.319.
- 139 FRASE, C. M. et al. The minimal gene complement of mycoplasma genitalium. **Science**, v. 270, n. 5235, p. 397-403, 1995.

- 140 VENKATAKRISHNAN, A. J. et al. Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. **Nature**, v. 494, n. 7436, p. 185-94, 2013.
- 141 ROSENBAUM, D. M.; RASMUSSEN, S. G.; KOBILKA, B. K. The structure and function of G-protein-coupled receptors. **Nature**, v. 459, n. 7245, p. 356-63, 2009.
- 142 KATRITCH, V.; CHEREZOV, V.; STEVENS, R. C. Structure-function of the G protein-coupled receptor superfamily. **Annual Review of Pharmacology Toxicology**, v. 53, p. 531-556, 2013. Doi: 10.1146/annurev-pharmtox-032112-135923.
- 143 BARAK, L. S. et al. The conserved seven-transmembrane sequence NP(x)2,3Y of the G-protein-coupled receptor superfamily regulates multiple properties of the β 2-Adrenergic Receptor. **Biochemistry**, v. 34, n. 47, p. 15407-15414, 1995.
- 144 WESS, J. et al. Functional role of proline and tryptophane residues highly conserved among G-protein-coupled receptors studied by mutation analysis of the m3 muscarinic receptor. **The EMBO Journal**, v. 12, n. 1, p. 331-338, 1993.
- 145 PRIOLEAU, C. et al. Conserved helix 7 tyrosine acts as a multistate conformational switch in the 5HT2C receptor. Identification of a novel "locked-on" phenotype and double revertant mutations. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 39, p. 36577-84, 2002.
- 146 MITCHELL, R. et al. Rhodopsin-family receptor associate with small G-proteins to activate phospholipase D. **Nature**, v. 392, n. 6674, p. 411-414, 1998.
- 147 GPCR structure and receptor. 2014. Disponível em: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:GPCR_structure_and_receptor.svg>. Acesso em: 10 jan 2016.
- 148 TANAKA, K.; MASU, M.; NAKANISHI, S. Structure and functional expression of the cloned rat neurotensin receptor. **Neuron**, v. 4, n. 6, p. 847-854, 1990.
- 149 CHALON, P. et al. Molecular cloning of a levocabastine-sensitive neurotensin binding site. **FEBS Letter**, v. 386, n. 2-3, p. 91-94, 1996.
- 150 MAZELLA. Sortilin/neurotensin 3: a new tool to investigate neurotensin signalling and cellular trafficking? **Cellular Signalling**, v. 13, n. 1, p. 1-6, 2001.
- 151 BISSETTE, G. et al. Hypothermia and intolerance to cold induced by intracisternal administration of the hypothalamic peptide neurotensin. **Nature**, v. 262, n. 5569, p. 607-609, 1976.

152 CARRAWAY, R. E.; PLONA, A. M. Involvement of neurotensin in cancer growth: evidence, mechanisms and development of diagnostic tools. **Peptides**, v. 27, n. 10, p. 2445-60, 2006.

153 GRIEBEL, G.; HOLLSBOER, F. Neuropeptide receptor ligands as drugs for psychiatric diseases: the end of the beginning? **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 11, n. 6, p. 462-78, 2012.

154 SCHIMPF, R.-M. et al. Increased plasma neurotensin concentrations in patients with Parkinson's disease. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 70, n. 6, p. 784-786, 2001.

155 GRISSHAMMER, R.; DUCKWORTH, R.; HENDERSON, R. Expression of a rat neurotensin receptor in *Escherichia coli*. **Biochemical Journal**, v. 295, n. Pt2, p. 571-576, 1993.

156 WHITE, J. F. et al. Structure of the agonist-bound neurotensin receptor. **Nature**, v. 490, n. 7421, p. 508-13, 2012.

157 EGLOFF, P. et al. Structure of signaling-competent neurotensin receptor 1 obtained by directed evolution in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 111, n. 6, p. E655-62, 2014.

158 WU, B. et al. Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. **Science**, v. 330, n. 6007, p. 1066-71, 2010.

159 FRITZE, O. et al. Role of the conserved NPxxY(x)5,6F motif in the rhodopsin ground state and during activation. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 100, n. 5, p. 2290-5, 2003.

160 GRISSHAMMER, R.; DUCKWORTH, R.; HENDERSON, R. Expression of a rat neurotensin receptor in *Escherichia coli*. **Biochemical Journal**, v. 295, n. 2, p. 571-576, 1993.

161 TUCKER, J.; GRISSHAMMER, R. Purification of a rat neurotensin receptor expressed in *Escherichia coli*. **Biochemical Journal**, v. 317, n. Pt 3, p. 891-899, 1996.

162 GRISSHAMMER, R.; AVERBECK, P.; SOHAL, A. K. Improved purification of a rat neurotensin receptor expressed in *Escherichia coli*. **Biochemical Society Transaction**, v. 27, n. 6, p. 899-903, 1999.

- 163 WHITE, J. F. et al. Automated large-scale purification of a G protein-coupled receptor for neurotensin. **FEBS Letters**, v. 564, n. 3, p. 289-293, 2004.
- 164 SHIBATA, Y. et al. Thermostabilization of the neurotensin receptor NTS1. **Journal of Molecular Biology**, v. 390, n. 2, p. 262-77, 2009.
- 165 ATTRILL, H. et al. Improved yield of a ligand-binding GPCR expressed in E. coli for structural studies. **Protein Expression and Purification**, v. 64, n. 1, p. 32-38, 2009.
- 166 DIJKMAN, P. M. **Biophysical studies of membrane protein structure and function**. 2014. 239 p. (Doctor of Philosophy). Medical Science Division, University of Oxford, Oxford, 2014.
- 167 COLE, C.;BARBER, J. D.;BARTON, G. J. The Jpred 3 secondary structure prediction server. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. Web Server issue, p. W197-201, 2008.
- 168 WEIB, H. M.;GRISSHAMMER, R. Purification and characterization of the human adenosine A(2a) receptor functionally expressed in Escherichia coli. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 1, p. 82-92, 2002.
- 169 YELISEEV, A. A. et al. Expression of human peripheral cannabinoid receptor for structural studies. **Protein Science**, v. 14, n. 10, p. 2638-53, 2005.
- 170 CHAPOT, M. P. et al. Localization and characterization of three different beta-adrenergic receptors expressed in Escherichia coli. **European Journal of Biochemistry**, v. 187, n. 1, p. 137-144, 1990.
- 171 STANASILA, L. et al. Expression of delta, kappa and mu human opioid receptors in Escherichia coli and reconstitution of the high affinity state for agonist with heterotrimeric G proteins. **European Journal of Biochemistry**, v. 260, n. 2, p. 430-438, 1999.
- 172 HUBBELL, W. et al. Watching proteins move using site-directed spin labeling. **Structure**, v. 4, n. 7, p. 779-783, 1996.
- 173 MCHAOURAB, H. S. et al. Motion of spin-labeled side chains in T4 lysozyme. correlation with protein structure and dynamics. **Biochemistry**, v. 35, n. 24, p. 7692-7704, 1996.
- 174 RASK-ANDERSEN, M.;ALMÉN, M. S.;SCHIÖTH, B. H. Trends in the exploitation of novel drug targets **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, n. 8, p. 579-590, 2011.

APÊNDICE A – Primers utilizados para a mutação sítio-dirigida resíduo a resíduo da hélice 8 do receptor neurotensina 1 (NTS1).

Resíduo	Primers
A374C	For: 5' TAC AAC CTG GTC TCC TGC AAC TTC CGC CAG GTC 3'
	Rev: 5' GAC CTG GCG GAA GTT GCA GGA GAC CAG GTT GTA 3'
N375C	For: 5' AAC CTG GTC TCC GCC TGC TTC CGC CAG GTC TTT 3'
	Rev: 5' AAA GAC CTG GCG GAA GCA GGC GGA GAC CAG GTT 3'
F376C	For: 5' CTG GTC TCC GCC AAC TGC CGC CAG GTC TTT CTG 3'
	Rev: 5' CAG AAA GAC CTG GCG GCA GTT GGC GGA GAC CAG 3'
R377C	For: 5' GTC TCC GCC AAC TTC TGC CAG GTC TTT CTG TCC 3'
	Rev: 5' GGA CAG AAA GAC CTG GCA GAA GTT GGC GGA GAC 3'
Q378C	For: 5' TCC GCC AAC TTC CGC TGC GTC TTT CTG TCC ACG 3'
	Rev: 5' CGT GGA CAG AAA GAC GCA GCG GAA GTT GGC GGA 3'
V379C	For: 5' GCC AAC TTC CGC CAG TGC TTT CTG TCC ACG CTG 3'
	Rev: 5' CAG CGT GGA CAG AAA GCA CTG GCG GAA GTT GGC 3'
F380C	For: 5' AAC TTC CGC CAG GTC TGT CTG TCC ACG CTG GCC 3'
	Rev: 5' GGC CAG CGT GGA CAG ACA GAC CTG GCG GAA GTT 3'
L381C	For: 5' TTC CGC CAG GTC TTT TGC TCC ACG CTG GCC AGC 3'
	Rev: 5' GCT GGC CAG CGT GGA GCA AAA GAC CTG GCG GAA 3'
S382C	For: 5' CGC CAG GTC TTT CTG TGC ACG CTG GCC AGC CTT 3'
	Rev: 5' AAG GCT GGC CAG CGT GCA CAG AAA GAC CTG GCG 3'
T383C	For: 5' CAG GTC TTT CTG TCC TGC CTG GCC AGC CTT GCG 3'
	Rev: 5' CGC AAG GCT GGC CAG GCA GGA CAG AAA GAC CTG 3'
L384C	For: 5' GTC TTT CTG TCC ACG TGC GCC AGC CTT GCG CTT 3'
	Rev: 5' AAG CGC AAG GCT GGC GCA CGT GGA CAG AAA GAC 3'

Fonte: Elaborada pela autora.