

DESNATURAÇÃO E RENOVELAMENTO  
DE LECTINAS OLIGOMÉRICAS LIGANTES  
DE D-GALACTOSE: ESTUDOS NO  
EQUILÍBRIO TERMODINÂMICO

por

Patricia Targon Campana

04

USP/IFSC/SBI



8-2-001450

Tese apresentada ao Instituto de Física  
de São Carlos, da Universidade de São  
Paulo, para obtenção do título de  
Doutor em Ciências: Física Aplicada

Orientador: Profa. Dra. Leila Maria Beltramini

São Carlos, abril 2002

Campana, Patricia Targon

Desnaturação e renovelamento de lectinas oligoméricas ligantes de D-Galactose: estudos no equilíbrio termodinâmico/Campana Patricia Targon.—

São Carlos, 2002.

110 p.

Tese (Doutorado) - Instituto de Física de São Carlos, 2002.

Orientador: Profa. Dra. Leila Maria Beltramini

1. Enovelamento de proteínas. 2. Espectroscopia de proteínas. I. Título.



**MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA TESE DE DOUTORADO DE  
PATRICIA TARGON CAMPANA, APRESENTADA AO INSTITUTO DE  
FÍSICA DE SÃO CARLOS, UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, EM 30-04-  
2002.**

## **COMISSÃO JULGADORA:**

Prof. Dra. Leila Maria Beltramini (Orientador e Presidente) – IFSC - USP

Prof. Dr. Jerson Lima da Silva – UFRJ

Prof. Dr. Amando Siuti Ito – FFCLRP-USP

Prof. Dr. Richard John Ward – FFCLRP-USP

Prof. Dra. Ana Paula Ulian de Araújo – IFSC-USP

*Para a Heidi,  
com todo meu amor*





“Feliz é aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”

Cora Coralina



*Durante todos esses anos eu recebi, de vários mestres, lições de paciência, perseverança, ética, profissionalismo, humildade, espírito cooperativo e doação. Cada um a sua maneira: uns mais “bravos”, outros sutis, uns carinhosos, outros mais sérios, pacientes ou briguentos, os mais íntimos, os mais formais e os meus “irmãos de alma”.*

*A toda a biofísica, aos que já não estão mais nesta foto por terem encontrado seu próprio caminho, todos vocês sem os quais esse trabalho e os anteriores não teriam se realizado, e que enriqueceram a minha vida muito mais do que eu poderia expressar aqui, meu muito obrigada, do fundo do coração.*

Patricia

ESTENDO MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS A MUITAS OUTRAS PESSOAS QUE DEDICARAM SEUS ESFORÇOS, E SEM AS QUAIS ESSE TRABALHO NÃO EXISTIRIA:

Primeiramente, aos meus amados pais, Edson e Nanci, por terem me ensinado o caminho certo, e que sempre me apoiaram, incondicionalmente, em tudo, principalmente em todas as minhas manias. Aos meus irmãos Edsinho e Dudu, meus sobrinhos Zeca e Pedrinho, e a todo o “clã dos Campana” por me ensinarem que haja o que houver, a vida é sempre uma festa!

A minha orientadora e amiga, Profa. Dra. Leila M. Beltramini, que me apoiou e orientou durante todo este extenso trabalho e durante os anteriores. Com uma dedicação exemplar: sempre presente e prestativa, severa e exigente e, sobretudo, paciente e muito compreensiva, ela acreditou nesse trabalho mesmo nos momentos em que tudo parecia dar errado. Mais do que uma “orientação de trabalho de doutoramento”, ela me orientou para a vida, me ensinou, com seu exemplo, a ser um cientista do mundo real: fazer pesquisa (com autocrítica), fazer prestação de contas, relatório, projeto, recurso para viagem, fazer reclamação (efetiva!) do “mau suporte técnico” externo, dar monitoria, dar aula, ter “visão bioquímica”, ter paciência, perseverança e fé, muita fé. A ela devo tudo o que aprendi durante todos esses anos e agradeço com profunda admiração todo o apoio e a confiança que depositou em mim.

A minha amiga Derminda Isabel de Moraes (Zazá para os íntimos) pelo apoio técnico, médico, científico e automobilístico indispensáveis nas horas de colunas de cromatografia, crise renal, gastrite, gravidez, churrascos, tratamento de choque pós-stress-alcoólico-oxidativo oriundo de TUSCa, e cursos: “Como tomar ônibus na Argentina em três lições” e “Como acordar a Patricia pela manhã - Capítulo 1: A paciência de Jó”.

Ao meu grande amigo Alexandre Marletta, por todos os programas, todos os conselhos na cantina, todas as idéias geniais de um cara que já fez experimental, teoria, experimental de novo, manja de tudo um pouco, e ainda consegue ser muito bom no que faz.

Ao Prof. Dr. Richard Charles Garratt pelas sugestões sempre bem vindas e pelas perguntas nas quais eu nem havia pensado antes. Por enxergar os erros quando a gente já nem enxerga mais a página. Sem esquecer da paciência pra corrigir nossos textos em inglês (eu juro que, um dia, eu aprendo).

Aos Professores Renato Moreira e Ana Cristina por todos estes anos trabalhando juntos. Obrigada pelas minhas filhas “frutalina e jacalina”, pelas horas de conversa, passeios e cerveja. Tanto aqui quanto em qualquer lugar que nos encontremos a diversão é garantida.

Ao povo do Grupo de Cristalografia, pela amizade e convivência.

Aos meus professores da graduação e da pós, que me ensinaram que, como escreveu Marie Curie, “na vida não há nada a temer, só a entender”.

Ao Instituto de Física de São Carlos: o pessoal da biblioteca, da seção de alunos, da importação, os técnicos, secretários e secretárias, todos os que vão nos ajudando a “tirar as pedras do caminho” o tempo todo. A esse Instituto que faz com que a gente ainda acredite que nosso País, um dia, há de melhorar.

Aos órgãos financiadores: CNPq, Fapesp e Capes

# SUMÁRIO

---

Lista de figuras	iv
Lista de tabelas	vi
Lista de abreviaturas	vii
Lista de símbolos	viii
Resumo	ix
<i>Abstract</i>	x
<i>Capítulo 1</i>	
<b>Introdução</b>	<b>1</b>
1.1 Estudos de enovelamento: um breve histórico	1
1.2 Principais idéias de uma nova visão	6
1.3 Estudando o enovelamento de proteínas: modelos de dois e três estágios	8
1.3.1 Enovelamento de dois estágios	8
1.3.2 Reações de enovelamento que apresentam intermediários	9
1.3.3 O estado de <i>molten globule</i>	12
1.4 Metodologias utilizadas nos estudos de desnaturação e renovelamento de proteínas	15
1.5 Um panorama sobre as lectinas vegetais	19
1.6 Objetivos do trabalho	26
<i>Capítulo 2</i>	
<b>Procedimento experimental</b>	<b>27</b>
2.1 Obtenção das lectinas frutalina e jacalina	27
2.1.1 Extrato bruto das lectinas	27
2.1.2 Purificação das lectinas a partir do EB	28
2.1.3 Eletroforese em gel desnaturante (SDS-PAGE)	28

2.1.4 Ensaio de atividade biológica	29
2.1.5 Cromatografia de exclusão molecular (SEC)	29
2.2 Reações de desnaturação e renovelamento	29
2.2.1 Desnaturação térmica irreversível das lectinas na ausência de D-Galactose	30
2.2.2 Reações de incubação para desnaturação com hidrócloro de guanidina (GndHCl)	30
2.2.3 Reações de incubação com GndHCL para renovelamento	30
2.2.4 Reação de renovelamento por diluição da solução desnaturante	31
2.2.5 Reação de renovelamento por diálise da solução desnaturante	31
2.2.6 Reações de incubação em ambientes ácido, básico e neutro	32
2.3 Medidas espectroscópicas	32
2.3.1 Fluorescência estática	32
2.3.2 Medidas de anisotropia estática	33
2.3.3 Medidas de dicroísmo circular (CD)	33
2.4 Cálculos de parâmetros termodinâmicos dos processos de desnaturaçao e renovelamento	34
2.4.1 Desconvolução dos espectros de fluorescência utilizando o programa CCA	34
2.4.2 Cálculo da energia de estabilidade conformacional ( $\Delta G_{H_2O}$ ) das lectinas pelo modelo de dois estados	35
2.4.3 Cálculo da energia de estabilidade conformacional ( $\Delta G^{H_2O}$ ) das lectinas pelo modelo de três estados	37
2.4.4 Cálculo da energia de ativação da lectinas por desnaturaçao térmica irreversível	39

### Capítulo 3

<b>Resultados e discussões</b>	<b>42</b>
3.1 Características físico-químicas das lectinas jacalina e frutalina	42
3.2 Frutalina submetida à desnaturaçao por temperatura	52
3.3 Estudos de desnaturaçao e renovelamento da lectina frutalina na presença de hidrócloro de Guanidina	53
3.3.1 Reações de incubação em GndHCl - diálise e diluição para obtenção da lectina renovelada	54

3.3.2 Estudos de enovelamento da frutalina no equilíbrio (fluorescência)	64
3.3.3 Estudos de enovelamento da frutalina no equilíbrio monitorados por dicroísmo circular e cromatografia de exclusão molecular (SEC)	70
3.4 Estudos de desnaturação e renovelamento da lectina jacalina	77
3.4.1 Estudos de desnaturação térmica	77
3.4.2 Estudos de desnaturação e renovelamento da jacalina utilizando GndHCl	83
3.4.3 Reações de incubação em GndHCl - diálise e diluição para obtenção da lectina renovelada	84
3.4.4 Estudos de enovelamento da lectina jacalina no equilíbrio - Fluorescência estática	87
3.4.5 Estudos de enovelamento da lectina jacalina no equilíbrio - dicroísmo circular	90
<b>Conclusões</b>	<b>93</b>
<b>Perspectivas</b>	<b>97</b>
<b>Referências bibliográficas</b>	<b>98</b>

## LISTA DE FIGURAS

<i>Nome</i>	<i>Página</i>
Figura 1.1: Esquema dos modelos propostos para o envelamento	3
Figura 1.2: Representação bidimensional do funil de envelamento	7
Figura 1.3: Estrutura da jacalina resolvida por Sankaranarayanan e colaboradores em 1996	22
Figura 1.4: Seqüência primária da frutalina	25
Figura 3.1: SEC das frações nativa da frutalina e jacalina	42
Figura 3.2: Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS	44
Figura 3.3: Espectro de CD da frutalina e da jacalina nativas	45
Figura 3.4: Espectro de fluorescência da frutalina e jacalina nativas	46
Figura 3.5: Variação da posição do máximo de emissão de fluorescência da frutalina submetida à variação de pH	48
Figura 3.6: Valores de anisotropia em função do pH para a frutalina	49
Figura 3.7: Elipticidade molar da frutalina como função do pH	50
Figura 3.8: Atividade hemaglutinante relativa da frutalina como função de pH	51
Figura 3.9: Curva de transição do processo de desnaturação térmica da frutalina	53
Figura 3.10: Desnaturação da frutalina utilizando hidrocloreto de guanidina	55
Figura 3.11: Monitoramento da mudança espectral, em 219 nm, da frutalina por dicroísmo circular	55
Figura 3.12: Renovelamento da frutalina por diálise	57
Figura 3.13: Renovelamento da frutalina por diluição	58
Figura 3.14: SEC das frações nativa, desnaturada e renovelada de frutalina	59
Figura 3.15: Espectros de CD da frutalina nativa, desnaturada, frutalina-r e frutalina-m	60

Figura 3.16: Espectros de fluorescência da frutalina(N, U, R e M)	62
Figura 3.17: Variação do $\lambda_{\max}^{emiss}$ da frutalina com GndHCl	65
Figura 3.18: Diferenças de energia no modelo termodinâmico com vários microestados desenvolvidos	66
Figura 3.19: Atividade hemaglutinante relativa das frações de frutalina	69
Figura 3.20: curvas de desnaturação e renovelamento da lectina frutalina	72
Figura 3.21: SEC da lectina frutalina durante o renovelamento	74
Figura 3.22: Fração da jacalina desnaturada em função da temperatura	77
Figura 3.23: Desconvolução das curvas de fluorescência da jacalina desnaturada termicamente por CCA	78
Figura 3.24: Frações da desnaturação irreversível da jacalina	80
Figura 3.25: Extração de três componentes das curvas de CD da desnaturação da jacalina	81
Figura 3.26: Jacalina na forma nativa e incubada com GndHCL 1 M, 2 M, 3 M, 4 M e 6 M	83
Figura 3.27: Renovelamento da jacalina por diálise.	85
Figura 3.28: Renovelamento da jacalina por diluição.	86
Figura 3.29: Variação do centro de massa espectroscópico da jacalina com o desnaturante químico.	88
Figura 3.30: Curvas de desnaturação da lectina frutalina obtidas por CD e fluorescência da frutalina, na ausência de D-Galactose.	91



## LISTA DE TABELAS

---

<i>Nome</i>	<i>Página</i>
.....	
Tabela 1.1: Técnicas experimentais utilizadas para estudar processos de enovelamento em proteínas	17
Tabela 3.1: Ensaio de atividade haemaglutinante de frutalina nativa, desnaturada e renovelada	63
Tabela 3.2: Comparação da estabilidade conformacional da frutalina na presença e ausência do açúcar ligante	68
Tabela 3.3: Valores de energia de estabilidade conformacional para a jacalina	89

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

<i>Abreviatura</i>	<i>Nome</i>
ACB	anidrase carbônica bovina
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CCA	<i>Convex Constraint Analysis</i>
CD	<i>Circular Dichroism</i>
CITc	citocromo C
EB	extrato bruto
GndHCl	hidrocloro de guanidina
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	ácido bórico
ITS	Inibidor de Tripsina de Soja
MG	<i>molten globule</i>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	fosfato monoácido de sódio
NaCl	cloreto de sódio
PBS	<i>phosphate buffer saline</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PMA	peso molecular aparente
SDS-PAGE	<i>Sodium nDodecylSulphate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>
SEC	<i>Size Exclusion Chromatography</i>
tris	Tris-hidroximetil aminometano

## LISTA DE SÍMBOLOS

---

<i>Símbolo</i>	<i>Breve descrição</i>
$\Delta G_{H_2O}$	energia de estabilidade conformacional
$\alpha$	parâmetro espectroscópico observável
$N$	forma nativa
$U$	forma reversivelmente desnaturada
$I$	forma intermediária
$D$	forma irreversivelmente desnaturada
$f_D$	fração de proteína no estado desnaturado (irreversível)
$f_N$	fração de proteína no estado nativo
$f_U$	fração de proteína no estado desnaturado (reversível)
$f_I$	fração de proteína no estado intermediário
$\Delta G_D$	energia livre de desenovelamento
$K_{NI}$	constante do equilíbrio de transição do estado $N$ para $I$
$K_{IU}$	constante do equilíbrio de transição do estado $I$ para $U$
$R$	constante universal dos gases (8,314 J)
$T$	temperatura absoluta (em Kelvin)
$E_a$	Energia de ativação da reação
$T_m$	temperatura de transição
$\lambda_{\max}^{emiss}$	máximo de emissão de fluorescência

## RESUMO

---

O estudo de enovelamento de proteínas tem sido um problema de fundamental importância em biofísica e biologia molecular. Neste trabalho, estudamos os processos de desnaturação e renovelamento das lectinas jacalina e frutalina. Estas lectinas são tetraméricas, apresentam alta homologia estrutural, porém diferem em atividade biológica, sendo a frutalina mais potente. Apesar desta homologia, estas lectinas diferem também nos processos de desnaturação e renovelamento como função da temperatura e o comportamento frente ao desnaturante químico hidrócloro de guanidina (GndHCl).

Ambas proteínas foram desnaturadas pela ação de GndHCl e suas curvas de desnaturação medidas por espectroscopia de fluorescência e CD. As medidas de fluorescência da frutalina deram valores de estabilidade conformacional de 17,12 kJ/mol e 12,34 kJ/mol, na presença e na ausência de D-Galactose, enquanto a jacalina forneceu valores de 8,12 kJ/mol para a transição NI e 5,61 kJ/mol para a transição IU em PBS. Os valores na presença do açúcar foram similares. Nos estudos da frutalina foram separadas as formas nativa, desnaturada, renovada e uma forma molecularmente distinta chamada mal-enovelada, por cromatografia de exclusão molecular. Estas formas foram analisadas por atividade hemaglutinante e espectroscopias de CD e fluorescência. Todos os resultados obtidos confirmaram a ocorrência do renovelamento de ambas lectinas e que os monômeros renovados, depois de alcançarem sua estrutura tridimensional, se associam espontaneamente para a formação dos tetrâmeros.

## ABSTRACT

---

Protein refolding is currently a fundamental problem in biophysics and molecular biology. We have studied the refolding process of jacalin and frutalin. They are tetrameric lectins that present structural homology, but jacalin shows a more marked biological activity than the latter. These proteins, despite their homology, have different unfolding/refolding behaviors as a function of temperature and chemical agents.

Both proteins were unfolded induced by guanidine hydrochloride and their denaturation curves measured by fluorescence emission and CD. Fluorescence measurements of frutalin gave values of conformational stability of 17.12 kJ/mol and 12.34 kJ/mol, in the presence and absence of D-Galactose, while jacalin gave values of 8.12 kJ/mol for NI transition and 5.61 kJ/mol for IU transition in PBS. In sugar presence the values were similar. In the frutalin studies were separated the native, unfolded, refolded and a distinct molecular form denoted misfolded, by Size Exclusion Chromatography. These forms were analyzed for heamagglutination activity, CD and fluorescence spectroscopy. All the results obtained confirmed the successful refolding of the both lectins and the refolded monomers, after adopting their native three-dimensional structures, spontaneously assemble to form tetramers.

## INTRODUÇÃO

---

### 1.1 ESTUDOS DE ENOVELAMENTO DE PROTEÍNAS: UM BREVE HISTÓRICO

Entender como ocorre o enovelamento de proteínas continua sendo um dos problemas mais interessantes da natureza. As perguntas como e por que as proteínas adotam um enovelamento específico entre todos os possíveis e só neste têm atividade biológica, têm intrigado os cientistas há mais de quatro décadas.

A solução para o problema do enovelamento seria de enorme importância, pois além das graves doenças que envolvem proteínas mal enoveladas (Alzheimer, Huntington, além de outras das chamadas *Protein Conformational Disorders*, PCD), atualmente a expressão de proteínas heterólogas insolúveis é uma das barreiras para otimizar os processos de cristalização e, conseqüentemente, a resolução da estrutura tridimensional de um grande número de proteínas. Elucidar este problema poderia também representar o elo perdido entre a seqüência gênica e a estrutura tridimensional. Estas razões fizeram com que, nos últimos 25 anos, o número

de trabalhos com o enfoque em enovelamento de proteínas tivesse um crescimento exponencial.

Embora há 25 anos atrás houvesse uma escassez de proteínas para estudos e muitas limitações de métodos experimentais e teóricos, ficou claro que o enovelamento protéico é um evento reversível e espontâneo, ao menos em condições apropriadas.

Experimentos cinéticos demonstraram que esse processo é rápido, da ordem de poucos segundos ou menos, para a maioria das proteínas. Cálculos simples, porém, sugerem que mesmo uma proteína pequena, de, por exemplo, 100 resíduos de aminoácidos, levaria bilhões de anos para alcançar seu estado nativo se o enovelamento ocorresse através de uma procura casual por todas as conformações possíveis. O aparente contraste entre estes fatos ficou conhecido como Paradoxo de Levinthal [Levinthal C., 1968].

Desde então, várias sugestões foram propostas, todas partindo da premissa que existam caminhos específicos para o enovelamento e que, para moléculas restritas a esses caminhos, as cadeias polipeptídicas poderiam alcançar suas estruturas nativas sem necessariamente ter que procurar por áreas muito grandes no espaço conformacional. Estas observações levaram a visão de que haveria um caminho específico para se percorrer no enovelamento correto. Mas, uma pergunta fundamental continuou sem resposta: como as proteínas alcançam este caminho “correto” e evitam os demais.

Após a descoberta de estados parcialmente enovelados, além de intensos debates sobre a natureza do processo de enovelamento, vários modelos começam a surgir de acordo com as técnicas que se tinham disponíveis. Um dos primeiros modelos propostos, ilustrado pela figura 1.1, foi o modelo *framework* [Ptitsyn O.B., 1973], cuja proposta é de que elementos de estrutura secundária poderiam se formar independentemente da estrutura terciária.

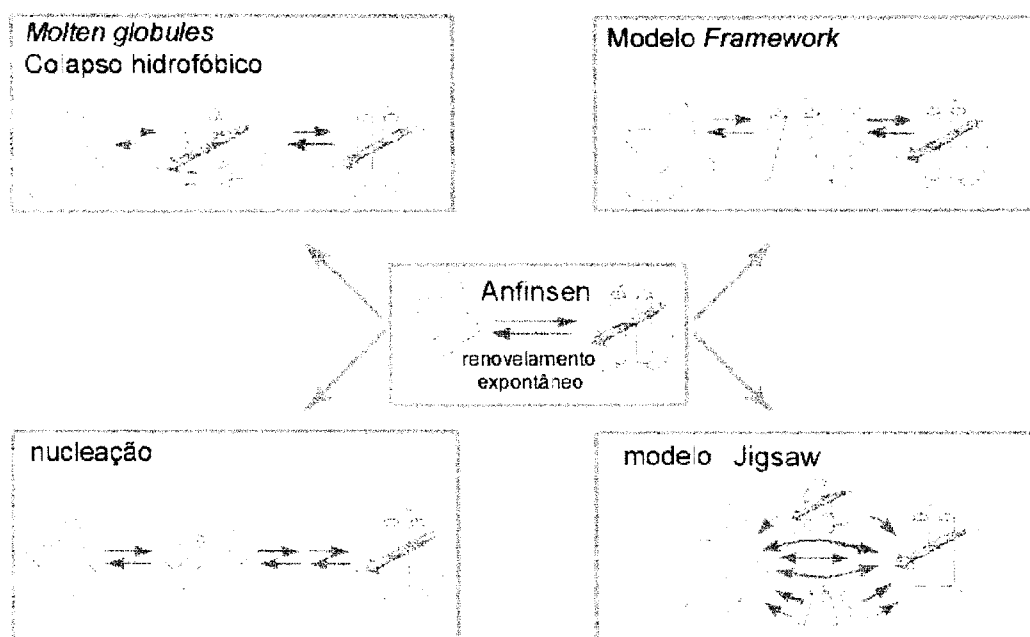


Figura 1.1: Esquema dos modelos propostos para o enovelamento. Adaptado de Radford S.E, 2000.

Em outro modelo, chamado difusão-colisão [Karplus M. e Weaver D.L., 1994], os elementos de estrutura secundária se difundiriam e colidiriam, unindo-se de maneira eficaz para resultar na estrutura terciária. Estes dois



modelos descritos acima sugerem que há necessidade de formas intermediárias para que ocorra o enovelamento.

Já o modelo de colapso hidrofóbico [Ptitsyn O.B., 1996; Dill K.A. et al., 1995], sugere um colapso rápido da proteína ao redor de suas cadeias laterais hidrofóbicas, ocorrendo um rearranjo para um espaço conformacional restrito ocupado por um intermediário. Este mecanismo promoveria um acúmulo de intermediários que, teoricamente, diminuiria a reação de enovelamento [Creighton T.E., 1995; Fersht A.R., 1995; Sosnick T.R., 1994].

Outro modelo de enovelamento clássico é a nucleação. Aqui alguns resíduos da seqüência localizados próximos fisicamente, poderiam formar uma estrutura secundária como na proteína nativa que atuaria como um núcleo, a partir do qual a estrutura se propagaria em várias etapas até a formação da estrutura nativa final. A estrutura terciária se formaria como consequência necessária, não havendo então, formas intermediárias [Anfisen C.B., 1973].

Para refinar a nucleação clássica surgiu o chamado modelo da nucleação-condensação. Neste modelo o núcleo não é pequeno e formado num estado fundamental, mas sim grande e difuso, desenvolvido num estado de transição. Esse núcleo seria composto tanto pelos resíduos próximos na estrutura secundária local, quanto por faixas longas de seqüência com interações terciárias necessárias para estabilizá-lo [Fersht A.R., 1997; Anfisen C.B., 1973].

O núcleo não seria completamente formado no estado de transição, mas continuaria em desenvolvimento até o enovelamento, sugerindo um processo cooperativo. Estudos teóricos mostram que este mecanismo é particularmente eficiente para iniciar o enovelamento [Gutin A.M. et al, 1995; Thirumalai D. e Guo Z.Y., 1995; Abkevich V.I. et al, 1994]. Fazendo uma analogia com o processo de atuação enzimática, pode-se dizer que assim como são encontrados resíduos envolvidos na catálise não pertencentes ao sítio ativo [Fersht A.R., 1997], o núcleo do enovelamento estaria também “deslocalizado” na proteína. Então regiões que teriam alta probabilidade de formar a estrutura nativa se formariam e contatariam regiões mais distantes, dominando o processo da procura. A formação deste núcleo “esticado” pode representar um forte balanço a favor das interações locais, além da mínima acumulação de intermediários, pois o núcleo não é construído somente em um estágio de transição.

Particularmente interessante foi o modelo do quebra-cabeça<sup>1</sup> [Kim P.S. e Baldwin R.L., 1982], que sugere um verdadeiro quebra-cabeça estrutural, no qual várias “peças” de estrutura podem ser associadas de modos diferentes, todas alcançando o mesmo resultado final. Deste modo, cada proteína poderia se enovelar por “caminhos” diferentes.

Embora estes estudos não tenham efetivamente resolvido o Paradoxo de Levinthal, eles forneceram uma base para os estudos da década seguinte

<sup>1</sup>Do inglês *jigsaw model*

que, com o auxílio das novas técnicas experimentais e teóricas, têm caminhado no sentido de se estabelecer um mecanismo fundamental para a maioria das proteínas.

## 1.2 PRINCIPAIS IDÉIAS DE UMA NOVA VISÃO

Talvez a principal mudança nas idéias sobre o processo de enovelamento é que não se tenha um único e específico caminho para se chegar ao enovelamento correto, como proposto em alguns modelos anteriores. Ao invés disso tem-se um funil de enovelamento, ilustrado pela figura 1.2, descrevendo o processo de modo que haja uma abundância de rotas para ao estado nativo, cujos caminhos serão populados dependendo dos detalhes do sistema a ser estudado, incluindo seqüência de aminoácidos e condições experimentais [Dobson C.M. et al, 2000; Chan H.S. e Dill K.A. 1998].

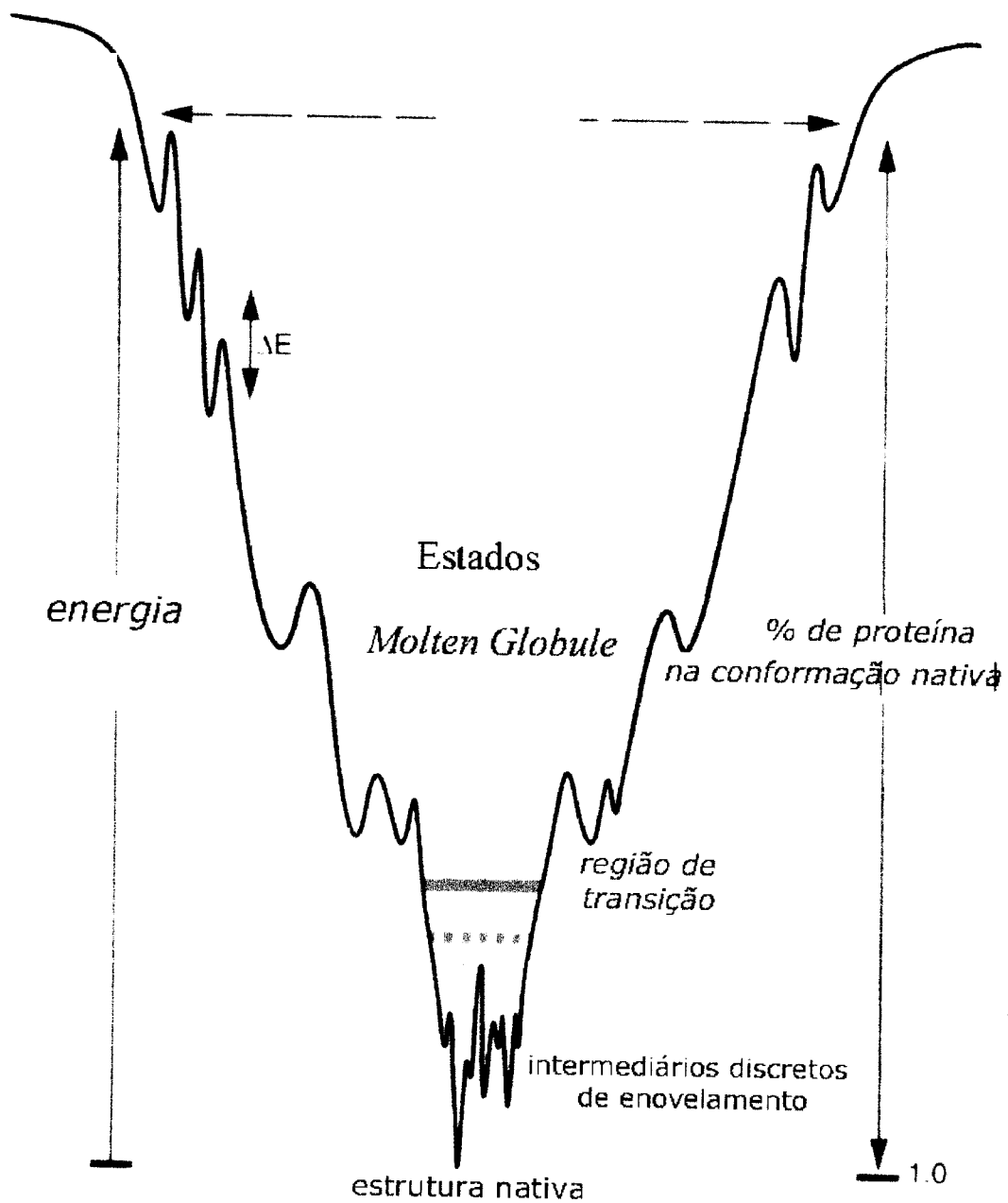


Figura 1.2: Representação bidimensional do funil de enovelamento. Adaptado de Nelson & Cox, 2000.

Com esta nova visão vem a necessidade de monitorar transições rápidas entre grupos de moléculas que estejam simultaneamente populados.

Para isso, novos esforços têm sido direcionados para desenvolver técnicas mais sensíveis e rápidas para monitorar processos em vários sistemas [Lazaridis T. e Karplus M., 1997].

### 1.3 ESTUDANDO O ENOVELAMENTO DE PROTEÍNAS: MODELOS DE DOIS E TRÊS ESTÁGIOS

#### 1.3.1 Enovelamento de dois estágios

Para as proteínas pequenas, em geral contendo até 100 resíduos de aminoácidos, o processo de enovelamento tem sido altamente cooperativo, podendo ser descrito como um processo de dois estágios [Jackson *apud* Pain<sup>1</sup>]. Neste tipo de reação, a barreira energética para o enovelamento é baixa e a população de proteína em qualquer estágio é dada por uma conformação completamente enovelada ou completamente desenovelada. O funil de enovelamento para este processo tem a superfície lisa, sem as barreiras cinéticas que culminam em estados mal-enovelados e sem formas transientes dadas pelos mínimos locais de energia.

Apesar deste comportamento ter sido observado para muitas proteínas pequenas com apenas um domínio, existem exceções. Algumas destas pequenas moléculas apresentam intermediários. São espécies de alta energia que não se acumulam significativamente, mas, sob condições mais estáveis, podem ser visualizadas [Kim P.S. e Baldwin R.L., 1990].

---

<sup>1</sup> Pain R.H. 2000 *apud* Jackson S.E. 1998, *How do small proteins fold?* *Folding & Design*, **3**, R81.

Tem se observado que tais transientes podem funcionar como núcleos ou *foldind core*, formados por contatos fortes simplificando o processo de procura e aumentando a velocidade do enovelamento [Fersht A.R., 1999]. Por outro lado podem ser produto de colapso não específico, agregados, portanto fora do caminho correto [Brockwell D.J., 2000].

### 1.3.2 Reações de enovelamento que apresentam intermediários

Proteínas maiores normalmente envolvem transições de três estágios com populações intermediárias. Com o aumento do tamanho da proteína, as barreiras para reorganizar os estados colapsados também aumentam e as regiões acessíveis no espaço das conformações possíveis ficam separadas por obstáculos maiores, resultando em múltiplos caminhos para o estado nativo, como visto anteriormente na figura 1.2. Conseqüentemente, populações com enovelamentos distintos se acumulam por longos períodos em caminhos particulares. Essas populações intermediárias podem corresponder a domínios ou subdomínios da estrutura nativa e, neste caso, o próximo passo seria evoluir para ela. Tais intermediários encontram-se no “caminho para o enovelamento correto” (*on pathway intermediate*), ilustrado no esquema abaixo:



Tem sido sugerido que a formação destes domínios seja localmente cooperativa, se assemelhando a um processo de dois estágios. Segundo este raciocínio, o processo de enovelamento de proteínas grandes e complexas poderia ser dividido em processos menores, de maneira que houvesse várias

regiões com estruturas diferentes, como no modelo do “quebra-cabeça” [Fersht A.R., 1997].

Há, ainda, hipóteses que sugerem a existência de vários domínios se desenvolvendo independentemente (como múltiplos eventos de nucleação) e que este processo seja suficientemente heterogêneo para que algumas moléculas alcancem o estado nativo [Dobson C.M. et al, 1994]. Esta heterogeneidade pode incluir tanto espécies ao longo do caminho de enovelamento (*on pathway*, esquema A) quanto espécies que não alcançariam a conformação nativa (*off pathway*), como no esquema abaixo:



A concentração destes intermediários fora do caminho de enovelamento pode aumentar com o aumento da concentração de desnaturante, ou com o aumento da velocidade do processo de enovelamento. Tal comportamento tem sido observado nos intermediários formados em proteínas com pontes dissulfeto [Weismann, J.S.e Kim P.S., 1991], com isomerização não nativa de prolina [Kiefhaber T. et al, 1992] e agregação não específica [Silow M. e Oliveberg M., 1997].

A presença destes intermediários poderia aumentar a eficiência do enovelamento por restringir o espaço conformacional permitido a cadeia polipeptídica. Essa idéia, no entanto, não explica como o paradoxo de Levinthal é resolvido para permitir que estes intermediários se formem

rapidamente. Além disso, muitas proteínas cujo processo de enovelamento é rápido apresentam uma cinética de dois estágios [Plaxco K.M. et al, 1998]. Por outro lado, estes intermediários podem ser interpretados como uma espécie de “armadilha cinética”, (do inglês, *kinetic traps*), experimentalmente observada quando reações intrinsecamente lentas, como reações de isomerização de prolina, estão associadas ao processo de enovelamento [Kim P.S. e Baldwin R.L., 1990]. No caso de serem “armadilhas cinéticas”, os intermediários diminuiriam a eficiência e a velocidade do processo.

Os estados intermediários podem ser encontrados nos processos que ocorrem imediatamente após o início da reação, na ordem de submilissegundos, durante os quais algumas proteínas adquirem mais de 60% de sua estrutura secundária [Kuwajima K. et al, 1987]. Essas reações, chamadas reações da “fase rápida” (*burst-phase reactions*), observadas em muitas proteínas durante o renovelamento, são causadas por uma alta compactação da cadeia polipeptídica. Tais estados compactados podem ser classificados como *molten globule* (MG), formar algum tipo de interação terciária definida nativa ou não nativa, ou ainda permanecerem numa conformação relativamente estendida, dependendo das condições de desnaturação [Zhou J-M. et al., 2001].

Alguns aspectos sobre o intermediário encontrado na “fase rápida” estão sendo ainda investigados, como por exemplo, se este colapso é um passo distinto no caminho, ou se é apenas uma resposta do estado desnaturado às



mudanças do ambiente, como diluição do solvente ou salto na temperatura, ou mesmo uma mudança brusca no pH.

### 1.3.3 O estado de *molten globule*

O estado de *molten globule*, *MG*, é um intermediário conformacional atingido por muitas proteínas no estado de equilíbrio da desnaturação. Suas características principais, comuns mesmo em proteínas diferentes, elucidadas por experimentos convencionais como CD, fluorescência e técnicas hidrodinâmicas, são<sup>1</sup>:

- ✦ A presença de um conteúdo substancial de estrutura secundária
- ✦ Ausência de estrutura terciária específica associada com empacotamento de cadeias laterais
- ✦ Dinâmica estrutural com movimentos em escala de tempo maiores que nanosegundos
- ✦ Estrutura compacta, sendo que seu raio pode ultrapassar o do estado nativo em apenas 10 a 30%
- ✦ Presença de um empacotamento “frouxo” do bolso hidrofóbico, aumentando a acessibilidade desta região ao solvente

---

<sup>1</sup> Vários autores têm caracterizado os estados *molten globule*. Aqui foram sumarizados os conceitos em comum que são atualmente aceitos, de acordo com Pain R. H., 2000; Ptitsyn O., 1996 e Kuwajima K., 1989.

A estrutura do estado *molten globule* é bem heterogênea, de forma que uma parte dela pode ser organizada e similar à nativa e a outra parte mais desorganizada. Estes estados têm sido encontrados experimentalmente no equilíbrio de desnaturação e renovelamento de várias proteínas em diferentes ambientes, como durante a desnaturação ácida e renovelamento com o auxílio de açúcares neutros [Fink *apud* Pain<sup>1</sup>], em concentrações moderadas de desnaturantes químicos fortes (como hidrocloreto de guanidina e uréia) [Hirota N. et al, 1998] ou durante a desnaturação térmica [Griko Y.V. et al, 1995]. Em condições desnaturantes mais suaves, como pressão [Ferrao-Gonzales A.D. et al, 2000; Foguel D. et al, 1998], remoção de ligante da proteína, modificações decorrentes de mutações sítio-dirigidas [Chang H.C. et al, 2002] ou outras modificações químicas que levem à formação de conformações parcialmente desnaturadas, também são encontrados intermediários com características de *MG*.

Embora este estágio seja encontrado com muita frequência, seu papel no processo de enovelamento ainda não está completamente compreendido, podendo o estado *MG* ser significativo como um intermediário específico para direcionar a reação de enovelamento ou não.

De um modo geral os estudos experimentais sobre desnaturação e renovelamento de proteínas eram conduzidos com proteínas de pequena massa molecular, monoméricas e com estrutura predominantemente em

<sup>1</sup> Pain R.H. 2000 *apud* Fink A.L., Calciano L.J., Goto Y., Kurotsu T., Palleros D.R. 1994. *Biochem*, 33 12504.

hélices alfa. Entretanto nos últimos anos, a classe de proteínas de estruturas tipo folhas-beta vem ganhando um destaque especial por estarem envolvidas em patologias oriundas de proteínas mal-enoveladas, como Alzheimer [Lodish H. et al, 2000], Huntington [Nelson D.L. e Cox M.M., 2000] e outras das chamadas PCDs (*Protein Conformational Disorders*)<sup>1</sup>.

Paradoxalmente a importância destas proteínas, poucos estudos experimentais eram encontrados na literatura sobre desnaturação e renovelamento de proteínas com predomínio de elementos folhas-Beta [Capaldi, A. P. e Radford, S. E., 1998].

Além dos estudos de renovelamento de proteínas recombinantes conduzidos em nosso laboratório [Pinto A.P.A. et al, 2001; Goto L.S. et al, 2001; Selistre-de-Araújo H.S. et al, 2000], o grupo vem descrevendo, caracterizando (incluindo, em alguns casos, a resolução de estrutura tridimensional), estudando aspectos físico-químicos, e determinando parâmetros termodinâmicos de proteínas de origem vegetal cuja estrutura é predominantemente formada por elementos Beta. Estudos desta natureza requerem a utilização de uma série de métodos bioquímicos, físicos e químicos que vão desde o isolamento da proteína e/ou da clonagem e expressão de proteínas recombinantes, passando pela utilização de métodos cromatográficos e espectroscópicos. Tais metodologias permitem a caracterização estrutural, os estudos sobre interações proteínas-ligantes e/ou

<sup>1</sup> Um elegante *review* sobre este tópico pode ser encontrado em Soto, C. 2001. Protein and misfolding disease: protein refolding and therapy. *FEBS Letters*, **498** 204-207.

inibidores, bem como a determinação de parâmetros termodinâmicos das proteínas em estudo.

As proteínas tipo folhas-beta estudadas pelo grupo pertencem a uma classe que tem despertado muito interesse devido à sua propriedade de reconhecer e interagir específica e reversivelmente com diferentes tipos de carboidratos e glicoconjugados: as lectinas. Esta classe é encontrada desde plantas até mamíferos e estão envolvidas em fenômenos de sinalização e interações celulares, interações parasita-hospedeiro (tanto em plantas como em animais), mecanismos de defesa em plantas [Lis H. e Sharon N., 1998].

#### 1.4 METODOLOGIAS UTILIZADAS NOS ESTUDOS DE DESNATURAÇÃO E RENOVELAMENTO DE PROTEÍNAS

Os modelos propostos para o enovelamento de proteínas, os quais foram descritos anteriormente, têm sido derivados de vários enfoques experimentais combinados com modelos teóricos [Duan Y. e Kollman P.A., 1998].

Uma das metodologias experimentais mais utilizadas para estudar o enovelamento de proteínas é a espectroscopia de fluorescência<sup>1</sup>. Essa técnica se baseia na propriedade que algumas moléculas possuem de emitir luz como resultado de absorção oriunda de outras fontes. Essa emissão, chamada fluorescência, é uma emissão imediata ou de um estado singlete eletronicamente excitado. No caso das proteínas, três de seus resíduos de

---

<sup>1</sup>Para melhor entendimento dos fundamentos da técnica são recomendados: Lakowicz, J.R., 1991 e Campana P.T., 1998.

aminoácidos possuem esta propriedade: a tirosina, o triptofano e a fenilalanina, sendo o triptofano mais utilizado por ter absorção mais intensa que os demais. Esses resíduos são chamados fluoróforos e sua fluorescência é altamente específica e sensível ao ambiente em que os resíduos se encontram. Desta maneira a fluorescência da proteína quando enovelada é resultante da fluorescência de seus resíduos individuais dependendo da vizinhança de cada um e, se este ambiente ao redor do fluoróforo muda, a fluorescência também muda. Essas características fazem com que esta técnica seja uma ferramenta altamente sensível para estudar mudanças estruturais e até conformacionais, sendo capaz de monitorar modificações na estrutura terciária da proteína.

O dicroísmo circular (CD - *Circular Dichroism*)<sup>1</sup> também é muito utilizado nos estudos de enovelamento devido à sua sensibilidade em distinguir a presença e a porção de elementos de estrutura secundária de peptídeos e proteínas em solução. O CD é observado quando uma molécula opticamente ativa (chamada cromóforo) apresenta diferenças na absorção de luz circularmente polarizada à esquerda e à direita. Para tanto, este cromóforo deve ser assimétrico. No caso das proteínas, estes cromóforos são, principalmente, as ligações peptídicas, as cadeias laterais dos aminoácidos, e grupos prostéticos, todos com absorção na região ultravioleta. Assim o espectro de CD entre 180 e 260 nm pode identificar diferentes tipos de

---

<sup>1</sup> Assim como no caso da fluorescência, existe um grande número de artigos e livros onde os fundamentos desta técnica podem ser encontrados. No presente caso é recomendada a seguinte leitura: Nakanishi, K. et al, 1994, Fasman G. D. 1991 e Campana P.T., 1998.

estrutura secundária, como hélices-alfa, folhas beta paralela e antiparalelas, voltas beta e estruturas randômicas.

A tabela 1.1 tem um resumo dos principais pontos que podem ser observados com as duas técnicas anteriores.

Tabela 1.1: Técnicas experimentais utilizadas para estudar processos de enovelamento em proteínas. Adaptada de Radford S.E., 2000.

TÉCNICA	PARÂMETRO ESTRUTURAL ESTUDADO
<b>fluorescência</b>	
Intrínseca	Vizinhança de triptofanos e tirosinas
Ligação com fluoróforo extrínseco	Exposição da área de superfície hidrofóbica
Ligação de substrato	Formação de sítio ativo
Transferência de energia	Distância entre resíduos
Anisotropia	Tempo de correlação, volume
<b>Dicroísmo Circular</b>	
UV distante (190-250 nm)	Formação de estrutura secundária
UV próximo (260-400 nm)	Formação de estrutura terciária

Podem ser acoplados aos equipamentos de CD e fluorescência misturadores automáticos para a diluição do desnaturante, como por exemplo, *stopped-flow*, que permitem monitorar eventos ocorridos em escalas de milissegundos. Já os misturadores ultra-rápidos podem elucidar eventos da ordem de microsegundos. No caso de perturbações de temperatura e monitoramento por métodos óticos, a escala de tempo pode alcançar nanosegundos [Brockwell D.J., 2000].

Além das espectroscopias de CD e fluorescência, outras técnicas como absorção na região do infra-vermelho, que elucidam mudanças na estrutura secundária da proteína e NMR, que pode fornecer informações tanto de

vizinhanças locais de resíduos individuais quanto da estabilidade global [Serrano L., 1995], são muito empregadas nos estudos de enovelamento de proteínas. As técnicas de engenharia de proteínas, especialmente as mutações sítio-dirigidas, também são de grande importância para estudar o papel individual dos “resíduos-chave” durante o processo de enovelamento [Zhang, Y., 1997].

Técnicas cromatográficas são também empregadas em estudos de renovelamento, especialmente para inferir sobre a reorganização estrutural das proteínas em estudo. No entanto, a cromatografia também é utilizada para auxiliar o processo de renovelamento, seja por meio de colunas envolvendo matrizes que funcionam como “chaperonas” [Batas B. e Chaudhuri J.B., 1999], ou por meio de matrizes contendo chaperonas, como GroEL, imobilizadas [Dong, X.Y. et al 2000].

Entretanto, a chave para desvendar a natureza do mecanismo de enovelamento é combinar resultados de diferentes técnicas de maneira que cada uma delas possa elucidar diferentes aspectos do enovelamento. Além disto, a combinação do estudo de várias proteínas e a comparação do enovelamento de proteínas da mesma família, fornecem os resultados mais interessantes levando a determinação de comportamentos comuns durante o enovelamento.

## 1.5 UM PANORAMA SOBRE AS LECTINAS VEGETAIS

As lectinas constituem uma classe especial de proteínas ligantes de carboidratos e glicoconjugados. Essas moléculas têm sido identificadas como mediadoras no reconhecimento celular em vários processos biológicos; isso porque as células reconhecem qualquer outro par que interaja com elas (outra célula, vírus, bactérias ou protozoários) através da complementaridade dos carboidratos contidos em sua superfície. São proteínas, que podem ou não ter carboidratos ligados à sua estrutura, presentes em uma grande variedade de organismos: de vírus a mamíferos.

Nos vegetais, esta classe de proteínas está relacionada com mecanismos de defesa e também podem ser encontradas como proteínas de reserva [Peumans e Van Damme, 1995]. As lectinas vegetais e animais têm mostrado estruturas secundária e terciária similares, ainda que estas não apresentem homologia significativa em suas seqüências primárias. A maioria das lectinas tem especificidade tanto por mono como por oligossacarídeos. Em geral as lectinas interagem com maior afinidade com estes últimos, por estarem ligados à superfície celular, quando comparados com o monossacarídeo livre.

As lectinas vegetais foram as primeiras a serem estudadas, pois os processos de isolamento são relativamente simples e elas são abundantes na natureza. A diversidade dos fenômenos em que estão envolvidas, tanto na própria planta, quanto em atividades *in vivo* e *in vitro*, faz delas uma classe de proteínas muito exploradas em biotecnologia. São usadas para o isolamento,



purificação e estudos de estruturas de carboidratos e superfície celulares; estudos de fisiologia e biossíntese de células do sistema imune e sanguíneo, investigação da arquitetura de superfícies celulares e suas mudanças, como agentes terapêuticos no tratamento do câncer, doenças auto-imunes e infecciosas, sob a forma de toxinas recombinantes (imunotoxinas), como bioinseticidas e agentes defensivos de pragas na agricultura.<sup>1</sup>

A maioria das lectinas isoladas e caracterizadas é oriunda de sementes de membros da família Leguminosae, existindo apenas poucos representantes de outras famílias de plantas. Destas, destacam-se as lectinas da família Moraceae, hoje denominadas de lectinas relacionadas à jacalina (*jacalin-like lectins*).

Algumas lectinas da família Moraceae vem sendo estudadas em nosso grupo. Do gênero *Artocarpus*, estuda-se a jacalina e a KM+, ambas de *A. integrifolia* [Santos-Oliveira R. et al, 1994; Roque-Barreira M.C. et al., 1986]. A jacalina é ligante de D-Galactose e desperta um interesse especial como ferramenta biotecnológica por ligar ao anticorpo Ig-A, ao linfócito CD-4 e às células tumorais. Esta lectina teve sua estrutura cristalográfica resolvida [Sankaranarayanan R. et al., 1996], e mostra-se como um tetrâmero, onde cada

<sup>1</sup> A aplicação das lectinas pode ser encontrada em capítulos específicos do livro *LECTINS, BIOLOGY-BIOCHEMISTRY and CLINICAL BIOCHEMISTRY*, editado a cada dois anos, período em que ocorre o Encontro Internacional de Lectinas (Interlec).

<sup>2</sup> De Monteiro-Moreira, 2002: "O termo *lectinas jacalina relacionadas* é usado como coletivo para todas as lectinas que são estrutural e evolucionariamente relacionadas à jacalina. A família da jacalina compreende dois subgrupos de lectinas. O primeiro subgrupo é formado por lectinas de *Moraceae* N-acetilgalactosamina específicas, que são muito similares a lectina D-galactose-ligante de jaca. O segundo subgrupo é o das lectinas de *Convolvulaceae* que são homólogas às de *Moraceae*, mas exibem especificidade por manose/maltose (VAN DAMME, et al., 1998)."

monômero adota um enovelamento tipo  $\beta$  prisma paralelo, no qual três motivos tipo “chave grega” são arranjados de modo a formar os lados de um prisma com área de seção reta quase triangular. Os monômeros da jacalina, como podem ser vistos na figura 1.3, são compostos por duas cadeias: a cadeia  $\alpha$  e a cadeia  $\beta$ , esta última resultante do processamento proteolítico de seu precursor. Esta clivagem interna ocorre em um dos motivos “chave grega” do prisma  $\beta$  e gera uma cadeia curta de 20 resíduos que é uma das fitas externas do terceiro motivo.

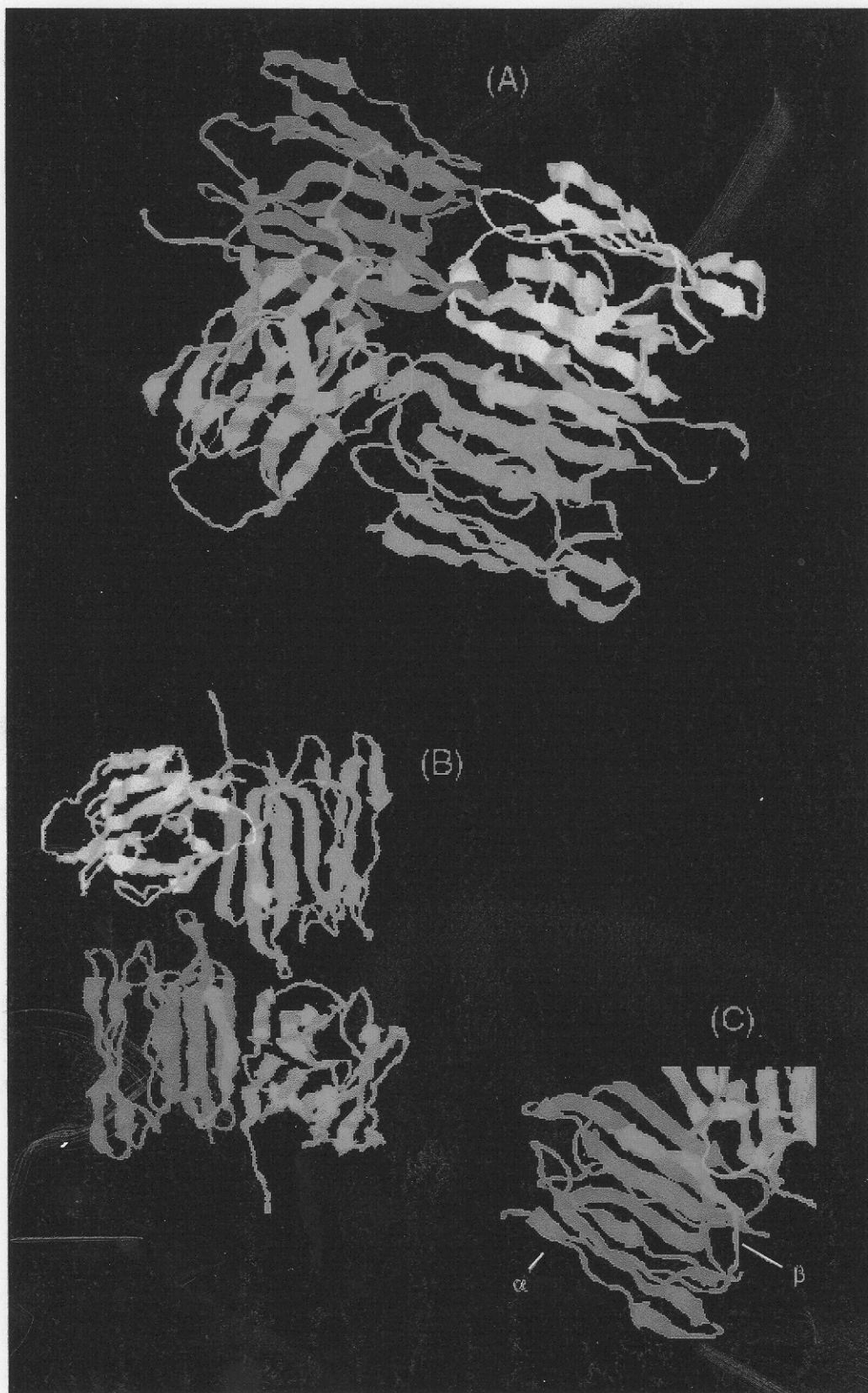


Figura 1.3: Estrutura da jacalina resolvida por Sankaranarayanan e colaboradores em 1996 (A). Visualização da orientação entre monômeros (B). Cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  em detalhe num monômero (C).

A KM<sup>+</sup> é ligante de D-Manose, induz diretamente migração de neutrófilos *in vivo* e *in vitro* (neutrófilos humanos), aglutina hemácias dos grupos sanguíneos ABO e estimula a proliferação de linfócitos do baço de camundongos Balbc [Santos-Oliveira R. et al, 1994]. Seus sítios de reconhecimento de carboidratos são responsáveis pela ligação da KM<sup>+</sup> ao tecido conectivo e ao endotélio vascular [Ganiko L.M. et al 1997]. Esta lectina mostra um espectro de dicroísmo circular muito particular, porém compatível com estrutura predominantemente em folhas beta. É estável a temperaturas de até 55 °C, variações aos extremos ácido e básico de pH, e a ação de agentes desnaturantes [Silva-Lucca R.A. et al, 1999]. A partir dos cristais obtidos da KM<sup>+</sup> [Oliveira P.S.L. et al, 1997], sua seqüência de aminoácidos foi determinada e a estrutura resolvida por modelagem molecular, em função com seu alto grau de identidade com a jacalina [Rosa J.C. et al, 1999]. A KM<sup>+</sup> apresenta um N-terminal acetil-bloqueado e não sofre processamento pós-traducional como a jacalina. Assim, ela é um homotetrâmero cujos monômeros são ligados por interações não covalentes. Os monômeros da KM<sup>+</sup>, compostos por uma única cadeia polipeptídica, apresentam um peptídeo de ligação que une as regiões estruturalmente relacionadas as cadeias alfa e beta da jacalina.

Duas novas lectinas foram isoladas das sementes do gênero *Artocarpus* em nosso grupo [Trindade M.B. et al, 2001; Monteiro-Moreira A.C.O., 2002]. Elas são ligantes de quitina e apresentam atividade hemaglutinante para eritrócitos humanos, uma isolada das sementes de jaca (*A. integrifolia*) denominada jacaquina e outra de fruta-pão (*A. incisa*) denominada frutaquina.

Ambas têm peso molecular aparente de 12 kDa e sob ação de agentes redutores foram separadas em três cadeias. O N-terminal das três cadeias destas lectinas mostra alto grau de identidade entre elas (jacaquina com frutaquina), porém sem homologia com as lectinas ligantes de quitina da família das heveínas e sem identidade com outras proteínas depositadas no *Protein Data Bank* (PDB).

Das sementes de *Artocarpus incisa*, também foram extraídas a frutalina [Moreira R.A. et al, 1998] e a frutapina [Monteiro-Moreira A.C.O. et al, 2001], sendo que a primeira tem propriedades biológicas e espectroscópicas semelhantes a jacalina. É também ligante de D-Galactose, porém sua ação hemaglutinante é mais potente que esta última. O peso molecular estimado é 66 kDa, contendo quatro monômeros mantidos por interações não covalentes. O espectro de CD de sua estrutura nativa foi identificado como sendo dominado por folhas- $\beta$ , similarmente a jacalina. Sua seqüência de aminoácidos, recentemente determinada, mostra mais de 98% de identidade seqüencial com a jacalina, também apresentada como duas cadeias: alfa e beta, como pode ser visto na figura 1.4 [Beltramini L.M. et al, 2002]<sup>1</sup>.

Cadeia $\alpha$	10	20	30	40	50
FRUTALINA	GKAFDDGAF	GIREINLSYN	KETAIGDFQV	VYDLNGSPYV	GQNHKSFITG
JACALINA	GKAFDDGAF	GIREINLSYN	KETAIGDFQV	VYDLNGSPYV	GQNHKSFITG
CONSENSUS	GKAFDDGAF	GIREINLSYN	KETAIGDFQV	VYDLNGSPYV	GQNHKSFITG
	60	70	80	90	100
FTPVKISLDF	PSEYIMEVSG	YTGNSVGYVV	VRSLTFKTNK	KTYGPYGVTS	GTPFNLPIEN
FTPVKISLDF	PSEYIMEVSG	YTGNSVGYVV	VRSLTFKTNK	KTYGPYGVTS	GTPFNLPIEN
FTPVKISLDF	PSEYIMEVSG	YTGNSVGYVV	VRSLTFKTNK	KTYGPYGVTS	GTPFNLPIEN
	120	130			
GLIVGFKGSI	GYWLDYFSMY	LSL			
GLIVGFKGSI	GYWLDYFSMY	LSL			
GLIVGFKGSI	GYWLDYFSMY	LSL			
Cadeia $\beta$	1	20			
FRUTALINA	NQSGKSQTV	IVGPWGAKVS			
JACALINA	NEQSGKSQTV	IVGSWGAKVS			
CONSENSUS	N#QSGKSQTV	IVG#WGAKVS			

Figura 1.4: Seqüência primária da frutalina alinhada com jacalina.

Recentemente foi verificado que a frutalina é um potente estimulador de linfócitos humanos e ativa células NK (*natural killer*) *in vitro* além da migração de leucócitos na cavidade peritoneal de camundongos *in vivo* [Barja-Fidalgo M.C et al, 2002<sup>2</sup>].

A frutapina tem massa molecular aparente de 63 kDa e é constituída por quatro subunidades idênticas, similarmente ao descrito para a KM+, possui a mesma forma do espectro de CD e seu N-terminal também se apresenta bloqueado [Monteiro-Moreira A.C.O., 2002].

O escopo experimental desta tese foi estudar as diferenças observadas nos processos de desnaturação e renovelamento das lectinas jacalina e frutalina, face às interessantes aplicações em biotecnologia que elas

<sup>1</sup> (2002) Beltramini LM, Moreira R.A., Monteiro-Moreira A.C, Oliva M.L.V. Resultados não publicados.  
<sup>2</sup> (2002) Barja-Fidalgo M.C., Beltramini L.M., Monteiro-Moreira A.C.O., Moreira R.A. Resultados não publicados.

apresentam e diferenças nas propriedades físico-químicas a despeito de suas homologies.

## 1.6 OBJETIVOS DO TRABALHO

Os estudos de desnaturação e renovelamento da jacalina e frutalina foram monitorados pelas espectroscopias de dicroísmo circular e fluorescência, bem como as diferentes formas separadas por cromatografia de exclusão molecular. Assim os seguintes objetivos foram propostos:

- ✦ estudar o processo de desnaturação térmica destas lectinas e calcular a energia de ativação do processo, uma vez que o mesmo foi irreversível para ambas;
- ✦ investigar o processo de desnaturação da jacalina e frutalina utilizando hidrocloreto de guanidina (GndHCl) tanto na ausência quanto na presença do açúcar ligante;
- ✦ analisar o processo de renovelamento para ambas, na ausência e na presença de D-Galactose, identificando formas intermediárias;
- ✦ separar e caracterizar as formas nativas, desnaturadas, renoveladas e intermediárias.

A partir da análise das curvas de desnaturação e renovelamento de ambas lectinas, calcular os parâmetros termodinâmicos.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

---

2.1 Obtenção das lectinas frutalina e jacalina

A partir do extrato bruto das sementes de *Artocarpus integrifolia* e *Artocarpus incisa* obtiveram-se as lectinas jacalina e frutalina respectivamente, como descrito a seguir.

2.1.1 Extrato bruto das lectinas

Sementes oriundas dos frutos, exaustivamente lavadas com água destilada após secagem a temperatura ambiente, foram trituradas e ao pó obtido adicionou-se o tampão PBS (*phosphate buffer saline*) 0,15M e pH 7,4 numa proporção 1:10 peso/volume. Essa mistura permaneceu sob agitação por 6 horas a 4 °C e após esse tempo foi centrifugada por 20 minutos a 2600g também a 4 °C. O sobrenadante, depois de separado e ultrafiltrado em membrana YM10 até a metade de seu volume original, foi chamado extrato bruto (EB). A obtenção do EB seguiu o mesmo protocolo tanto para jacalina quanto para frutalina.



### 2.1.2 Purificação das lectinas a partir do EB

As lectinas foram purificadas por cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose D-Galactose (SIGMA), como descrito previamente [Moreira R.A. et al, 1997]. Após a eluição do volume de exclusão, a coluna foi eluída com uma solução de PBS contendo 0,2M de D-Galactose e as frações coletadas com absorbância monitorada em 280 nm. Utilizou-se o mesmo procedimento para a jacalina, uma vez que ambas têm afinidade por D-Galactose. As proteínas foram concentradas por dialocentrifugação em Centriprep 10 (Amicon Corporation, USA) até cerca de 1 mg de proteína em 1 ml de solução. A concentração da proteína foi medida pelo método de Bradford e/ou pelo coeficiente de extinção molar [Bradford M.M., 1976].

### 2.1.3 Eletroforese em gel desnaturante (SDS-PAGE)

As amostras de frutalina e jacalina assim obtidas foram submetidas à eletroforese em gel desnaturante (SDS-PAGE, *Sodium Dodecyl Sulphate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) segundo o método de LAEMMLI (1970), utilizando um sistema vertical da *Pharmacia LKB Biotechnology*, Uppsala, Suécia. Os marcadores de massa molecular utilizados foram: soro albumina bovina, BSA (66 kDa), ovalbumina, OVA (45 kDa), anidrase carbônica bovina, ACB (30 kDa), inibidor de tripsina de soja, ITS (20,1 kDa) e citocromo C, CITc (12,4 kDa).

#### 2.1.4 Ensaio de atividade biológica

A atividade biológica foi realizada através do teste de hemaglutinação em microplacas [Moreira R.A. et al, 1994]. Em resumo, cada amostra de lectina foi diluída em série e, a seguir, adicionada em cada poço uma alíquota de uma suspensão de hemácias humanas a 2%. Após duas horas à temperatura ambiente, a reação foi lida a olho nu e a unidade aglutinante considerada a menor concentração de proteína na qual se observou a aglutinação.

#### 2.1.5 Cromatografia de exclusão molecular (SEC)

As lectinas em suas formas nativa, desnaturada e renovada foram filtradas por cromatografia de exclusão molecular (SEC, *Size Exclusion Chromatography*) em coluna Superdex 75 HR 10/30 usando o sistema Äkta Explorer-10 (*Pharmacia LKB Biotechnology*). A coluna foi equilibrada e eluída com PBS pH 7,4, contendo 0,1 M D-Galactose e 0,1 M D-Manose a 22 °C. A velocidade de fluxo foi de 0,5 ml/min, monitorada pela absorbância em 280 nm, e o eluato coletado em frações de 1 ml. Para a calibração da coluna foram utilizadas as proteínas padrão: soro albumina bovina (BSA), anidrase carbônica bovina e citocromo C.

### 2.2 REAÇÕES DE DESNATURAÇÃO E RENOVELAMENTO

Ambas lectinas foram desnaturadas pelos processos químico e térmico, sendo que apenas a desnaturação química foi parcialmente reversível. As reações de renovamento, feitas através da diluição do desnaturante, estão descritas juntamente com as reações para desnaturação, a seguir.

### 2.2.1 Desnaturação térmica irreversível das lectinas na ausência de D-Galactose

As soluções contendo 0,08-0,18 mg/ml de lectina foram incubadas em banho térmico de água circulante, nas seguintes temperaturas: 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 e 75 °C durante 5, 15, 30, 45 e 60 minutos cada. Para suspender a reação, os frascos contendo as amostras foram mergulhados em banho de gelo. Após retornarem à temperatura ambiente, efetuaram-se as medidas de CD e fluorescência.

### 2.2.2 Reações de incubação para desnaturação com hidrocloreto de guanidina (GndHCl)

Para ambas lectinas as soluções de desnaturação continham 0,09 mg/ml de proteínas. Tais soluções foram incubadas durante 12 horas, à temperatura ambiente, 20 °C, em tampão PBS 0,15 M pH 7,4 contendo GndHCl. A concentração de GndHCl foi variada de 0 a 6,9M (0M; 0,5M; 1,0M; 1,5M; 1,6M; 1,8M; 2,0M; 2,2M; 2,4M; 2,6M; 2,8M; 3,0M; 3,2M; 3,4M; 3,6M; 3,8M; 4,0M; 4,2M; 4,4M; 4,6M; 4,8M; 5,0M; 5,5M; 6,0M; 6,5M; 6,9M) na presença e ausência de D-Galactose 0,1M. Todos os experimentos foram executados em duplicata.

### 2.2.3 Reações de incubação com GndHCL para renovelamento

Soluções contendo 0,09 mg/ml e 0,35 mg/ml de lectinas em tampão PBS 0,15 M pH 7,4 com 6M de GndHCl foram incubadas durante 12 horas, à temperatura ambiente, 20 °C, para que ocorresse a desnaturação. As amostras assim desnaturadas foram diluídas em PBS de forma que as soluções finais obtidas tinham concentrações de GndHCl iguais a: 0M; 0,5M; 0,75M; 1,0M;

1,25M; 1,5M; 1,75M; 2,0M; 2,25M; 2,5M; 2,75M; 3,0M; 3,25M; 3,5M; 3,75M; 4,0M; 4,25M; 4,5M; 4,75M; 5,0M; 5,25M; 5,5M; 5,75M. No estudo das lectinas em presença do açúcar ligante, a solução utilizada nas reações foi PBS contendo 0,1M de D-Galactose, tanto para a desnaturação quanto para a diluição das amostras, compondo um igual número de pontos para curva de renovelamento de cada lectina na presença de seu açúcar ligante. Ambos os experimentos foram executados em duplicata.

#### 2.2.4 Reação de renovelamento por diluição da solução desnaturante

As lectinas foram desnaturadas, por 12 horas, em soluções de PBS-D-Galactose 0,1M e 6M de GndHCl para a frutalina (0,36 mg/ml) e para a jacalina (0,36 mg/ml). Para iniciar o processo de renovelamento, as soluções de lectinas foram concentradas em Centricon 3 (Amicon Corp.) a 4300g até que atingissem metade do volume inicial. Ao fim de cada concentração completou-se o volume com uma solução de GndHCl com metade da concentração anterior. Repetiu-se o procedimento até a concentração final de GndHCl de 0,025M.

#### 2.2.5 Reação de renovelamento por diálise da solução desnaturante

Soluções contendo as lectinas já desnaturadas pelo procedimento anterior foram dialisadas em sacos (*Spectra Por* MWCO: 3500) contra PBS (pH 7,4) durante 12 horas. Diante deste procedimento houve precipitação das lectinas, assim as soluções foram centrifugadas e o sobrenadante dialofiltrado em Centriprep 3 (*Amicon Corp.*), antes que as medidas fossem efetuadas.

### 2.2.6 Reações de incubação em ambientes ácido, básico e neutro.

O tampão que proporcionou a variação de pH 2 a pH 12 consistiu numa mistura contendo 10 mM de cada um dos seguintes reagentes: glicina, fosfato monoácido de sódio, ácido bórico e tris-hidroximetil aminometano (tris), mais 30mM de cloreto de sódio. A solução tampão foi ajustada, com ácido clorídrico e acetato de sódio, para valores de pH de: 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5; 9,0; 9,5; 10,0; 10,2; 10,4; 10,6; 10,8; 11,0; 11,2; 11,4; 11,6; 11,8 e 12,0. No caso do experimento em presença de D-Galactose, a mistura de reagentes anteriormente descrita foi acrescida D-Galactose 0,1M, tomando-se o cuidado de ajustar o valor de pH após a adição do açúcar. Duplicatas de cada amostra, com 0,09 mg/ml de frutalina, foram mantidas em cada pH durante 12 horas, e após este intervalo seguiram as medidas de fluorescência estática, anisotropia, CD e atividade biológica.

## 2.3 MEDIDAS ESPECTROSCÓPICAS

Estão descritas a seguir as condições experimentais e os métodos espectroscópicos utilizados para monitorar as lectinas tanto em sua forma nativa quanto seus processos de desnaturação e renovelamento.

### 2.3.1 Fluorescência estática

No espectrofluorímetro K2 (ISS - Illinois, USA), modo estático, efetuaram-se espectros das lectinas frutalina e jacalina, em cubetas de quartzo com 1cm de caminho ótico e à temperatura ambiente, 20 °C, com comprimento de onda de excitação de 290 nm e a emissão monitorada de 305 a 450nm. Para

alguns experimentos executados em um espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS50B, a excitação foi de 280 nm com o monitoramento da emissão no intervalo de 290 nm a 450 nm. Um filtro com 85% de transmitância para comprimento de onda acima de 295 nm, posicionado no canal da emissão, teve a função de eliminar a luz espalhada. A concentração utilizada para ambas lectinas esteve no intervalo entre 0,06-0,09 mg/ml de maneira que a densidade ótica, em 280 nm, não ultrapassou 0,08. Para minimizar o efeito do espalhamento de luz pelo tampão, de cada amostra foi subtraído o espectro do tampão correspondente.

### 2.3.2 Medidas de anisotropia estática

No espectrofluorímetro K2, ainda no modo estático, obteve-se a anisotropia das amostras de frutalina nos tampões ácido, neutro e básico. O comprimento de onda da luz incidente foi 290 nm e para a emissão ao invés do monocromador empregou-se apenas o filtro. A subtração do tampão da proteína, chamado branco, foi efetuada como nos espectros estáticos para cada amostra de proteína medida.

### 2.3.3 Medidas de dicroísmo circular (CD)

As medidas de CD procederam em um espectropolarímetro Jasco J715 (*Jasco Corporation*, Japão). As soluções de lectinas em concentrações de 0,15 a 0,18 mg/ml foram acondicionadas em cubetas de quartzo, do tipo circular, de 1 mm de caminho ótico. Os espectros foram gravados num intervalo de 195 a 240 nm, à 20 °C com, em média, 16 ou 32 varreduras dependendo do ruído

observado. Para os espectros contendo GndHCl o intervalo monitorado foi de 210 a 250nm devido à alta absorção do solvente em comprimentos de onda abaixo desta região.

## 2.4 CÁLCULOS DE PARÂMETROS TERMODINÂMICOS DOS PROCESSOS DE DESNATURAÇÃO E RENOVELAMENTO

A partir das medidas espectroscópicas foram construídas as curvas de desnaturação e de renovelamento e os parâmetros termodinâmicos foram calculados. Nesta seção se encontram, em mais detalhe, os procedimentos aplicados tanto aos processos reversíveis quanto aos irreversíveis incluindo o procedimento de desconvolução das curvas de dicroísmo circular e fluorescência.

### 2.4.1 Desconvolução dos espectros de fluorescência utilizando o programa CCA

Para testar os modelos irreversíveis de dois e três estados propostos para a análise das curvas de desnaturação térmica da jacalina, extraíram-se 3, 4 e 5 curvas puras de uma base construída com os espectros de fluorescência obtidos na desnaturação. Esta análise se deu através do programa *Convex Constraint Analysis (CCA)*, desenvolvido por Perczel e Fasman, baseado no algoritmo *Simplex* [Perczel A. et al, 1991; Perczel A. et al, 1992].

## 2.4.2 Cálculo da energia de estabilidade conformacional ( $\Delta G_{H_2O}$ ) das lectinas pelo modelo de dois estados

A curva de desnaturação reversível foi obtida colocando o parâmetro espectroscópico ( $\alpha$ )<sup>1</sup> no eixo das ordenadas e a variação do desnaturante químico no eixo das abscissas. Neste caso, o máximo de emissão de fluorescência foi utilizado como  $\alpha$ , obtido a partir do cálculo da integração de toda a curva. Os valores de  $\alpha$  característicos dos estados  $N$  ( $f_N$ ) e  $U$  ( $f_U$ ), foram obtidos pela extrapolação linear<sup>2</sup> das regiões anteriores e posteriores<sup>3</sup> à região de transição da proteína.

A análise da desnaturação reversível por dois estágios foi efetuada como descrito por C. N. Pace in: *Methods in Enzimology*, 1986. Sumariamente, após a obtenção das curvas de desnaturação reversíveis, de dois estágios temos:



<sup>1</sup> Pode ser encontrado também, na literatura, além das denominações  $S$  e  $\alpha$ , a denominação  $y$  para o parâmetro observável.

<sup>2</sup> Existem outros dois métodos para calcular a energia de estabilidade conformacional, um que considera que o desnaturante tenha uma constante de associação média com os diferentes aminoácidos da molécula chamado "modelo da ligação do desnaturante", e o "modelo da transferência de energia livre", que leva em conta a energia livre de cada aminoácido da cadeia lateral na mudança da água para a solução desnaturante. Esses métodos mais sofisticados necessitam de cálculos extras envolvendo todos os aminoácidos da proteína, ficando impossibilitado seu uso no caso da frutalina que ainda não possui sua estrutura primária totalmente identificada. Além disso, o método de extrapolação linear continua adequado à maioria dos casos. Maiores discussões podem ser encontradas em: Eftink, M.R. & Ionescu, R. 1997 *Biophysical Chem.* (64) 175-197.

<sup>3</sup> A região que antecede o início da transição do estado  $N$  para o estado  $U$  é chamada região pré-transicional, e a que sucede, região pós-transicional.



onde  $N$  e  $U^4$  representam, respectivamente, as formas nativa e desnaturada reversivelmente da proteína, e:

$$K_{eq} = f_U/f_N. \quad (2)$$

Para o referido mecanismo, a soma das frações presentes nos estados  $N$  ( $f_N$ ) e  $U$  ( $f_U$ ) é igual à unidade, uma vez que não há intermediários estáveis em quantidade suficiente para serem detectados. Assim:

$$f_N + f_U = 1 \quad (3)$$

$$\alpha_{observado} = \alpha_N f_N + \alpha_U f_U \quad (4)$$

Combinando (2) e (3) obtém-se:

$$f_U = (\alpha - \alpha_N)/(\alpha_U - \alpha_N) \quad (5)$$

$$f_N = (\alpha_U - \alpha)/(\alpha_U - \alpha_N) \quad (6)$$

Decorrente das equações anteriores, a energia livre de desnaturação  $\Delta G_D$ , torna-se:

$$\Delta G_D = -RT \ln[f_U/f_N] \quad (7)$$

Estimou-se a estabilidade conformacional ( $\Delta G^{H_2O}$ ) pelo método da extrapolação linear, no qual supõe-se uma dependência linear entre a energia de desnaturação e a concentração de desnaturante de acordo com a equação:

---

<sup>4</sup> O termo  $U$ , do inglês *unfolded*, é utilizado aqui para dar idéia de reversibilidade ao processo.

$$\Delta G_D = \Delta G^{H_2O} - m[GndHCl] \quad (8)$$

O gráfico de  $\Delta G_D$  versus concentração de GndHCl foi extrapolado e a reta ajustada de acordo com a equação acima na região de transição. Além da estabilidade conformacional ( $\Delta G^{H_2O}$ ) analisada pela energia, foram levados em consideração a quantidade necessária de GndHCl na qual o desenovelamento principia (m), o ponto médio da curva ( $[GndHCl]_{1/2}$ ), bem como a diferença entre a estabilidade conformacional em cada caso ( $\Delta(\Delta G)$ ), sendo:

$$\Delta(\Delta G) = \Delta[GndHCl]_{1/2} \cdot \bar{m} \quad (9)$$

#### 2.4.3 Cálculo da energia de estabilidade conformacional ( $\Delta G^{H_2O}$ ) das lectinas pelo modelo de três estados

A curva de desnaturação reversível no equilíbrio, induzida por agente químico desnaturante, GndHCl, foi construída a partir do cálculo do máximo de emissão para a jacalina e a partir da elipticidade molar em 219 nm para a frutalina. A análise, assumindo o processo reversível de três estágios [Mizuguchi M. et al, 1998; Kwajima K. et al, 1976]:



onde  $N$  e  $U$  representam os estados nativo e desnaturado das lectinas, e  $I$  o estado intermediário.  $K_{NI}$  e  $K_{IU}$  são as constantes do equilíbrio de transição do estado  $N$  para  $I$ , e do estado  $I$  para o estado  $U$  respectivamente.

O observável da proteína em cada concentração de desnaturante é dado pela soma de contribuições das duas transições, assim:

$$\alpha_{(obs)} = \alpha_N f_N + \alpha_I f_I + \alpha_U f_U \quad (11)$$

onde  $\alpha_N$ ,  $\alpha_I$  e  $\alpha_U$  são os observáveis do estado nativo, intermediário e desnaturado respectivamente. Os termos  $f_N$ ,  $f_I$  e  $f_U$  são relacionados ao equilíbrio,  $K_{NI}$  e  $K_{IU}$  são as transições da desnaturação e são relacionadas à energia livre das formas desnaturadas. Deste modo:

$$f_N = (\alpha_I - \alpha) / (\alpha_I - \alpha_N) \quad (12)$$

$$f_{I(N)} = (\alpha - \alpha_N) / (\alpha_I - \alpha_N) \quad (13)$$

$$f_{I(U)} = (\alpha_U - \alpha) / (\alpha_U - \alpha_I) \quad (14)$$

$$f_U = (\alpha - \alpha_I) / (\alpha_U - \alpha_I) \quad (15)$$

das equações anteriores, a energia livre pode ser estimada como

$$\Delta G_{NI} = -RT \ln[(f_{I(N)} / f_N)] \quad (16)$$

$$\Delta G_{IU} = -RT \ln[(f_U / f_{I(U)})] \quad (17)$$

onde  $R$  e  $T$  são, a constante dos gases e a temperatura absoluta.

Para estimar a estabilidade conformacional ( $\Delta G^{H_2O}$ ) foi assumida uma dependência linear da energia livre de desnaturação com a concentração do desnaturante até sua concentração zero. Então, a análise dos mínimos quadrados foi usada para ajustar os dados as equações:

$$\Delta G_{NI} = \Delta G_{NI}^{H_2O} - m_{NI} [GndHCl] \quad (18)$$

$$\Delta G_{IU} = \Delta G_{IU}^{H_2O} - m_{IU} [GndHCl] \quad (19)$$

#### 2.4.4 Cálculo da energia de ativação da lectinas por desnaturação térmica irreversível

Os espectros obtidos foram analisados segundo um processo irreversível de dois estados, descrito por Silva-Lucca R.A. et al., 1999:



onde  $N$  e  $D$ <sup>5</sup> representam, respectivamente, as formas nativa e irreversivelmente desnaturada da proteína, sendo  $k$  a razão de primeira ordem, constante, que varia com a temperatura de acordo com a equação de Arrhenius,

$$k = A \exp(-E_a / RT) \quad (21)$$

A fração da proteína desnaturada,  $f_D$ , é calculada a partir da relação:

<sup>5</sup> O termo  $D$ , do inglês *denatured*, é utilizado aqui para dar a idéia de irreversibilidade ao processo, no sentido que atividade biológica não é recuperada.

$$f_D = (\alpha_{obs} - \alpha_D) / (\alpha_N - \alpha_D) \quad (22)$$

e

$$f_n + f_D = 1 \quad (23)$$

No qual  $\alpha$  é qualquer observável espectroscópico da amostra a uma temperatura particular. No caso do presente experimento foram utilizados o máximo de emissão de fluorescência para a lectina jacalina e o mínimo característico dos espectros de dicroísmo circular para a lectina frutalina. Do mesmo modo,  $\alpha_N$  e  $\alpha_D$  são valores observáveis característicos dos estados nativo e desnaturado, nesta ordem.

A análise aqui utilizada para desnaturação irreversível, baseada no modelo de Lumry e Eyring, permite que  $k$  seja escrito em termos da teoria de estados de transição [Sánchez-Ruiz, J.M. et al, 1988], sendo fenomenologicamente equivalente a equação de Arrhenius. De fato, para este modelo, podemos calcular os dados cinéticos utilizando:

$$\ln(f_n) = -kt \quad (24)$$

$$-\ln(f_n) = kt \quad (25)$$

$$\ln(1/f_n) = kt \quad (26)$$

Calculados os valores de  $k$  para cada temperatura e, voltando a equação 21, temos:

$$\ln[k] = (E/R)(1/T_m - 1/T) \quad (27)$$

onde,  $k$  equivale a  $\ln(1/f_N)$  em função da temperatura.

Deste modo, a curva de transição pode ser expressa como função da temperatura:

$$\ln[\ln(1/f_N)] = (E/R)(1/T_m - 1/T) \quad (28)$$

Finalmente, através da equação 28 estimam-se a energia de ativação da reação,  $E_a$ , e a temperatura de transição,  $T_m$ .

RESULTADOS E DISCUSSÕES

---

3.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DAS LECTINAS JACALINA E FRUTALINA

As lectinas jacalina e frutalina, depois de isoladas por cromatografia de afinidade em colunas de Sepharose-D-Galatose, foram submetidas à cromatografia de exclusão molecular (SEC, *Size Exclusion Chromatography*) em Superdex 75, em seguida eletroforese e posteriormente analisadas por dicroísmo circular (CD), fluorescência e teste de atividade biológica.

A figura 3.1 A mostra o perfil de eluição da frutalina nativa sobre SEC, com um peso molecular aparente (PMA) de 66kDa como anteriormente descrito [Moreira R.A. et al, 1998]. Na figura 3.1 B encontra-se o perfil de eluição da jacalina, também com o PMA de 66 kDa, como descrito na literatura [Sankaranarayanan R. et al, 1996].

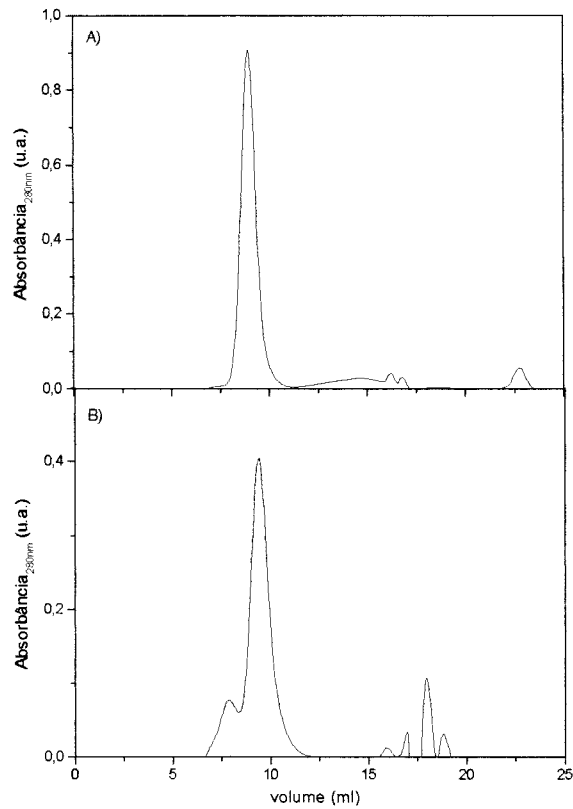


Figura 3.1: SEC da fração nativa da jacalina (A) e da frutalina (B) em coluna Superdex 75 HR 10/30 (sistema Äkta Explorer-10). A coluna foi equilibrada e eluída com PBS pH 7,4 contendo 0,1 M D-Galactose e 0,1 M D-Manose a 22 °C. A velocidade de fluxo foi de 0,5 ml/min, monitorada pela absorbância em 280 nm. A amostra de frutalina injetada continha 0,1 mg/ml de proteína e a de jacalina, 0,2 mg/ml.

A eletroforese da frutalina em gel desnaturante, SDS-PAGE, mostra duas bandas em torno de 12,4KDa, como pode ser analisado na figura 3.2 A. A jacalina também apresenta estas duas bandas (figura 3.2 B) e isto se deve à separação de monômeros com diferentes graus de glicosilação [Roque-Barreira M.C. et al., 1986; Moreira R.A. et al, 1998].



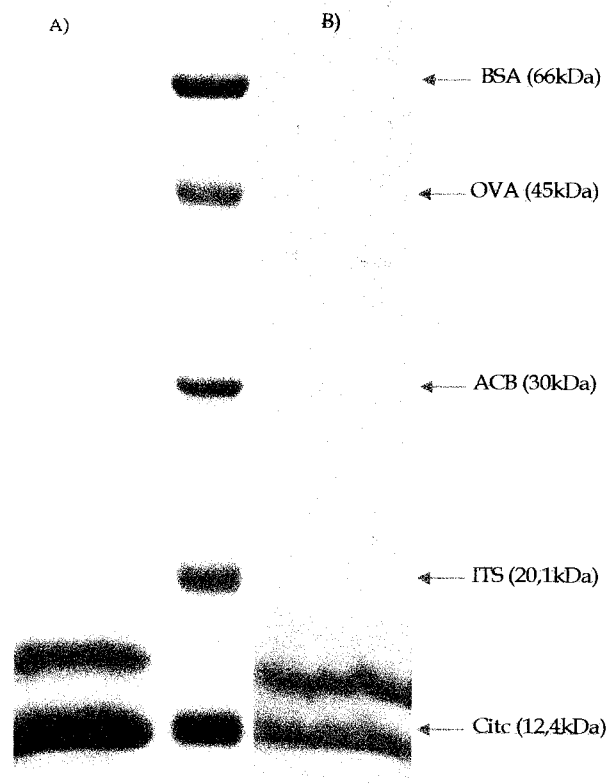


Figura 3.2: Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS da lectina jacalina (A) e frutalina (B). Coluna ao centro: marcadores moleculares.

Tanto a frutalina quanto a jacalina, ambas na forma nativa, apresentam um espectro de CD característico de estruturas em folhas beta, como pode ser observado na figura 3.3. Este espectro se caracteriza por uma banda positiva em 203 nm e uma banda negativa em torno de 219 nm, sendo este perfil observado tanto na presença quanto na ausência do açúcar ligante. O cruzamento com a linha positiva se dá próximo de 210 nm para ambas lectinas.

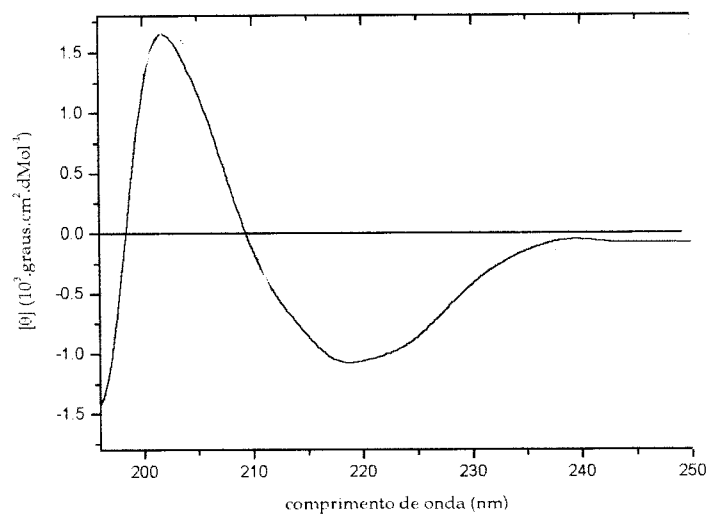


Figura 3.3: Espectro de CD da frutalina (—) e jacalina (---) nativas em PBS. As medidas foram realizadas em cubetas de quartzo com 1mm de caminho ótico. O espectro é resultante de 8 varreduras.

O espectro de fluorescência da jacalina, ilustrado pela figura 3.4, mostra um máximo de emissão em 332 nm.

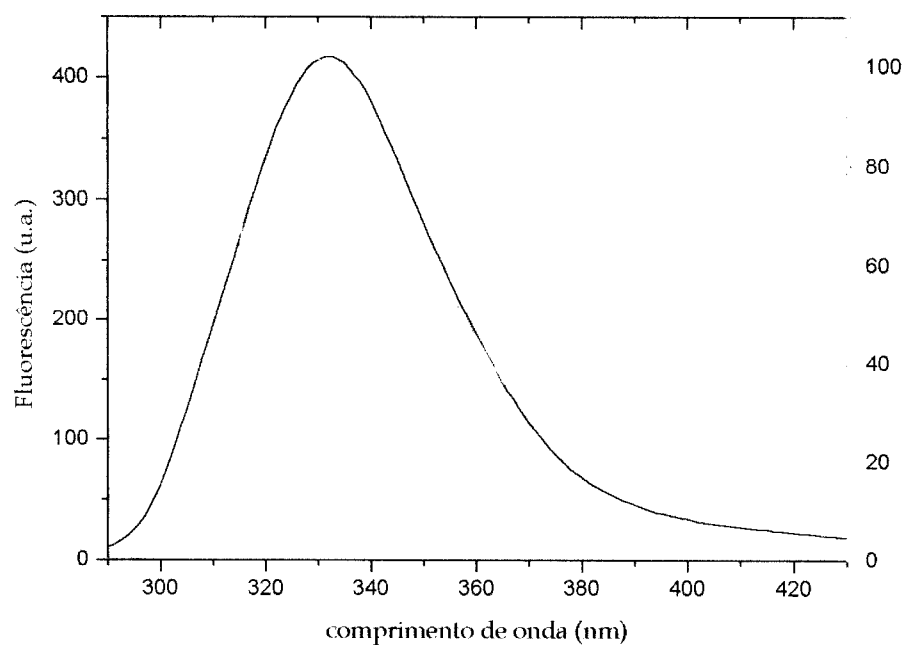


Figura 3.4: Espectro de fluorescência da frutalina (—) e jacalina (---) nativas em PBS. As medidas foram realizadas em cubetas de quartzo com 1cm de caminho ótico, e o comprimento de excitação de 280 nm.

Como no caso da frutalina, que apresenta o máximo de emissão em 327 nm ilustrado pela figura 3.4, esta emissão é típica de triptofanos escondidos no interior da molécula [Eftink M.R., 1991 e Lakowicz J.R., 1983].

Ambas lectinas aglutinaram hemácias humanas do grupo ABO, sendo que a frutalina apresenta uma capacidade hemaglutinante com a UH, em concentração de proteínas, cerca de três vezes maior do que a jacalina.

Estas lectinas, ambas ligantes de D-Galactose, com alta identidade em suas seqüências de aminoácidos, acima de 90%, semelhança dos espectros de CD, conformação predominantemente beta, espectros de fluorescência muito similares, apresentam diferenças quanto à atividade hemaglutinante, estabilidade frente a agentes desnaturantes (químicos e térmico) e pH, além de comportamento diferente durante seus processos de desnaturação e renovelamento.

Na figura 3.5 está ilustrada a variação do máximo de emissão de fluorescência da frutalina em função do pH na ausência do açúcar ligante. Até o pH 9 não foram observadas mudanças significativas, iniciando o deslocamento do máximo de emissão a partir de pH 9,2, acentuado-se após o pH 11. Experimentos realizados na presença do açúcar ligante forneceram resultados similares.

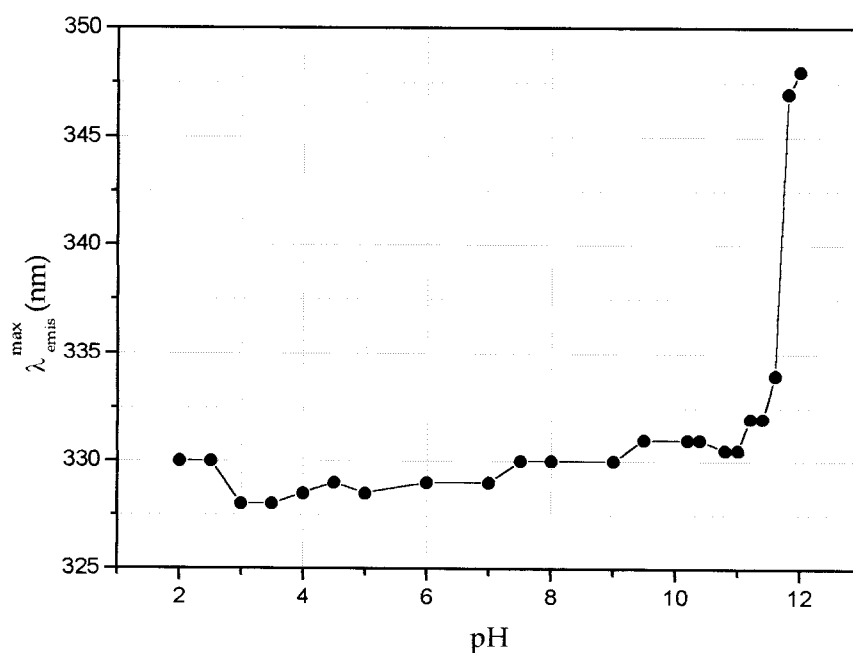


Figura 3.5: Variação da posição do máximo de emissão de fluorescência da frutalina submetida à vários valores de pH, na ausência do açúcar ligante.

De acordo com estes resultados, não houve exposição dos resíduos de triptofano na faixa de pH 2 a 9. Acredita-se porém que mesmo no extremo ácido as moléculas de frutalina encontram-se estruturalmente diferentes da nativa, embora arranjadas de forma que os triptofanos não estejam expostos ao ambiente do solvente. Resultados recentes de cromatografia de exclusão molecular mostraram que frutalina em pH ácido, é eluída na posição da proteína tetramérica, na presença de D-Galactose [Monteiro-Moreira, A.C.O., 2002], sugerindo que nos pH extremamente ácidos a frutalina se encontre em forma de agregados moleculares solúveis.

A formação destes complexos moleculares maiores em função do pH ácido foram investigados por medidas de anisotropia estática da lectina na

presença e ausência de D-galactose. A figura 3.6 mostra a variação da anisotropia em função do pH. Na presença ou ausência do açúcar ligante a frutalina apresenta na região de pH 5 a 9, valores aproximadamente constantes (em média, 0,14), diminuindo acima de pH 9,5 e atingindo o menor valor (aproximadamente 0,08) quando a lectina encontra-se desnaturada. Os valores na região ácida, abaixo de pH 4, aumentam sugerindo formação dos complexos moleculares solúveis, confirmando assim os resultados acima citados.

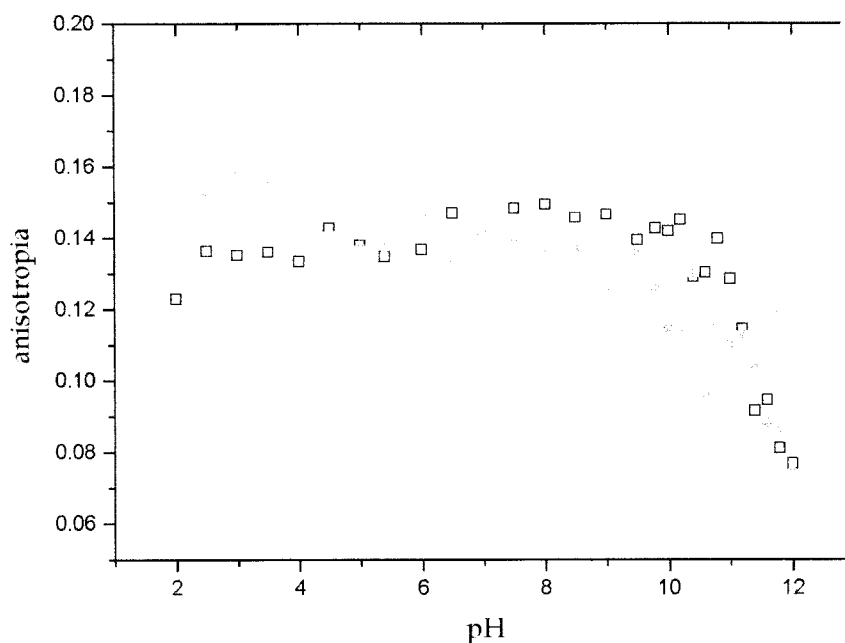


Figura 3.6: Valores de anisotropia em função do pH para a frutalina, na presença de D-Galactose (○) e o experimento sem o açúcar ligante (□). Comprimento de onda de excitação: 290 nm. Concentração da lectina: 0,09 mg/ml.

A partir dos resultados de anisotropia foi investigado também, através de medidas de CD, a manutenção e/ou modificações de estrutura secundária.

A pergunta era: os agregados moleculares observados na faixa de pH mais baixos (menor que quatro) mantinham suas estruturas secundárias intactas?

Após a obtenção de cada espectro na faixa de pH de 2.0 a 12.0, foi construída uma curva de variação do espectro tomando-se como base o valor da elipticidade molar no comprimento de onda de 219 nm, figura 3.7.

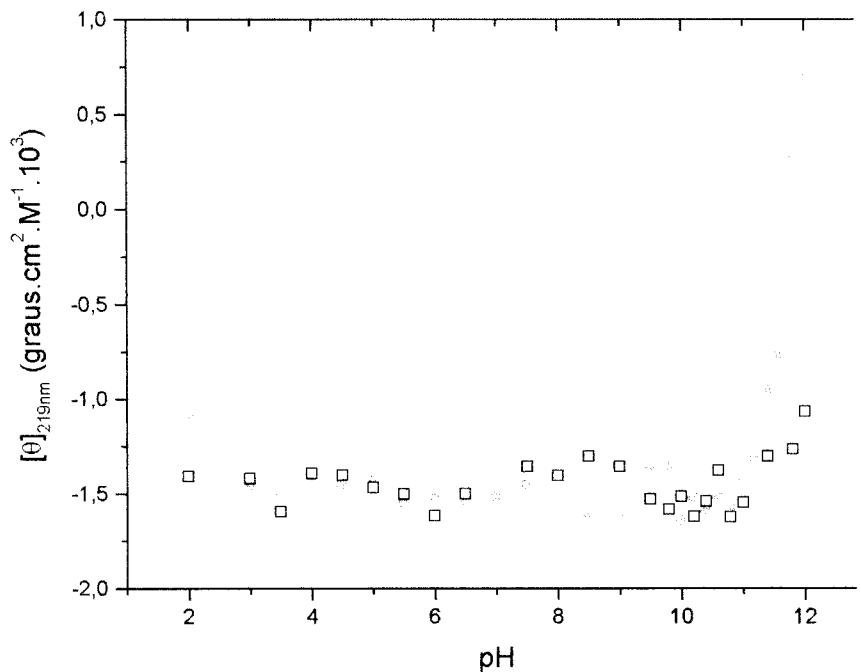


Figura 3.7: Elipticidade molar da frutalina como função do pH. Os círculos azuis representam o experimento na presença de D-Galactose e os quadrados brancos o experimento sem o açúcar ligante. Concentração típica das amostras: 0,15 mg/ml. As medidas foram realizadas em cubetas de quartzo com 1mm de caminho ótico. Cada espectro é resultante de 16 varreduras.

Tais curvas sugerem modificações significativas na estrutura secundária, indicando desnaturação da frutalina apenas a partir de pH 11, tanto na presença como na ausência do açúcar.

Verificou-se assim que em pH ácido a lectina não sofre mudanças significativas em sua estrutura secundária, indicando que a forma molecular adquirida neste ambiente mantém a estrutura secundária similar à da forma nativa. Entretanto os resultados de hemaglutinação confirmam que a frutalina estava destituída de atividade biológica, como ilustrado na figura 3.8.

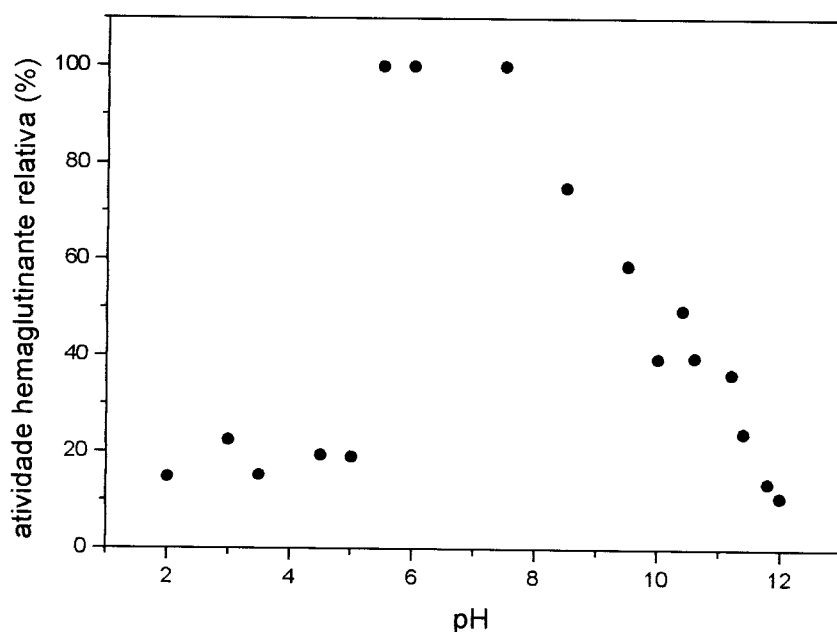


Figura 3.8: Atividade hemaglutinante relativa da frutalina como função de pH, na presença de D-Galactose.



Em regiões muito básicas, acima de pH 11, a proteína também se encontra sem atividade pois, concordando com os resultados anteriores, nesta região a lectina está desnaturada.

### 3.2 FRUTALINA SUBMETIDA À DESNATURAÇÃO POR TEMPERATURA

Resultados anteriores mostraram que a frutalina submetida a processos de desnaturação por temperatura, foi renovada e que este fenômeno foi dependente de seu açúcar ligante, a D-Galactose [Campana P.T., 1998; Campana P.T. et al, 2001].

Porém, esta reversibilidade ocorreu somente depois de longos períodos de congelamento. A curva de desnaturação, portanto, não é reversível, uma vez que a lectina não retorna à sua forma enovelada quando a temperatura é retornada à temperatura ambiente.

A figura 3.9 mostra a curva de desnaturação no equilíbrio da lectina frutalina, obtida através da elipticidade molar em 219nm, em função da temperatura na ausência do açúcar ligante. A curva sugere um processo de dois estágios, sem intermediários estáveis o suficiente para serem detectados, onde a temperatura média de transição é  $320 \pm 15 \text{K}$  e a energia de ativação para o processo em equilíbrio  $226 \pm 5 \text{ kJ/mol}$ .

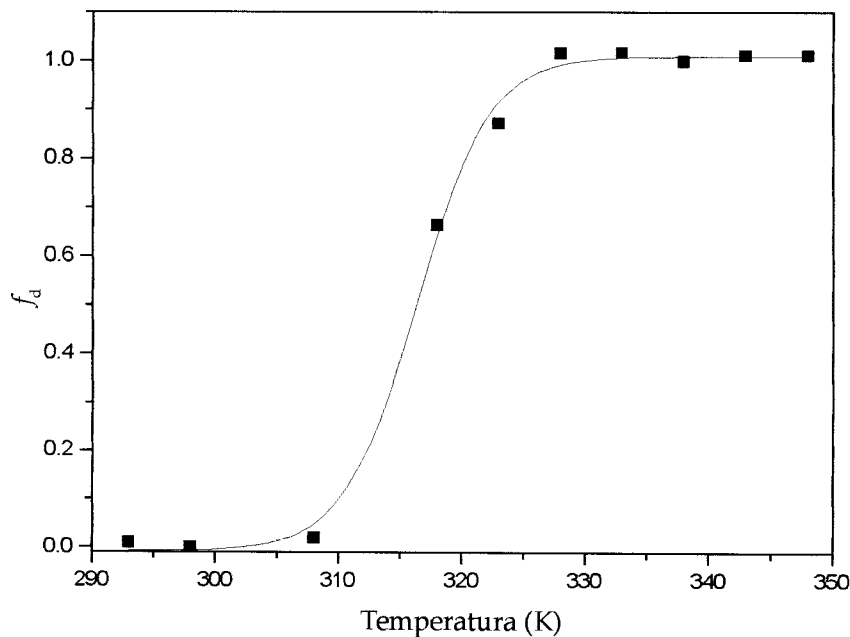


Figura 3.9: Curva de transição do processo de desnaturação térmica da frutalina em PBS calculada a partir do valor de elipticidade molar dos espectros de CD em 219nm.

Embora a curva acima tenha um perfil compatível com o modelo de dois estágios o erro no cálculo foi superior aos encontrados na literatura. Este fato pode ter explicação nas altas taxas de precipitação de proteína quando o experimento de desnaturação térmica é realizado, dificultando o controle da concentração das amostras.

### 3.3 ESTUDOS DE DESNATURAÇÃO E RENOVELAMENTO DA LECTINA FRUTALINA NA PRESENÇA DE HIDROCLORETO DE GUANIDINA

Esta lectina foi desnaturada na presença e na ausência do açúcar ligante D-Galactose utilizando hidrocloreto de guanidina (GndHCl). No processo de

renovamento foi encontrada uma população intermediária estruturalmente diferente tanto da lectina renovada quanto na forma desnaturada. A análise dos processos de desnaturação e renovamento incluiu cálculos de parâmetros termodinâmicos das curvas obtidas por fluorescência [Campana et al., 2001] e análise das curvas de CD, tanto na presença quanto na ausência do açúcar ligante.

### 3.3.1 Reações de incubação em GndHCl – diálise e diluição para obtenção da lectina renovada

A frutalina, inicialmente, foi submetida a concentrações de 1M, 2M, 3M, 4M, 5M e 6M de GndHCl pelo período de cinco minutos (tempo necessário para a preparação da amostra e colocação nas cubetas) até quatro horas. Após esse período, concentrações acima de 4M já foram suficientes para que a lectina perdesse sua estrutura secundária apresentando um espectro de dicroísmo circular típico de proteína desnaturada, como pode ser visto na figura 3.10. As frações de proteína com concentrações menores de desnaturante já haviam atingido o equilíbrio termodinâmico, como pode ser visto na figura 3.11.

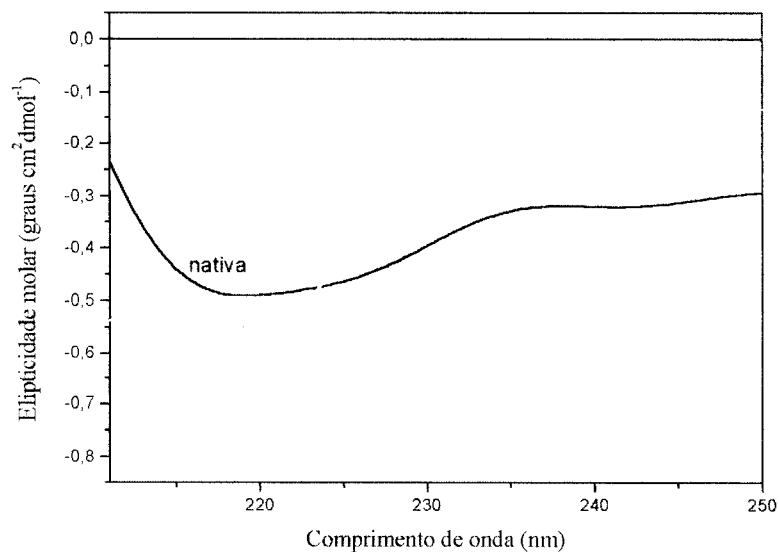


Figura 3.10: Desnaturação da frutalina utilizando hidrocloreto de guanidina na concentração de 4M por 4 horas. Os espectros foram registrados de 210 a 250 nm devido à alta absorção do GndHCl abaixo desta região.

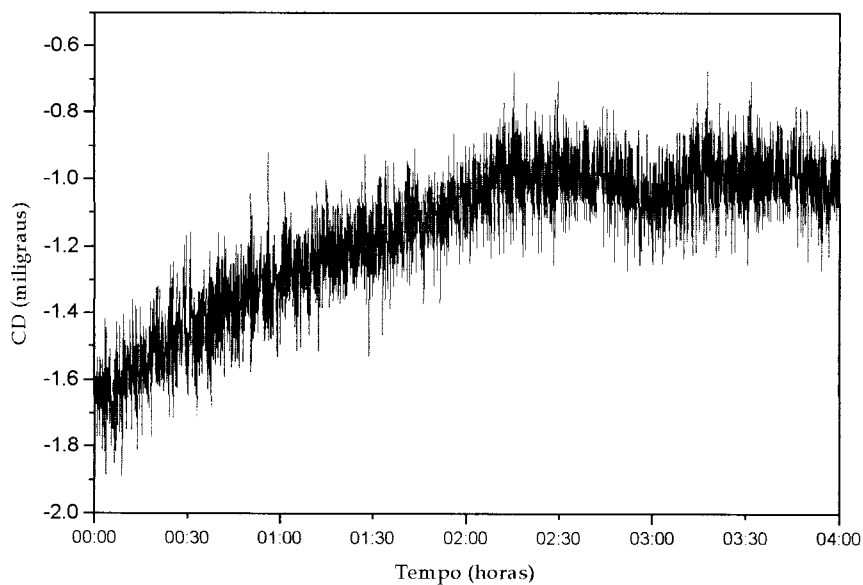


Figura 3.11: Monitoramento da mudança espectral, em 219 nm, da frutalina em solução contendo PBS D-galactose 0,1M-GndHCl 3,5M.

Num lote de proteína purificada posteriormente, foram necessárias 12 horas para que a desnaturação ocorresse em 4M de GndHCl, provavelmente devido à predominância de alguma isoforma mais estável da proteína. Este fato, e para que os experimentos da frutalina transcorressem nas mesmas condições da jacalina foram utilizados 6M de GndHCl durante as desnaturações.

A frutalina desnaturada por 12 horas em uma solução contendo 6M de GndHCl foi, em seguida, submetida a processos de diálise e diluição para a retirada do desnaturante promovendo o renovelamento. As frações renoveladas foram examinadas por medidas de dicroísmo circular. A figura 3.12 mostra os espectros, nativo com o mínimo característico de estruturas em folhas beta (219 nm) e desnaturado caracterizado pela perda deste mínimo. Na mesma figura pode ser observado que a fração renovelada readquire a banda na região de 219 nm, característica da estrutura nativa que havia sido perdida pela desnaturação.

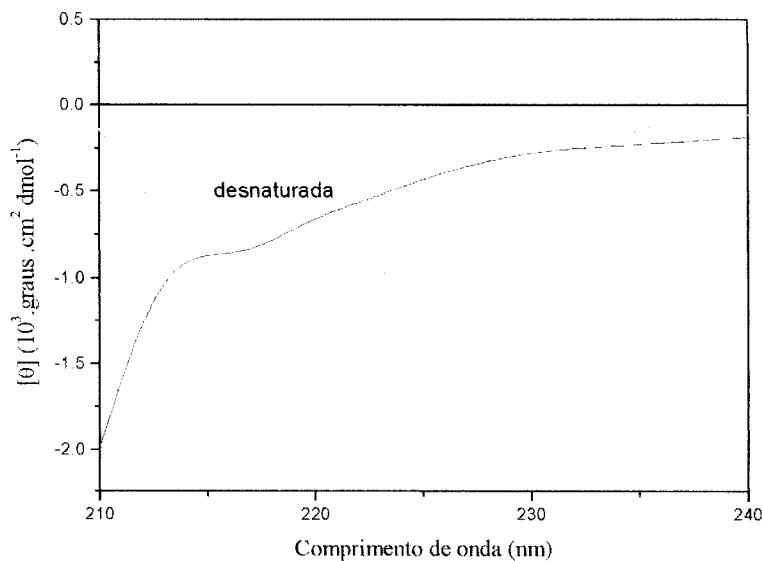


Figura 3.12: Renovelamento da frutalina por diálise. As medidas foram realizadas em cubetas de quartzo com 1mm de caminho ótico. Cada espectro é resultante de 8 varreduras, registradas de 210 a 250 nm devido à alta absorção do GndHCl abaixo desta região.

No processo de diluição, utilizado também para recuperar a proteína em sua forma renovada, a frutalina readquire a banda característica da estrutura nativa em 220 nm na última diluição. Este resultado pode ser visto na figura 3.13, que indica, por outro lado, a presença de uma população intermediária possível de ser detectada na segunda diluição. Parte desta população, provavelmente, atingiria a forma nativa e parte dela não. Este fato explicaria o espectro da última diluição que, apesar de recuperar a banda em 220nm não tem exatamente a forma do espectro nativo.

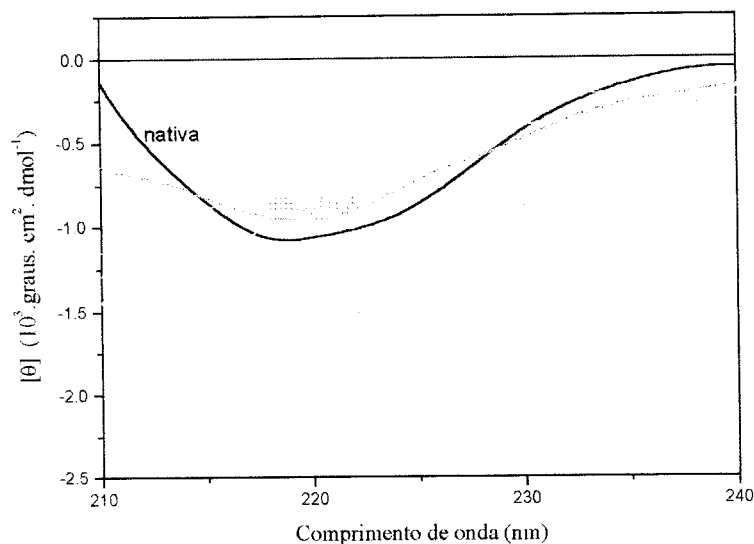


Figura 3.13: Renovamento da frutalina por diluição. As medidas foram realizadas em cubetas de quartzo com 1mm de caminho ótico. Cada espectro é resultante de 8 varreduras, registradas de 210 a 250 nm devido à alta absorção do GndHCl abaixo desta região.

As evidências da existência de uma população intermediária estável o suficiente para ser detectada por dicroísmo circular, levaram ao experimento para a separação e caracterização desta população. Na figura 3.14 tem-se o perfil cromatográfico (por SEC) de eluição da fração renovada por diluição. Notam-se duas frações oriundas da fração renovada inicial: a fração renovada (chamada frutalina-r) na mesma posição de eluição da fração nativa (em torno de 8-10 ml) e uma outra fração, numa posição de eluição entre as frações nativa e desnaturada, chamada de fração mal-enovelada (frutalina-m) eluída, tipicamente, entre 13-14 ml.

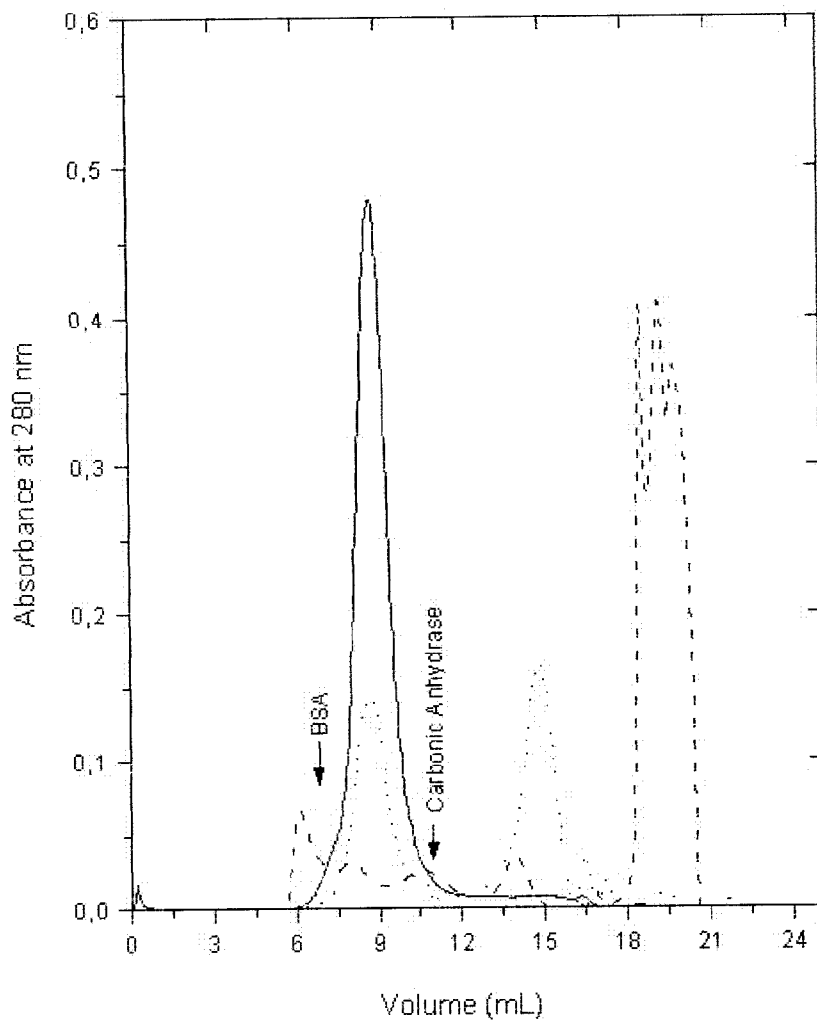


Figura 3.14: SEC das frações nativa (—), desnaturada (- -) e renovadas por diluição (...), em coluna Superdex 75 HR 10/30 (sistema Äkta Explorer-10). A coluna foi equilibrada e eluída com PBS pH 7,4 contendo 0,1 M D-Galactose e 0,1 M D-Manose a 22 °C. A velocidade de fluxo foi de 0,5 ml/min, monitorada pela absorbância em 280 nm. Todas as amostras continham 0,1 mg/ml de proteína. Figura retirada de Campana P.T. et al, 2001.

Uma vez purificadas, as frações frutalina-r e frutalina-m foram caracterizadas no que diz respeito à sua estrutura secundária e a vizinhança de seus triptofanos. A figura 3.15 ilustra os espectros de CD de todas as frações



estudadas: a fração nativa caracterizada pela existência do mínimo em 219-220 nm e um máximo em 203 e a fração desnaturada, caracterizada pela perda destas bandas. A fração frutalina-r, que recupera as duas bandas, exibindo um perfil de estrutura secundária característico das formas nativas e a fração frutalina-m que apresenta um perfil completamente diferente desta última.

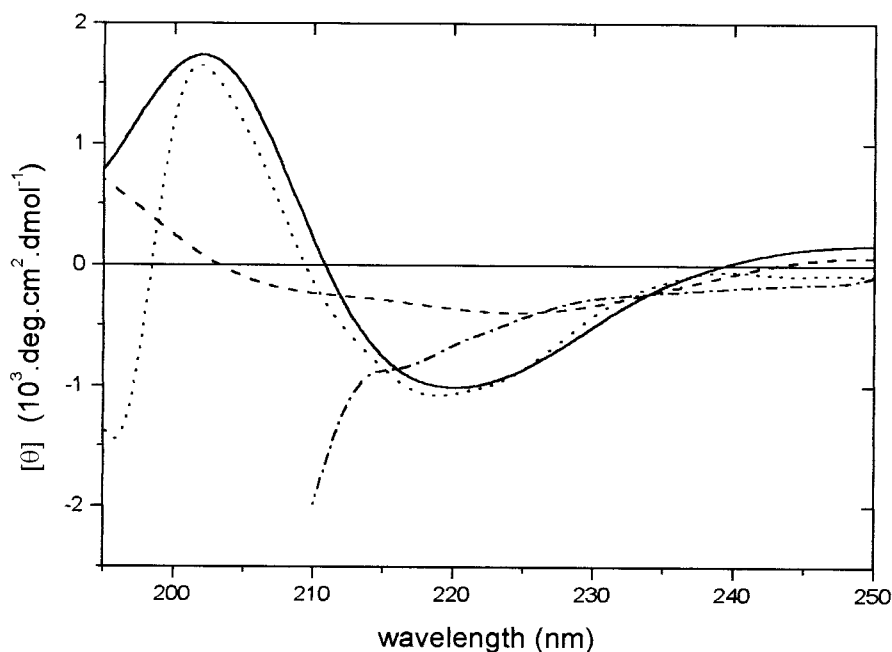


Figura 3.15: Espectros de CD da frutalina nativa (—), desnaturada (- - -), frutalina-r (•••) e frutalina-m (- · - ·). As medidas foram realizadas em cubetas de quartzo com 1mm de caminho ótico. Cada espectro é resultante de 16 varreduras. Figura retirada de Campana P.T. et al, 2001.

Os espectros relativos às frações nativa, frutalina-r e frutalina-m foram desconvoluídos utilizando o programa CCA, como descrito no procedimento experimental. As porcentagens de estrutura secundária obtidas foram: 86% de

componentes beta (folhas beta paralela e antiparalela, e voltas beta) e 16% de outras contribuições para as formas nativa e renovelada, com um de desvio médio (RMS) de 1%. A desconvolução da frutalina-m mostrou 13% de hélices alfa e 12% de componentes beta, 56% de outras contribuições, sendo 6% de RMS. Apesar do valor do RMS mostrar-se relativamente alto, os resultados da desconvolução deixam claro que a frutalina-m é estruturalmente diferente das formas nativa e renovelada [Campana, et al., 2001].

A espectroscopia de fluorescência foi também utilizada para elucidar a caracterização da população intermediária em relação à sua estrutura terciária, podendo ser vista na figura 3.16. Esta figura contém a frutalina em sua forma nativa, com o máximo de emissão em 330 nm que, quando desnaturada exibe um deslocamento da posição deste máximo para comprimentos de onda da região vermelha do espectro, 348 nm, e um aumento na intensidade de fluorescência, sugerindo exposição de seus triptofanos. O espectro da frutalina na forma renovelada (frutalina-r) recupera a posição do máximo, indicando que, além de recuperar sua estrutura secundária, esta fração apresenta alguma organização na estrutura terciária.

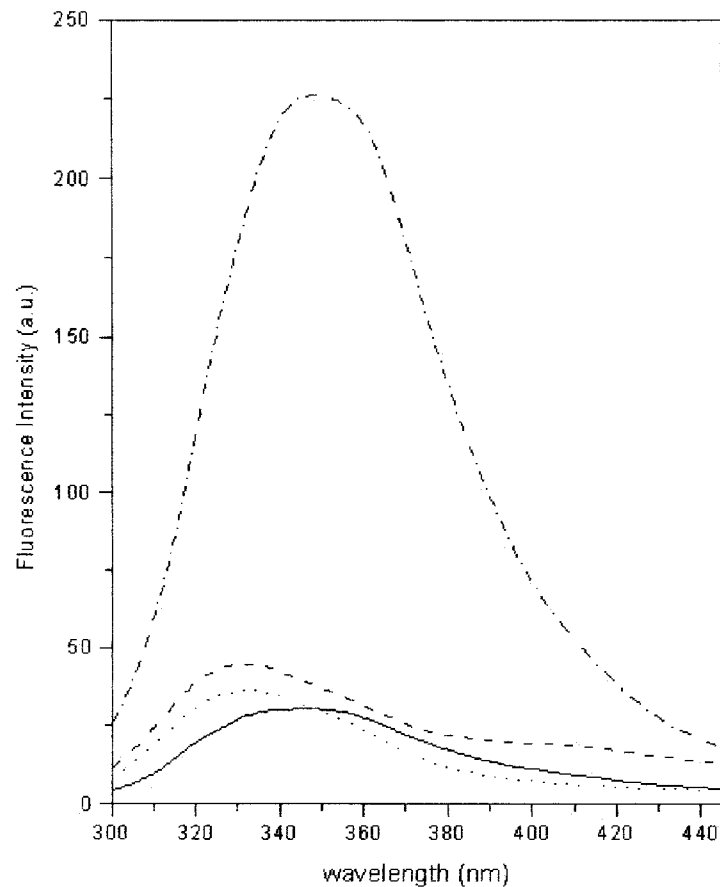


Figura 3.16: Espectros de fluorescência da frutalina em sua forma nativa (...), desnaturada (-.-.-), frutalina-r (- -) e frutalina-m (—). O comprimento de onda de excitação foi de 280 nm e as medidas realizadas em cubetas de quartzo com 1 cm de caminho ótico, com 0,08 mg/ml. Figura retirada de Campana P.T. et al, 2001.

A frutalina-m, por sua vez, tem o máximo de emissão em 353 nm e sua intensidade diminuída, não recuperando o perfil da proteína nativa. Essa última característica aliada à organização secundária que esta população apresentou, mesmo que diferente da estrutura nativa, sugere que estas formas sejam do tipo *molten globule* (MG), como descrito na introdução. Porém, para

que sejam chamados *MG* são necessários experimentos para confirmar se o volume destas moléculas é aproximadamente o mesmo da proteína em sua forma nativa.

Os ensaios de hemaglutinação, sumarizados na tabela 3.1, revelaram que esta fração tem atividade biológica positiva, caracterizando-a, então, como proteína renaturada que readquiriu sua forma nativa. A precipitação da frutalina-m, após a amostra ter sido congelada tornou inviável a realização dos ensaios de atividade biológica.

Tabela 3.1: Ensaio de atividade hemaglutinante de frutalina nativa (Nfrutalin), desnaturada (Ufrutalin) e renovelada (Rfrutalin). Concentração inicial das amostras utilizadas: <sup>a</sup>0,1 mg/mL, <sup>b</sup>0,09 mg/mL e <sup>c</sup>0,1 mg/mL. Tabela retirada de Campana et al., 2001.

	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
Nfrutalin <sup>a</sup>	+	+	+	+	+	-
Ufrutalin <sup>b</sup>	+	-	-	-	-	-
Rfrutalin <sup>c</sup>	+	+	+	+	+	-

Os resultados anteriores mostraram que a frutalina, na presença de seu açúcar ligante, pode ser desnaturada de maneira reversível, e que durante o renovelamento há a formação de uma população intermediária estável o suficiente para ser separada ao final do processo, constituindo uma mistura entre a população completamente renovelada e esta intermediária.

Investigando, no entanto, a curva reversível de enovelamento por fluorescência, tanto na presença quanto na ausência do açúcar ligante, não foi

observado o intermediário. Já a curva obtida com os espectros de dicroísmo circular mostra pelo menos um intermediário estável no equilíbrio, a baixas concentrações de desnaturante. Os resultados e sua análise encontram-se a seguir.

### 3.3.2 Estudos de enovelamento da frutalina no equilíbrio monitorado por fluorescência estática

As curvas de desnaturação e renovelamento induzidas por GndHCl obtidas através dos espectros de fluorescência da frutalina compõem as figuras 3.17 A e B. Na figura 3.17 A temos a lectina no tampão sem D-Galactose. A curva obtida sugere uma reação de primeira ordem, reversível neste caso, que pode ser analisada de acordo com a equação  $N \leftrightarrow U$ , onde  $N$  é o estado nativo e  $U$  o estado completamente desenovelado, e ajustada concordando com a análise contida no procedimento experimental.

A curva da figura 3.17 B, que mostra a reação da lectina a GndHCl em presença do seu açúcar ligante, foi ajustada do mesmo modo que a anterior. Comparando ambas figuras, A e B, evidencia-se o fato que, para que a transição do estado  $N$  para o estado  $U$  se inicie é necessária uma concentração maior de GndHCl no caso da reação ocorrida na presença do açúcar ligante, do que em sua ausência.

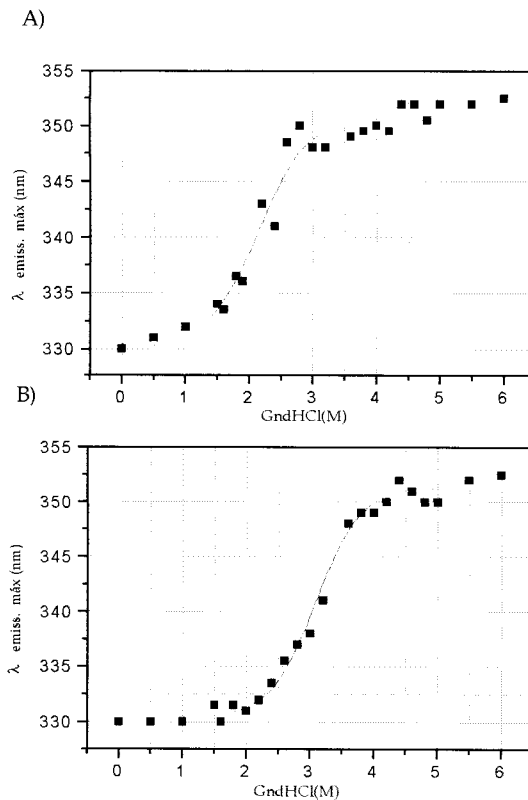


Figura 3.17: Variação do máximo de emissão de fluorescência da frutalina com desnaturante químico, GndHCl, na ausência (A) e na presença (B) de D-Galactose.

Este fato, que sugere uma estabilidade da lectina quando na presença do açúcar ligante, foi posteriormente confirmado pelos valores de energia de estabilidade conformacional.

Ainda analisando a figura 3.17 (A e B) nota-se que as regiões pós-transicionais não são exatamente lineares, indicando a presença de outros estados termodinâmicos desenvolvidos, com a diferença energética entre o estado nativo  $N$  e o primeiro desenvolvido,  $U1$ , maior que a diferença entre o

estado  $U1$  e os próximos estados desenvolvidos, como ilustrado a seguir na figura 3.18.

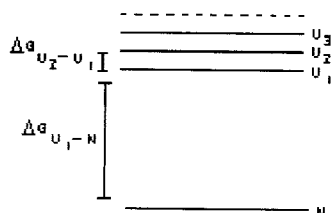


Figura 3.18: Diferenças de energia no modelo termodinâmico com vários microestados desenvolvidos.

Esta região desnaturada pode ainda, indicar uma região de estrutura variável, chamada *random coil*, consistindo em uma larga distribuição de confôrmeros, alguns altamente estendidos, outros altamente compactados. Existem evidências que nesta região algumas seqüências apresentem estrutura secundária residual, e há casos em que esta estrutura secundária se assemelhe à encontrada na forma nativa, ocorrendo principalmente quando a proteína necessita de altas concentrações de desnaturante para atingir o estado desnaturado [Pain H R., 2000].

Por este ângulo, parece relevante que o estado desenvolvidos, em verdade, seja extremamente heterogêneo no que diz respeito às conformações que contém, tanto global como localmente, vários estados termodinâmicos desenvolvidos de valores de energia ligeiramente diferentes entre si.

Vários destes estágios desenvolvidos, caracterizados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR-*Nuclear Magnetic Resonance*), apontam para a existência de *clusters* hidrofóbicos e conformações mais compactas com um conjunto de estrutura desnaturada demonstrando certas características do enovelamento nativo, mesmo na presença de altas concentrações de desnaturantes químicos [Mok Y.K. et al, 1999; Wuthrich K., 1994; Dobson C.M., 1992].

Sabe-se, porém, que as diferenças energéticas que devem ser levadas em conta quando da ocorrência da transição, são as entre os estados nativo e o primeiro estado desenvolvido. Decorre deste fato que a pequena diferença energética entre os vários desenvolvidos torna-se de pouca importância para a determinação do valor do ponto médio e da estabilidade conformacional da transição [Eftink M.R. e Ionescu R., 1997]. Isto posto, o estado desenvolvido será considerado um macroestado termodinâmico no qual coexistem diferentes microestados da forma desenvolvida da proteína, podendo a região pós-transicional ser extrapolada linearmente não comprometendo a veracidade da análise.

Ainda no que diz respeito à estabilidade da lectina, pode-se analisar sua estabilidade conformacional também como a diferença na estabilidade da lectina com e sem o açúcar ligante, ilustrada pelo valor de  $\Delta(\Delta G^{H_2O})$ , contido na tabela 3.2. O valor da energia de estabilidade conformacional da lectina na



presença de seu açúcar ligante (D-Galactose) foi 17,12 kJ/mol, sendo maior que a energia na ausência da D-Galactose 12,34 kJ/mol.

Tabela 3.2: Comparação da estabilidade conformacional da frutalina na presença e ausência do açúcar ligante. <sup>a</sup>Diferença de estabilidade da frutalina nos tampões contendo e não contendo D-Galactose, respectivamente.

	$\Delta G_{H_2O}$ kJ/mol	$\Delta(\Delta G_{H_2O})^a$ kJ/mol
Frutalina em PBS	12,34	
Frutalina em PBS D-Galactose	17,12	1,13

Estes valores sugerem maior estabilidade da frutalina quando na presença do seu açúcar ligante com uma diferença da estabilidade da frutalina nos dois ambientes de 1,13 kJ/mol.

Para inferir se esta estabilidade é relacionada apenas aos monômeros, pensemos nas mudanças estruturais relacionadas ao deslocamento do máximo de fluorescência para a região do vermelho, que concerne na exposição do triptofano, e nos resultados dos testes de hemaglutinação.

Ambas curvas de atividade da frutalina mostradas na figura 3.19 A e B, perdem aproximadamente 70% da sua atividade nas concentrações acima de 1,5M de GndHCl. Porém, no caso da frutalina na presença do açúcar, (figura 19 B), a perda da atividade se dá antes do início do deslocamento do máximo de emissão de fluorescência, indicando que, antes que a estrutura terciária seja modificada e os triptofanos sejam expostos, a atividade biológica já diminuiu expressivamente. A relação deste resultado com o fato de que são necessários no mínimo, dois sítios ligantes para que a hemaglutinação ocorra, nos leva a

crer que exista apenas um sítio para a ligação de hemácias por monômero. Caso os monômeros possuíssem dois sítios, a maior perda da atividade coincidiria com a perda da estrutura monomérica e não antes dela.

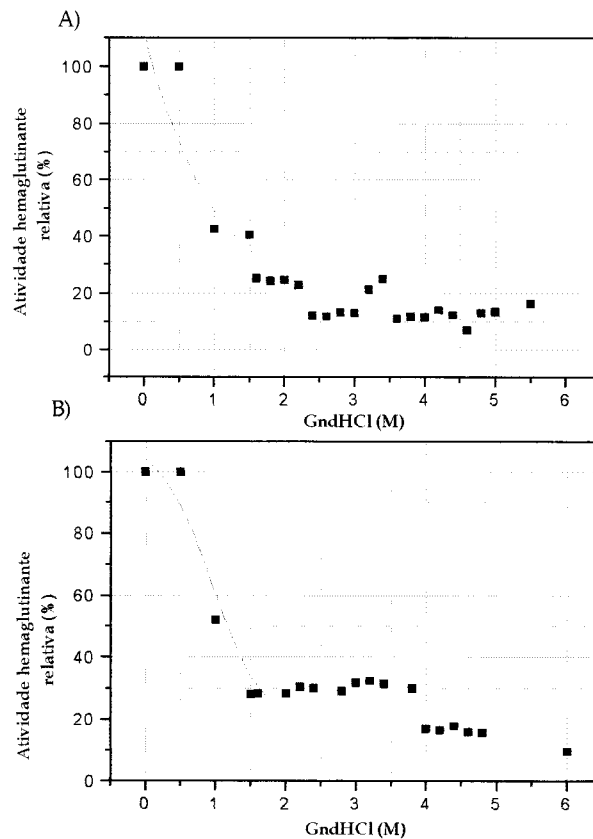


Figura 3.19: Atividade hemaglutinante relativa das frações de frutalina em solução tampão contendo somente GndHCl (A) e GndHCl e D-Galactose (B).

Analisando com mais detalhe a figura 3.19A, onde o tampão no qual a reação ocorre não contém D-Galactose, nota-se que a frutalina apresenta 40% da atividade biológica em 1,0M de desnaturante. Nesta concentração, temos o máximo de emissão deslocado, mostrando que os triptofanos dos monômeros estão sendo expostos (como observamos anteriormente na figura 3.18A). Estes dois resultados sugerem a coexistência de ambas formas neste estágio; formas

monoméricas perdendo sua estrutura terciária e formas diméricas e/ou tetraméricas que ainda apresentam atividade. O processo não parece ser organizado no sentido de, primeiramente, termos a perda dos tetrâmeros e dímeros e, após isto, o desenovelamento dos monômeros.

Na presença do açúcar ligante, a exposição dos triptofanos na desnaturação em presença de D-Galactose inicia-se com um pouco mais de 1,0M de GndHCl e apenas acima desta concentração, (figura 3.19B), ocorre perda significativa, 70%, da atividade relativa.

A presença do açúcar nos sítios da proteína lhe confere uma estabilidade maior observada pelo valor da energia de estabilidade na ausência e na presença de D-Galactose. Além disso, o açúcar parece aumentar a estabilidade dos tetrâmeros e dímeros, provavelmente como consequência da maior estabilidade dos monômeros, uma vez que estes podem permanecer “insensíveis” a determinadas concentrações de desnaturante. Porém experimentos de desnaturação com diferentes concentrações da proteína e relações de equimolaridade com o açúcar ligante, são requeridos para confirmar esta estabilidade.

### 3.3.3 Presença de forma intermediária nos estudos da frutalina no equilíbrio, monitorados por dicroísmo circular e separados por SEC

Os resultados de diálise e diluição da lectina para a obtenção da proteína renovada deixaram claro a existência de, pelo menos, um intermediário de enovelamento, o qual não foi estável o suficiente para ser

detectado nas curvas de equilíbrio de desnaturação e renovelamento por fluorescência. Para comprovar a ocorrência desta forma intermediária, foram analisadas curvas de desnaturação e renovelamento da lectina, tanto na ausência quanto na presença de D-Galactose, monitoradas por CD e SEC.

As curvas de enovelamento medidas por dicroísmo circular, constantes na figura 3.20, revelaram não coincidência entre o renovelamento e a desnaturação: a curva de desnaturação é aparentemente um processo de dois estágios enquanto a curva de renovelamento mostra claramente formas intermediárias, tanto na ausência quanto na presença (B) do açúcar (A). Esta não coincidência, desde as concentrações iniciais, pode indicar que estes intermediários sejam formados fora do caminho do renovelamento (*off-pathway intermediate*) [Zhu J.M., 2001; Fan Y.X. et al, 1998; Couthon F. et al, 1995].

O aparecimento destes intermediários é, de fato, comum entre proteínas oligoméricas, mas o tempo de incubação utilizado para atingir o equilíbrio, é um outro fator a ser levado em conta. No caso presente, este tempo de 12 horas pode ter sido longo demais, principalmente nas regiões de transição [Neet K.E. et al, 1994; Radziejewski C. et al, 1992].

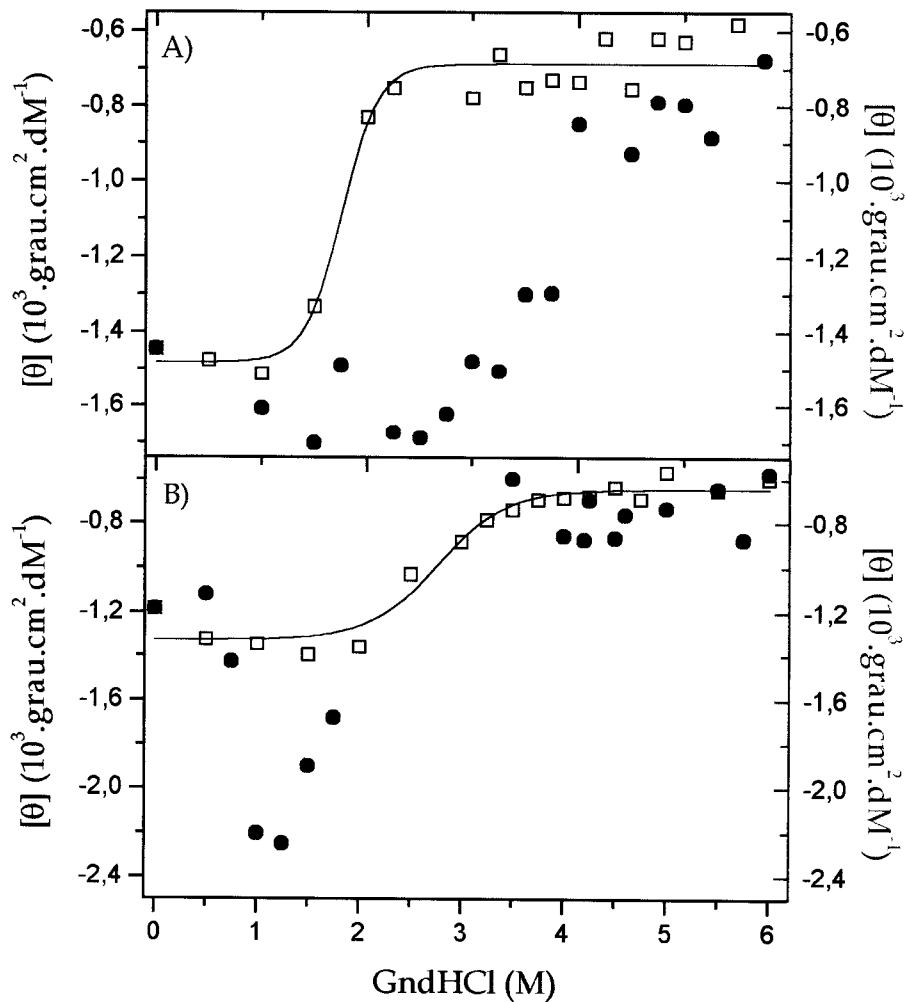


Figura 3.20: curvas de desnaturação (□) e renovelamento (●) da lectina frutalina, na ausência (A) e na presença (B) de D - Galactose.

Fica claro, também na figura 3.20, que a não coincidência entre as curvas é ainda mais acentuada no caso da lectina na ausência do açúcar. Este resultado sugere que o açúcar confere estabilidade às moléculas, diminuindo a formação de complexos solúveis não específicos. Com a diminuição destes agregados não específicos, a fração de lectinas propensa a permanecer cineticamente presa em estados parcialmente enovelados e, portanto fora do caminho correto, também diminui, tornando a curva de renovelamento na

presença do açúcar mais coincidente com a curva de desnaturação, apesar da evidência de uma fração intermediária existente a baixas concentrações do desnaturante.

Embora a curva de desnaturação tenha uma forma monofásica, sugerindo um processo de dois estágios, a curva de transição de renovelamento indica que formas intermediárias estáveis são observadas durante o processo mostrando a heterogeneidade do estado desenovelado, além de populações intermediárias próximo às condições de renovelamento.

A curva de renovelamento, quando monitorada por SEC, figura 3.21, comprova a presença das diferentes formas intermediárias durante o processo.

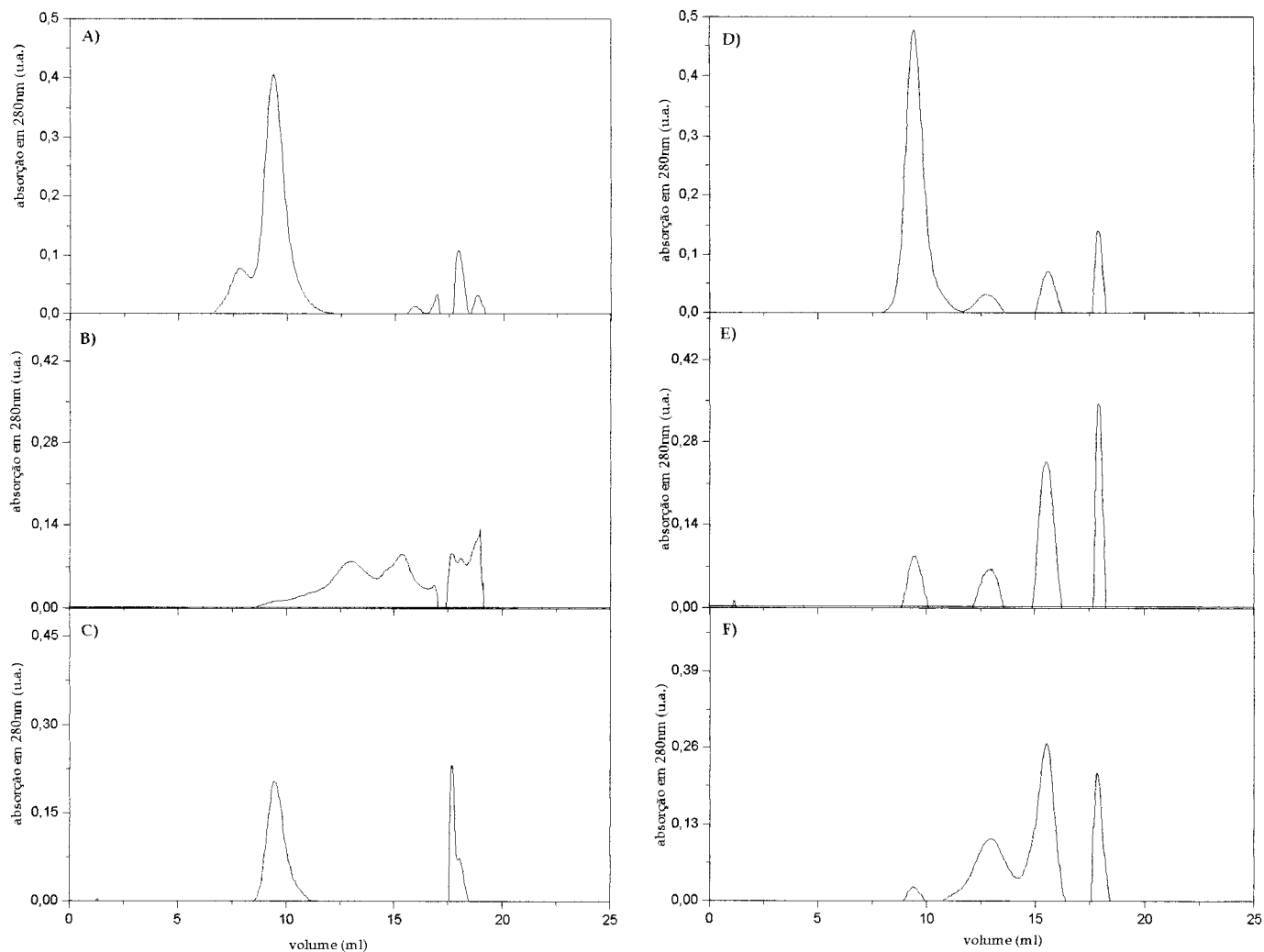


Figura 3.21: SEC, em coluna Superdex 75 HR 10/30 (sistema Äkta Explorer-10), da lectina frutalina durante o renovelamento. A coluna foi equilibrada e eluída com PBS pH 7,4 contendo 0,1 M D-Galactose e 0,1 M D-Manose a 22 °C. A velocidade de fluxo foi de 0,5 ml/min, monitorada pela absorbância em 280 nm. Todas as amostras continham 0,1 mg de proteína. À esquerda: fração nativa (painel A), fração desnaturada com 6M de GndHCl (painel B), fração renovelada contendo 0,5M de GndHCl (painel C). À direita: fração renovelada com 0,75M de GndHCl (painel D), fração renovelada com 1,25M de GndHCl (painel E) e fração renovelada com 3M de GndHCl (painel F).

No painel A a frutalina em sua forma nativa, foi eluída na posição correspondente ao seu peso molecular. No perfil cromatográfico de eluição da fração renovelada contendo 0,5M de GndHCl (painel C) nota-se uma fração predominante eluída na mesma posição que a frutalina nativa. Obseva-se ainda, uma fração eluída mais tardiamente, provavelmente correspondente à forma desnaturada.

O painel B mostra a presença de várias frações espalhadas ao longo da coluna, porém, não é significativa a quantidade de material eluído na posição da forma nativa. Este resultado condiz com a região pós-transicional das curvas de desnaturação e renovelamento (tanto nos experimentos de fluorescência quanto de CD) onde coexistem diversas formas, podendo inclusive haver formas termodinamicamente indistintas, não estabilizadas por interações cooperativas.

Voltando a análise para a figura 3.21, na região onde se encontram as eluições de formas intermediárias (painéis D, E e F) é observada a predominância da forma nativa, coexistindo outras formas intermediárias, além de proteína desnaturada. Nos painéis E (1,25) e F (3,0) a quantidade de fração renovelada aumenta à medida que as frações intermediárias e desnaturada diminuem.

Muito embora este resultado sugira que a forma nativa seja convertida em forma intermediária para depois ser desnaturada, não existem evidências suficientes para a afirmação de que estas formas intermediárias estejam dentro



do caminho obrigatório<sup>1</sup> do envelhecimento correto. Para que este impasse seja resolvido é necessário realizar a cinética do envelhecimento onde se possa comparar as velocidades de formação de  $N \leftrightarrow U$  diretamente e de formação do intermediário,  $N \leftrightarrow I$ .

É interessante notar que, quando o envelhecimento foi promovido por diluição em Centriprep 3 e posteriormente a amostra foi filtrada sobre SEC (figura 3.14) uma forma intermediária foi caracterizada, a qual denominou-se M-frutalina.

A eluição das amostras na ausência do açúcar não foi realizada, devido ao fato que a lectina, quando eluída apenas com PBS, interage com a matriz da coluna Superdex, sendo necessário que a eluição transcorra na presença de D-Galactose. A matriz da coluna, poderia funcionar, neste caso, como uma “chaperona” no auxílio do envelhecimento.

---

<sup>1</sup> Quando o intermediário encontrado está no caminho (*on pathway*) o modelo pode ser chamado de modelo sequencial.

### 3.4 Estudos de desnaturação e renovelamento da jacalina

#### 3.4.1 Estudos de desnaturação térmica

A jacalina na ausência do açúcar ligante foi submetida a uma variação de temperatura de 30 a 70 °C. Na figura 3.22 temos a curva de desnaturação da lectina obtida através do máximo de emissão de fluorescência.

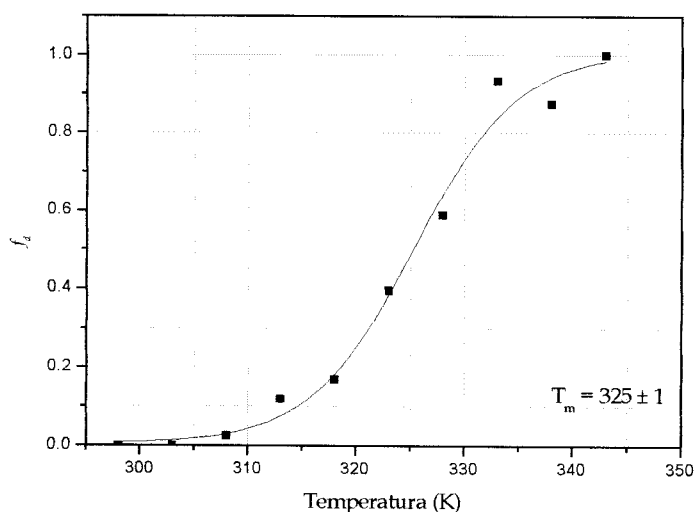


Figura 3.22: Fração da jacalina desnaturada em função da temperatura obtida através do máximo de emissão do espectro de fluorescência. Temperatura de transição:  $325 \pm 1$  K.

O processo de desnaturação da jacalina por temperatura é irreversível, fato comum a muitas proteínas devido à agregação do estado desnaturado, ou ainda a interações químicas envolvendo as cadeias laterais nas temperaturas mais altas.

Como pode ser visto na figura 3.22, o processo parece ser ajustado ao modelo irreversível de dois estados, embora três de seus pontos não se interpolem à curva. De acordo com o procedimento descrito anteriormente, a energia de ativação no equilíbrio termodinâmico,  $E_a$ , para este caso, resultou em 128,8 kJ/mol com um erro de 10% sobre este valor.

A desconvolução também procedeu com a extração de quatro componentes, que resultaram em duas iguais, significando que existem apenas três componentes puras a serem extraídas das curvas. Este método valida o processo de três estágios.

Todas as desconvoluções apresentaram um valor alto de desvio dos valores médios ( $\chi^2$ ). Este erro é devido ao programa ter sido criado para desconvoluir curvas num intervalo de comprimento de onda de apenas 70 nm, desta forma os espectros de fluorescência tiveram que ser ajustados para que o programa pudesse ser utilizado. Com poucos pontos a serem desconvoluídos o erro foi maior. Estes erros médios, entretanto, não invalidam as evidências de que há, realmente, um estado intermediário neste processo irreversível de desnaturação, além do que, os erros foram os mesmos para todas as desconvoluções.

Para ilustrar as frações de cada uma das componentes existentes nas diferentes temperaturas, foi feita a desconvolução de cada curva nas três componentes anteriores. Os resultados encontram-se na figura 3.24.

Além deste alto erro no cálculo, colocando em dúvida se o modelo foi ou não uma boa escolha para os dados no equilíbrio termodinâmico, outro fator merece ser discutido: no modelo irreversível de dois estados a constante  $k$  de velocidade de reação varia linearmente com o tempo para cada temperatura observada quando uma reação simples de primeira ordem ( $N \rightarrow U$ ) é satisfeita. Os valores obtidos, entretanto, não se ajustam a tais retas. Para resolver o impasse, um modelo alternativo foi testado através do programa CCA, o modelo  $N \rightarrow I \rightarrow D$ .

O teste do modelo consistiu, basicamente, em formar uma base com as curvas nas diferentes temperaturas, e dela extrair três componentes, constantes da figura 3.23.

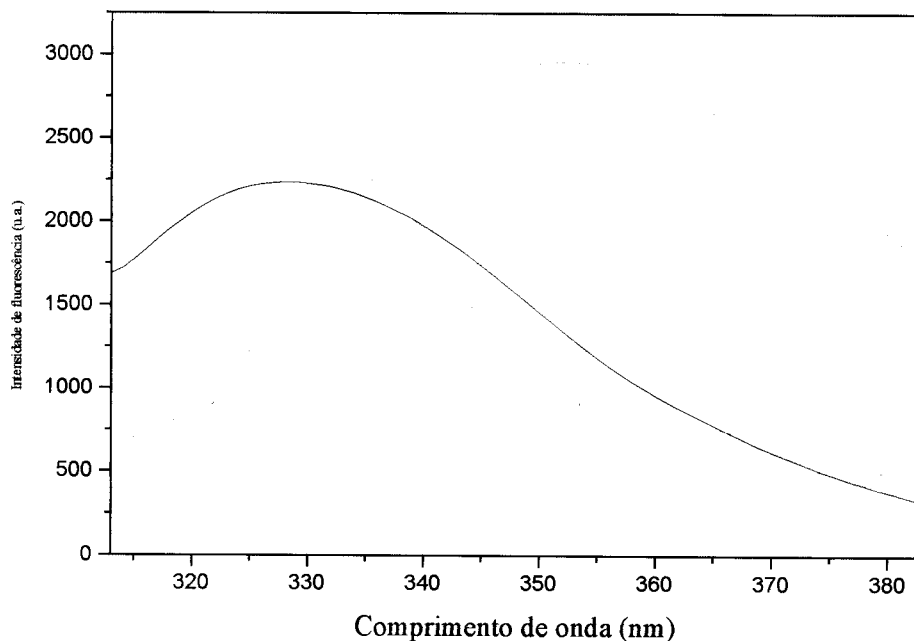


Figura 3.23: Desconvolução das curvas de fluorescência da jacalina desnaturalada termicamente, pelo programa CCA. Como resultado temos três componentes distintas, sendo uma delas correspondente a jacalina nativa (—), a segunda, jacalina desnaturalada (---) e a terceira correspondente a uma forma intermediária da jacalina (---).

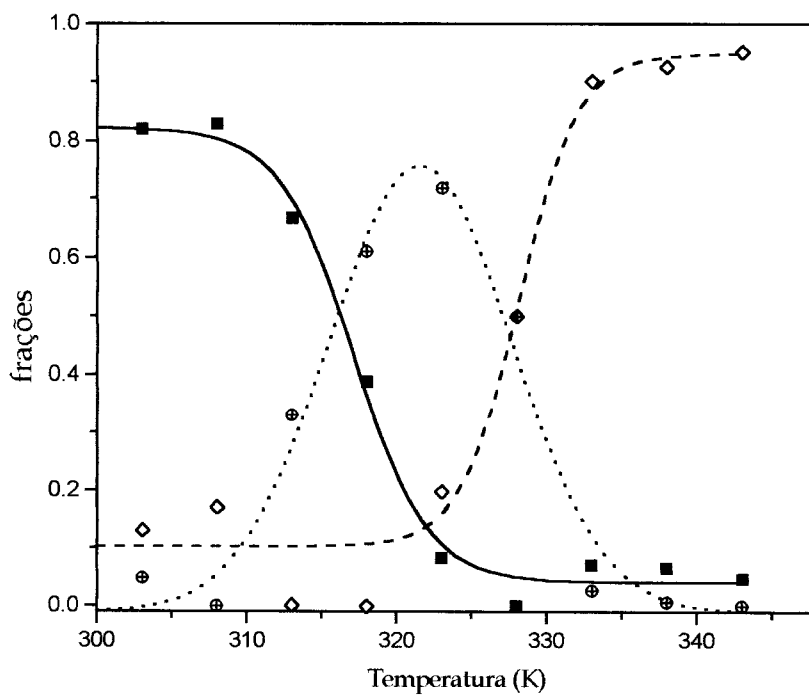


Figura 3.24: Frações da desnaturalização irreversível da jacalina. Fração nativa (■), intermediária (⊗) e desnaturada (◊), obtidas a partir da desconvolução do espectro de fluorescência.

Resultados semelhantes foram observados quando da análise das curvas de dicroísmo circular, onde a desconvolução mostrou três componentes distintas, ilustradas pela figura 3.25.

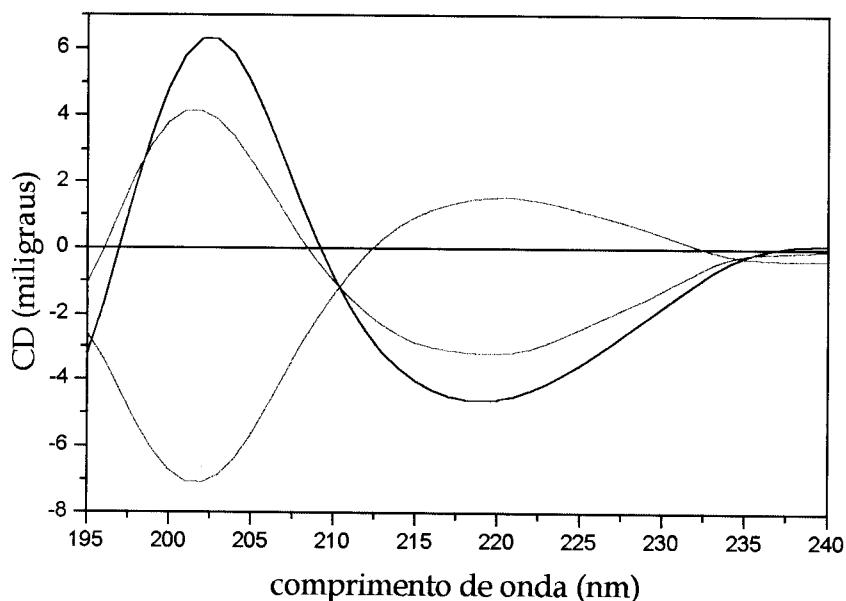


Figura 3.25: Extração de três componentes das curvas de CD da desnaturação da jacalina submetida a diferentes graus de temperatura por 60 minutos. Componentes: nativa (—), intermediária ( ) e desnaturada (---).

A desconvolução deu origem a três componentes distintas, embora duas delas, (—) e (---), sejam relativas à estrutura secundária preferencialmente em folhas beta e a terceira componente ( ) seja, claramente, uma componente relativa a jacalina desnaturada. Foi também realizada a extração de 4 e 5 componentes para confirmar se haviam apenas 3 componentes ou mais.

Quando, desta base de curvas a diferentes temperaturas, são extraídas quatro componentes temos o surgimento de outra componente característica

de proteína com a forma desordenada e fato semelhante ocorre na extração de cinco, quando temos mais uma componente desordenada diferente das outras duas. Uma vez que o estado desnaturado da proteína é um estado com alto grau de liberdade tomemos a desconvolução de três componentes como sendo a que mostra o estado intermediário e as demais desconvoluções apenas podem gerar variações do estado desnaturado.

O estado intermediário apresentou uma estrutura secundária similar à proteína nativa, com espectro característico de estrutura predominantemente em folhas beta. Já o espectro de fluorescência deste mesmo estado, sugeriu estarem os triptofanos mais expostos ao ambiente do que na estrutura nativa, embora a intensidade sugira a presença de supressores ao seu redor.

Se comparado com os resultados da desnaturação química, este intermediário tem a mesma posição de máximo de emissão que o intermediário encontrado nos experimentos onde a jacalina é incubada com GndHCl e a desnaturação e renovelamento acompanhados por fluorescência. No último caso, porém, quando a desnaturação é reversível, aparentemente se tem mais uma forma, próxima a baixas concentrações de GndHCl, encontrada nos experimentos de dicroísmo circular, que não está presente na desnaturação térmica e irreversível.

### 3.4.2 Estudos de desnaturação e renovelamento da jacalina utilizando GndHCl

Inicialmente investigamos as condições para a desnaturação da jacalina incubando amostras contendo 0,34 mg/ml nas concentrações de GndHCl de 1,2, 3, 4 e 6 M. Estas frações foram incubadas à temperatura ambiente (20 °C) por 4 até 18 horas.

O melhor resultado obtido para a desnaturação nestas condições foi utilização de 6 M de GndHCl, como pode ser visto na figura 3.26.

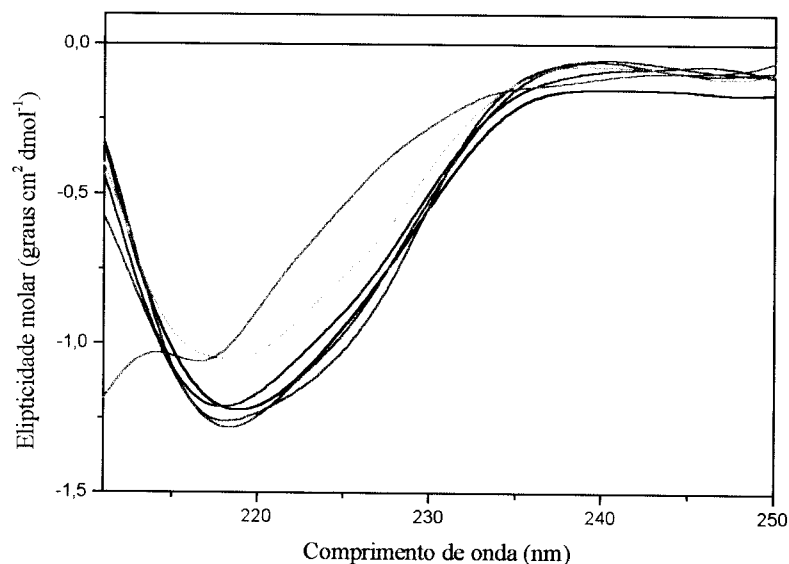


Figura 3.26: Jacalina na forma nativa (-), incubada com hidrocloreto de guanidina: 1 M (-), 2 M (-), 3 M (-), 4 M ( ) e 6 M ( ) por 18 horas à temperatura ambiente.

A desnaturação química da jacalina, assim como no caso da frutalina, foi reversível.

Neste renovelamento foi encontrada uma população intermediária, tanto nos experimentos monitorados por fluorescência como por dicroísmo



circular. A análise dos processos de desnaturação e renovelamento incluiu cálculos de parâmetros termodinâmicos das curvas obtidas por fluorescência [Beltramini L.M. et al, 2002]<sup>1</sup> e CD, tanto na presença quanto na ausência do açúcar ligante.

### 3.4.3 Reações de renovelamento em GndHCl – diálise e diluição

A jacalina, desnaturada por 12 horas em uma solução contendo 6M de GndHCl, como descrito no procedimento experimental, foi submetida a um processo de diálise para a retirada do desnaturante, promovendo o renovelamento, similarmente ao aplicado para a frutalina. Na figura 3.27 têm-se os espectros das frações estudadas. Nota-se que a fração renovada readquire a banda em torno de 220 nm, a qual caracteriza a proteína nativa, porém com menor intensidade, devido provavelmente à mistura de populações intermediárias como será visto adiante.

<sup>1</sup> Beltramini L.M., Silva-Lucca R.A., Moraes D.I., Campana P.T. e Garratt R.C. 2002; submetido para publicação.

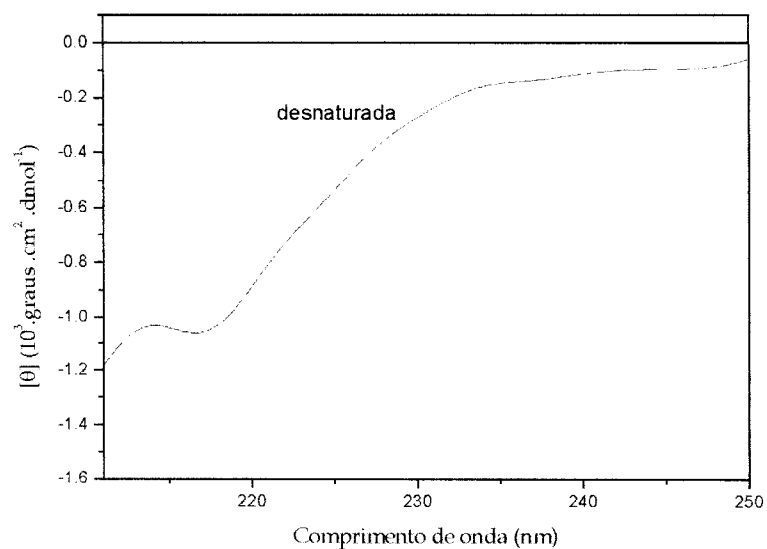


Figura 3.27: Renovelamento da jacalina por diálise. As medidas foram realizadas em cubetas de quartzo com 1mm de caminho ótico. Cada espectro é resultante de 8 varreduras.

No processo de diluição, utilizado também para recuperar a proteína em sua forma renovelada, a jacalina readquire uma banda característica mais próxima da banda nativa, após a última diluição, figura 3.28.

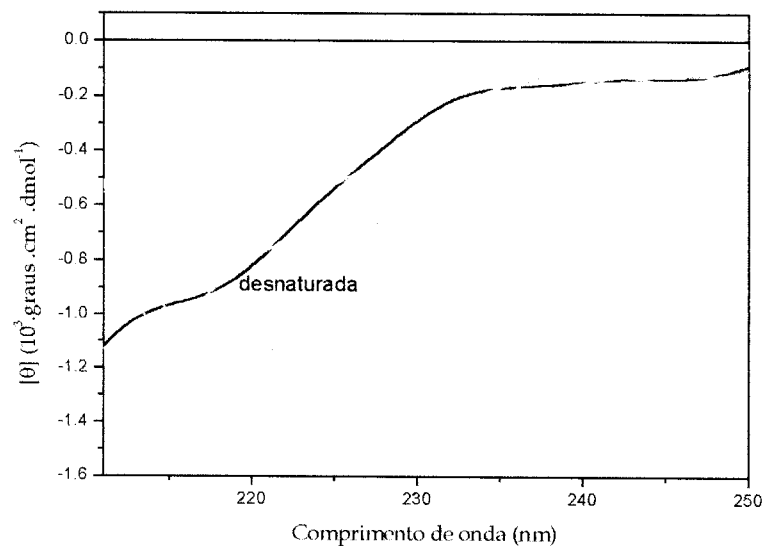


Figura 3.28: Renovelamento da jacalina por diluição. As medidas foram realizadas em cubetas de quartzo com 1mm de caminho ótico. Cada espectro é resultante de 8 varreduras.

Os espectros das formas renoveladas da jacalina, por serem bem menos intensos que os da forma nativa, sugerem a presença outras formas da proteína (desenovelada ou intermediárias) que interferem na forma final do espectro.

As curvas reversíveis de enovelamento por fluorescência e CD, tanto na presença quanto na ausência do açúcar ligante, foram investigadas e frações intermediárias estáveis no equilíbrio foram encontradas. Os resultados e sua análise encontram-se a seguir.

#### 3.4.4 Estudos de enovelamento da jacalina no equilíbrio – Fluorescência

Assim como para a frutalina, jacalina também foi desnaturada quimicamente na ausência e na presença de D-Galactose, açúcar para o qual a lectina também possui sítios de ligação. Após 12 horas em uma solução contendo 6 M de GdnHCl, na presença ou não de D-Galactose 0,1M, a jacalina perde sua estrutura secundária e seu máximo de fluorescência é deslocado de 328 nm (posição nativa) até a completa exposição de seus triptofanos, próximo de 350 nm.

Devido à forma bifásica das curvas de transição, figura 3.29, traduzindo a presença de um estado intermediário no processo, a estabilidade conformacional da jacalina foi calculada a partir de um processo reversível de três estágios, em ambos casos: com e sem seu açúcar ligante.

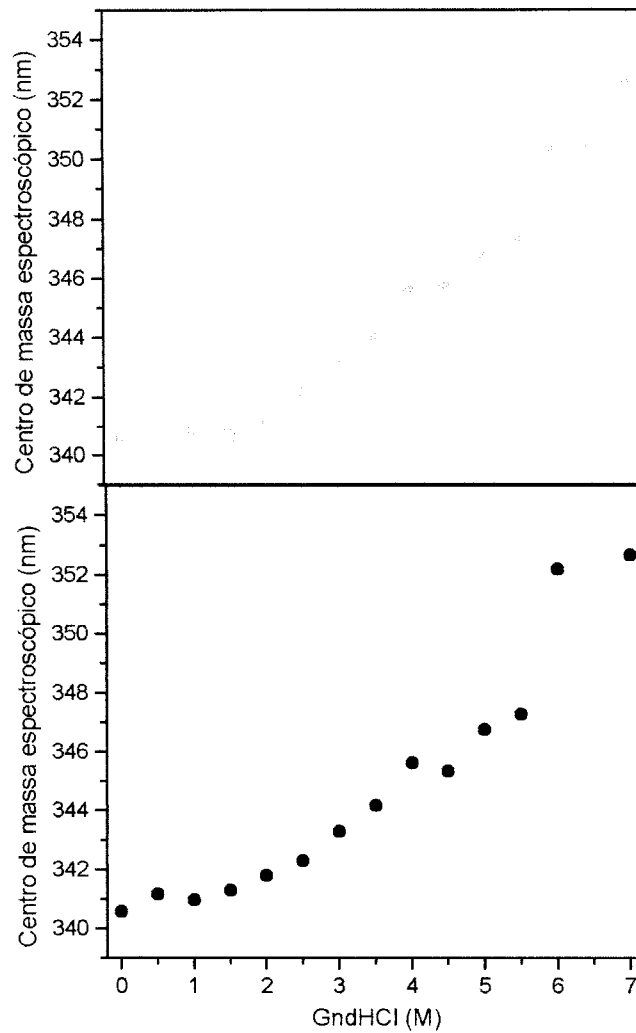


Figura 3.29: Variação do centro de massa espectroscópico da jacalina com o desnaturante químico, GndHCl, na presença (○) e na ausência (●) de D-Galactose.

Os valores de energia conformacional para a desnaturação e renovelamento da lectina encontram-se na tabela 3.3. Na presença de D-Galactose, jacalina apresenta um valor de  $9,40 \pm 0,60$  e  $8,12 \pm 0,48$  kJ/mol sem o açúcar. Esses resultados sugerem que a jacalina seja um pouco mais estável na presença do açúcar, mas esta diferença não se mostrou tão significativa quanto no caso da frutalina. Para ambas transições (NI e IU) os valores de energia não diferiram muito de valores encontrados para proteínas encontradas na

literatura: em alguns casos, como lisozima eqüina, os valores são menores, como 5,62 kJ/mol para a transição NI e 4,33 kJ/mol para IU [Mizuguchi M. et al, 1998]. Mas em proteínas mais complexas podem chegar a 16,2 kJ/mol (NI) e 8,7 kJ/mol (IU), como na CK (*creatine kinase*) [Fan Y-X. et al, 1998].

Tabela 3.3: Valores de energia de estabilidade conformacional para a jacalina, com e sem D-Galactose, calculados a partir dos espectros de fluorescência.

	$\Delta G_{NI}^{H_2O}$	$\Delta G_{IU}^{H_2O}$
	(kJ/mol)	(kJ/mol)
jacalina PBS-D-Galactose	9,40±0,60	7,89±1,40
jacalina PBS	8,12±0,48	5,61±0,87

É interessante notar que durante a desnaturação e o renovelamento da lectina um intermediário é observado durante o equilíbrio, sugerindo um mecanismo  $N \leftrightarrow I \leftrightarrow U$ . Apesar disso, também é possível que alguma fração obedeça à reação do tipo  $N \leftrightarrow U$  durante o processo.

Muito embora o ajuste fora satisfatório, talvez este processo tenha a formação de outros estados intermediários, os quais podem não ter sido detectados pela fluorescência intrínseca dos triptofanos, por existirem em pouca quantidade, ou não apresentarem um sinal espectroscópico muito grande se comparado com as formas *N*, *I* e *D*.

Este estado, encontrado na região de alta concentração de desnaturante (acima de 4,5M) tem emissão de fluorescência em comprimento de onda

característica de triptofanos expostos ao solvente (ao redor de 340 nm). Tais características poderiam incluir esse intermediário encontrado na classe dos *molten globule* (MG), uma vez que esta inclui formas que contenham triptofanos expostos ao solvente, estrutura compacta e presença de elementos de estrutura secundária, além de ausência de estrutura terciária organizada [Pain R.H., 2000], como discutido na introdução.

As medidas de dicroísmo circular, realizadas em paralelo, também indicaram a presença de formas intermediárias, como será discutido no próximo item.

#### 3.4.5 Estudos de enovelamento da jacalina no equilíbrio – dicroísmo circular

A curva de desnaturação e renovelamento da lectina foi construída a partir dos espectros de dicroísmo circular, tanto em PBS contendo D-Galactose quanto em PBS apenas. A figura 3.30 mostra esse resultado comparado com a curva obtida a partir dos espectros de fluorescência para a lectina na ausência do açúcar.

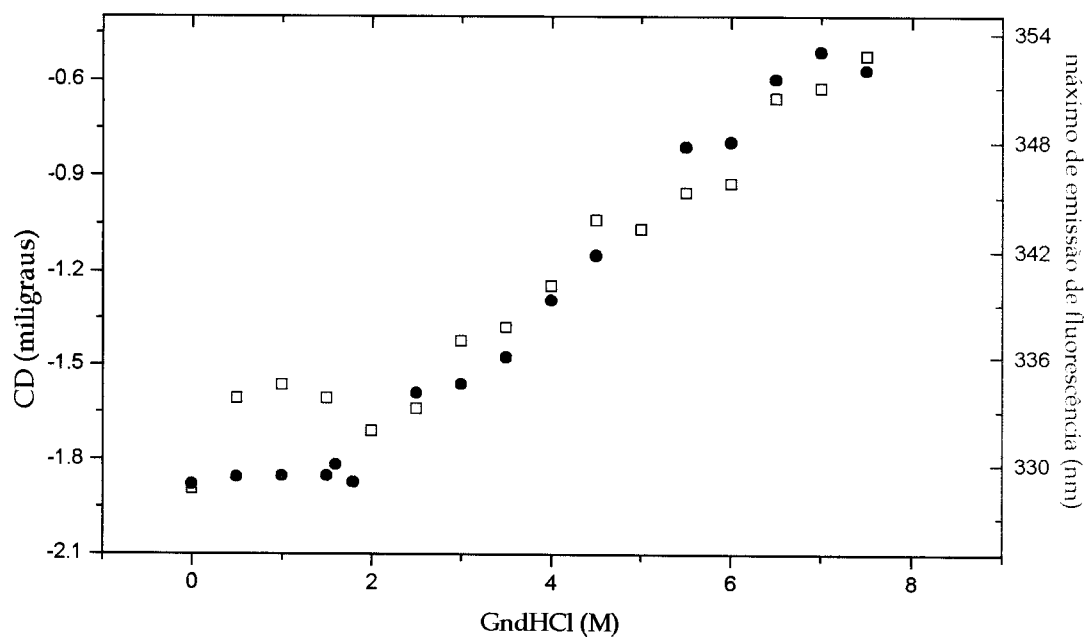


Figura 3.30: Curvas de desnaturação da lectina jacalina obtidas por dicroísmo circular (□) e fluorescência (●) da lectina frutalina, na ausência de D-Galactose. Concentração das amostras: 0,08mg/ml e 0,1 mg/ml para fluorescência e CD respectivamente.

Neste caso, a não coincidência das curvas na região de baixas concentrações de desnaturante sugere a existência de mais uma forma intermediária, além da forma presente na região entre 4,5 - 6M, concordando com os resultados anteriores de fluorescência. Apesar de bem menos intensa que a estrutura nativa, a forma intermediária na região de alta concentração de desnaturante possui estrutura secundária caracterizada por uma banda com o mínimo em 219 nm, mais um indicador de que estas estruturas poderiam ser tipo MG.



A forma encontrada em baixas concentrações do desnaturante, detectada nas medidas de CD, contém estrutura secundária ainda mais organizada que a anterior, além de triptofanos não expostos ao solvente (com máximo de emissão em 330 nm).

Os resultados derivados dos experimentos de CD com a lectina em presença do açúcar, não foram conclusivos, devido, provavelmente à dificuldade de se controlar a concentração das amostras, agravada pela tendência da lectina a aderir nas cubetas quando iniciada a desnaturação.

## CONCLUSÕES

---

O estudo do processo de renovelamento de proteínas com estrutura predominantemente em elementos beta, como colocado na introdução, é plenamente justificado, pois tais proteínas estão envolvidas em vários tipos de doenças degenerativas. Outro aspecto é o universo de proteínas recombinantes, expressas muitas vezes na forma insolúvel, oriundas da fase "pós genômica", denominada genoma estrutural.

Por outro lado, a frutalina quando descrita, apresentou atividade hemaglutinante cerca de três vezes maior que a jacalina, apesar da alta homologia entre elas, resultados estes que se confirmaram em outras propriedades que esta molécula apresenta, como apresentado na introdução. Assim, quando este trabalho foi iniciado, decidiu-se pelo estudo em paralelo entre as duas lectinas, uma vez que elas também apresentaram comportamentos diferentes em relação à suas temperaturas médias de transição, bem como uma propriedade acentuada da jacalina em aderir ao quartzo.

Neste estudo, além de investigar o processo de desnaturação e renovelamento de proteínas tetraméricas, cujos monômeros adotam um enovelamento tipo  $\beta$  prisma paralelo, unidos por interações não covalentes,

também foi demonstrado que duas proteínas homólogas, cuja identidade é quase total excetuando-se dois resíduos de aminoácidos (resultados ainda não publicados), mostraram comportamentos diferentes no processo de desnaturação e renovelamento.

A jacalina e a frutalina apresentaram diferenças em suas temperaturas médias de transição: 52 °C e 47 °C respectivamente, além da curva de desnaturação da frutalina apresentar uma inclinação sigmoideal maior se comparada à da jacalina. A curva de desnaturação desta última, quando desconvoluída, mostrou ser um processo de três estágios com uma população intermediária estável. O processo de desnaturação por temperatura foi irreversível para ambas lectinas. Entretanto, após sofrerem desnaturação térmica e serem estocadas a -20 °C, por períodos mais longos que 15 dias na presença do açúcar ligante, foi demonstrado a ocorrência de renovelamento [Campana P.T. et al, 2001].

Na presença de GndHCl, ambas apresentam processos reversíveis de desnaturação, embora a frutalina seja desnaturada em concentração menores de desnaturante em relação a jacalina, na presença e ausência do açúcar ligante.

A frutalina foi desnaturada e renovada por um processo reversível contendo uma população de formas intermediárias, enquanto a análise do

processo da jacalina sugere a presença de mais de um estado intermediário, compatível com processos contendo multi-estados.

O isolamento de uma forma intermediária estável da frutalina por SEC, e a não concordância entre as curvas de renovelamento e desnaturação somada à presença de estrutura secundária na formas intermediárias da jacalina sugerem que estes intermediários possam ser do tipo *molten globule*.

Como discutido na introdução, os monômeros da jacalina são compostos por duas cadeias,  $\alpha$  e  $\beta$ , esta última resultante do processamento proteolítico de seu precursor. Esta clivagem ocorre em um dos motivos “chave grega” do prisma  $\beta$  e gera uma cadeia de 20 resíduos de aminoácidos que é uma das fitas externas do terceiro motivo.

Recentemente foi verificado que a identidade entre a frutalina e jacalina é de 100% dos resíduos na cadeia  $\alpha$  e de 90% dos resíduos na cadeia  $\beta$ . Os dois resíduos substituídos na cadeia  $\beta$  estão nas posições 2 e 14 e representam uma glutamina (substituindo um ácido glutâmico) e uma prolina (substituindo uma serina), como ilustrado no esquema abaixo [Beltramini L.M. et al, 2002]<sup>1</sup>.

---

<sup>1</sup> (2002) Beltramini L.M, Moreira R.A., Monteiro-Moreira A.C, Oliva M.L.V. Resultados não publicados.

						10						20						
Frutalina	N	Q	S	G	K	S	Q	T	V	I	V	G	W	G	A	K	V	S
Jacalina	N	Q	S	G	K	S	Q	T	V	I	V	G	W	G	A	K	V	S
Consenso	N #	Q	S	G	K	S	Q	T	V	I	V	G #	W	G	A	K	V	S

É importante salientar também que os resíduos da frutalina que se apresentaram glicosilados foram as lisinas das posições 6 e 18 da cadeia  $\beta$  (assinalados K no esquema acima), sugerindo assim uma N-glicosilação atípica, uma vez que na própria jacalina a N-glicosilação foi encontrada nos resíduos de asparagina (16, 35 e 74) da cadeia alfa [Young N. M. et al, 1991]. Provavelmente, estas lectinas também apresentem diferentes graus de glicosilação, e este fato seria mais um a contribuir nas diferenças observadas entre elas tanto com relação às atividades biológicas como em relação aos aspectos físico-químicos.

## PERSPECTIVAS

---

✦ Analisar as frações intermediárias da frutalina, obtidas na desnaturação e renovelamento utilizando GndHCl já separadas por SEC, quanto a sua atividade biológica e realizar medidas de anisotropia para verificar a natureza desta população intermediária.

✦ Separar, por cromatografia de exclusão molecular, as frações intermediárias encontradas durante o processo de renovelamento da jacalina por SEC e verificar a natureza desta população utilizando medidas de CD, fluorescência e anisotropia, além de testar sua atividade biológica.

✦ Modelagem da frutalina, particularmente da cadeia beta, para investigar se as duas pontuais modificações (serina por prolina e ácido glutâmico por glutamina) explicariam os achados experimentais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Abkevich V. I., Gutin A. M., e Shakhnovich E. I. *Specific nucleus as the transition state for protein folding: evidence from the lattice model.* **Biochemistry**, **33**, 10026-10036, 1994.
- Anfisen C. B. *Principles that govern the folding of protein chains.* **Science**, **181** (4096), 181-223, 1973.
- Arroyo-Reyna A.; Hernández-Arana A. *The Thermal Denaturation of Stem Bromelain is Consistent with a Irreversible Two-State Model.* **Biochem. Biophys. Acta**, **1248**, 1230-128, 1995.
- Batas B. Chaudhuri J.B. *Considerations of sample application and elution during size-exclusion chromatography-based protein refolding.* **Journal of Chromatography A** **864**, (2) 229-236, 1999.
- Bradford M.M. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding.* **Anal. Biochem.**, **72**, 248-254, 1976.
- Brockwell DJ, Smith DA, Radford SE. *Protein folding mechanisms: new methods and emerging ideas.* **Curr. Opin. Struct. Biol.**, **10**, 16-25, 2000.
- Campana P.T. *Desnaturação e renovelamento da frutalina, uma lectina ligante de D-Galactose.* Dissertação (mestrado) – IFSC – USP, 1998.
- Campana P.T., Moraes D.L., Monteiro-Moreira A.C.O, Beltramini, L.M. *Unfolding and refolding studies of frutalin, a tetrameric D-galactose binding lectin.* **European Journal of Biochemistry**, **269**: 753-758, 2002.
- Campana P.T., Moreira R.A. e Beltramini L.M. *Refolding studies of Frutalin: a lectin isolated from Artocarpus incisa seeds.* In: **Interlec17 - 17th International Meeting - Würzburg Alemanha, 1997.**
- Capaldi A. P. and Radford S. E. *Kinetic studies of  $\beta$ -sheet protein folding.* **Current Opinion in Structural Biology**, **8**, 86-92, 1998.

- Chang H.C., Chou W.Y., Chang G.G. *Effect of metal binding on the structural stability of pigeon liver malic enzyme.* **J BIOL CHEM** 277: (7) 4663-4671, 2002.
- Couthon F, Clottes E, Ebel C, Vial C. *Reversible dissociation and unfolding of dimeric creatine kinase isoenzyme MM in guanidine hydrochloride and urea.* **Europ. Journ. Biochem.** 234: (1) 160-170. 1995.
- Creighton T.E. *Protein folding: an folding story.* **Current Biol.** 5: 353-356, 1995.
- Dill K. A. e Chan H.S. *Protein folding in the Landscape Perspective: Chevron Plots and Non-Arrhenius kinetics.* **Proteins Struct., Func. And Genetics**, 30 2-23, 1998.
- Dill K. A., Bronberg S., Yue K. Z., Fiebir K. M., YEE D. P., Thomas P. D., e Chan H. S. *Principles of protein folding - a perspective from simple exact models.* **Protein Sci.** 4: 561-602, 1995.
- Dobson C.M. *Unfolded proteins, compact states and molten globules.* **Curr. Opin. Struct. Biol.** 2 6, 1992.
- Dobson C.M, et al. *Understanding protein folding via free-energy surfaces from theory and experiment.* **TIBS**, 331-339, 2000.
- Dobson CM. *Protein folding. Solid evidence for molten globules.* **Curr Biol.** 1;4(7):636-40, 1994.
- Dong Xiao-Yan; Yang Hui; Sun Yan. *Lysozyme refolding with immobilized GroEL column chromatography.* **Journal of Chromatography A** 878 (2) 197-204, 2000.
- Duan Y. e Kollman P.A. *Pathways to a protein folding intermediate observed in a 1-microsecond simulation in aqueous solution.* **Science** 282 740, 1998.
- Eftink M. R. **Methods of Biochemical Analysis**, Vol. 35 (Ed.: N. H. Suelter), Wiley, New York, 1991.
- Eftink M.R. *The use of fluorescence methods to monitor unfolding transitions in proteins.* **Biophys. J.** (66) 482, 1994.
- Eftink M.R. e Ionescu R. *Thermodynamics of protein unfolding: questions pertinent to testing the validity of the two-state model.* **Biophysical Chem.** (64) 175-197, 1997.
- Eftink M.R. *Use of multiple spectroscopic methods to monitor equilibrium unfolding of proteins.* **Methods in enzymology.** (259) 487-512, 1995.



- Fan Y.X., Zhou JM, Kihara H, Tsou CL. *Unfolding and refolding of dimeric creatine kinase equilibrium and kinetic studies*. **Protein Sci** 7: 12 2631-2641, 1998.
- Ferrao-Gonzales A. D., Souto S. O., Silva J. L., Foguel D. *The preaggregated state of an amyloidogenic protein: Hydrostatic pressure converts native transthyretin into the amyloidogenic state*. **P NATL ACAD SCI USA** 97: (12) 6445-6450, 2000.
- Fersht A. R. *Characterizing transition states in protein folding: an essential step in the puzzle*. **Curr Opin Struct Biol**, 5(1):79-84, 1995.
- Fersht A. R. *Nucleation mechanisms in protein folding*. **Curr. Op. in Structural Biology**, 7, 3-9, 1997.
- Fersht A. R. *Structure and mechanisms in protein science: a guide to enzyme catalysis and protein folding*. Freeman, NY, 1999.
- Foguel D., Silva J. L., de Prat-Gay G. *Characterization of a partially folded monomer of the DNA-binding domain of human papillomavirus E2 protein obtained at high pressure*. **J BIOL CHEM** 273: (15) 9050-9057, 1998.
- Ganiko L. M., Martins A. R., Espreáfico E. M., Roque-Barreira M. C. *Neutrophil haptotaxis induced by the lectin KM+*. **Glycoconjugate Journal**, 15, 527-530, 1997.
- Goto L. S., Beltramini L. M., Moraes D.L, Moreira R.A., Araujo A. P. U. *Cloning and recombinant expression of Pulchelin binding domain, from Abrus pulchellus seeds*. In: **XXX Reunião Anual SBBq**, Caxambu 19 a 22 de maio, 2001.
- Griko Y.V., Freire E., Privalov G., Van Dael H. and Privalov P.L. *The unfolding thermodynamics of c-type lysozymes: a calorimetric study of the heat denaturation of equine lysozyme*. **J. Mol. Biol.** 252 447, 1995.
- Guo Z. Y. e Thirumalai D. *Kinetics of protein folding: nucleation mechanism, time scales, and pathways*. **Biopolymers**, 36: 83-102, 1995.
- Gutim A. M., Abkevich, V. I., e Shakhnovich, E. I. *Is burst hydrophobic collapse necessary for protein folding?* **Biochemistry**, 34: 3066-3076, 1995.
- Hirota N., Mizuno K., Goto Y. *Group additive contributions to the alcohol-induced alpha-helix formation of melittin: implication for the mechanism of the alcohol effects on proteins*. **J. Mol. Biol.** 275 365, 1998.
- Karplus M., e Weaver D. L. *Protein folding dynamics - the diffusion-collision model and experimental data*. **Protein Sci**, 3: 650-668, 1994.

- Kiefhaber T., Grunert H.P., Hahn U. e Schmid E.X. *Folding of RNase T1 is decelerated by a specific tertiary contact in a folding intermediate.* **Proteins: Struct. Func. And Genet.** **12** 171, 1992.
- Kim P.S. e Baldwin R.L. *Specific intermediates in the folding reactions of small proteins and the mechanism of protein folding.* **Annual Review Biochem,** **59** 631, 1982.
- Kim P.S. e Baldwin R.L. *Intermediates in the folding reactions of small proteins.* **Annu Rev Biochem.** **59:**631-60, 1990.
- Kurganov B.I.; Lyubarev A.E.; Sanchez-Ruiz J.M. e Shnyrov V.L. *analysis of a differential scanning calorimetry data for proteins criteria of validity of one-step mechanism of irreversible protein denaturation.* **Bioph. Chem.,** **69** 125-135, 1997.
- Kuwajima K. *The molten globule state as a Clue for understanding the folding cooperativity of globular-protein structure.* **Proteins: Struct., Func. And Gent.** **6** 87-103, 1989.
- Kuwajima K. , Yamaya H., Miwa S., Sugai S. E Nagamura T. *Rapid formation of secondary structure framework in protein folding studied by stopped-flow circular dichroism.* **FEBS Lett.** **221** 115, 1987.
- Kuwajima K., Nitta K., Yoneyama M. and Sugai S. *Three-state denaturation of alpha-lactalbumin by guanidine hydrochloride.* **J. Mol Biol.,** **106,** 359-373, 1976.
- Lakowicz J.R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy,** Plenum Press, New York, 1983.
- Lakowicz J.R. **Topics of Fluorescence Spectroscopy,** Plenum Press, New York, 1991.
- Lazaridis T. e Karplus M. *"New view" of protein folding reconciled with the old through multiple unfolding simulations.* **Science,** **278** 1928-1931,1997.
- Levinthal C. *Are there pathways for protein folding?* **J. Chem. Phys.,** **85:** 44-45, 1968.
- Lodish H et al. **Molecular Cell Biology.** Editora WH Freeman and Company, 2000.
- Mizuguchi M., Arai M., Ke Y., Nitta K. and Kwajima K. *Equilibrium and kinetics of the folding of equine lysozyme studied by circular dichroism spectroscopy.* **J. Mol Biol.,** **283,** 265-277, 1998.

- Mok Y.K., Kay C.M., Kay L.E., Forman-Kay, J. NOE data demonstrating a compact unfolded state for an SH3 domain under non-denaturing conditions. *J. Mol Biol.*, **289**, 619, 1999.
- Monteiro-Moreira A.C.O., Lima J.R., Beltramini L.M. e Moreira R.A. *Frutapin: D-mannose-binding lectin from Artocarpus incisa seeds: isolation and structural characterization*. In: **XXX Reunião Anual SBBq**, Caxambu 19 a 22 de maio, 2001.
- Monteiro-Moreira, A.C.O., *Características químicas, físico-químicas e estruturais da frutalina, uma lectina D-galactose ligante de Artocarpus incisa*. Dissertação (mestrado) – UFC – Fortaleza, 1998.
- Monteiro-Moreira. *Lectinas de Sementes de Artocarpus incisa*. Tese (doutorado) – UFC – Fortaleza, 2002.
- Moreira R.A.; Castelo Branco C.C.; Monteiro A.C.O.; Tavares R.O.; Beltramini L.M. *Isolation and Partial Characterization of a Lectin from Artocarpus incisa L. Seeds*. *Phytochem.*, **46** 139-144, 1998.
- Nakanishi K. et al. **Principles of Circular Dichroism**. Editora VCH, 1994.
- Nelson & Cox. **Lehninger: Principles of Biochemistry** 2000.
- Oliveira P.S.L., Garratt R.C., Mascarenhas Y.P., Beltramini L.M. e Roque-Barreira M.C. *Crystallization and preliminary Crystallographic data of a Neutrophil migration-inducing lectin (KM+) extracted from the seeds of Artocarpus integrifolia*. *Proteins Struct Func and Genetics* **27** 157-159, 1997.
- Pace C.N. *Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves*. *Methods in Enzymology*. **131**, 267-280, 1986.
- Pain R.H. **Mechanisms of protein folding**. Oxford University Press, 2000
- Perczel A.; Hollósi M.; Tusnády G. and Fasman G.D. *convex constraint analysis: a natural deconvolution of circular dichroism curves of proteins*. *Protein Eng.*, **4**, 669-679, 1991.
- Perczel A.; Park K. and Fasman G. D. *Analysis of the Circular-Dichroism spectrum of proteins using the CONVEX CONSTRAINT ALGORITHM - a practical guide*. *Anal. Biochem.*, **203**, 83-93, 1992.
- Peumans W.J. e Van Damme E.J.M. *Lectins as plant defense proteins*. *Plant Physiology*, **109**: 347-352, 1995.
- Pinto A.P.A., Silber A., Corradi G., Beltramini L. M., Araujo A. P. A. *Expression, purification and structural characterization of F29: a flagellar*

*calcium-binding protein of Trypanosoma cruzi*. In: **XXX Reunião Anual SBBq**, Caxambu 19 a 22 de maio, 2001.

- Plaxco KW, Simons KT, Baker D. *Contact order, transition state placement and the refolding rates of single domain proteins*. **J Mol Biol.**10;277(4):985-94, 1998.
- Ptitsyn O.B. *How molten is the molten globule?* **Nat. Struct. Biol**, 3: 488-490,1996.
- Radford S.E. *Protein folding progress made and promises ahead*. **TIBS**, 611-618, 2000.
- Radziejewski C., Robinson R.C., Distefano P.S., Taylor J.W. *dimeric structure and conformational stability of Brain-derived Neurotrophin-3*. **Biochemistry** 31: (18) 4431-4436, 1992.
- Roque-Barreira, M.C., Praz, F., Halbwachs-Macarelli, L., Greene, L.J. & Campos-Neto, A. *IgA affinity purification and characterization of the lectin jacalin*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 19: 149-157, 1986.
- Rosa J. C.; Oliveira P. S. L.; Garrat R. C.; Beltramini L. M.; Resing K.; Roque-Barreira M. C. and Greene L. J. *KM+, a mannose-binding lectin from Artocarpus integrifolia: Amino acid sequence, predicted tertiary structure, carbohydrate recognition and analysis of the  $\beta$ -prism fold*. **Protein Science**, 8, 13-24, 1999.
- Sánchez-Ruiz J. M., Lacomba-López J. L., Cortijo M., Mateo P. L. *Differential scanning calorimetry of the irreversible thermal denaturation of thermolysin*. **Biochemistry**, 27, 1648-1652, 1988.
- Sankaranarayanan R., Sekar K., Banerjee R., Sharma V., Surolia A., Vijayan M. *A novel mode of carbohydrate recognition in jacalin, a Moraceae plant lectin with a  $\beta$ -prism fold*. **Nature Structure Biology**,3, 596-603, 1996.
- Santos-Oliveira R.; Dias-Baruffi M.; Thomas S.M.O.; Beltramini L.M.; Roque-Barreira M.C. *A neutrophil migration-inducing lectin from Artocarpus integrifolia*. **J. Immunol.**, 153 1798-1807, 1994.
- Selistre-de-Araújo H.S.; Souza E.L. de; Beltramini L.M.; Ownby C.L. and Souza D.H.F. *Expression, refolding, and activity of a recombinant nonhemorrhagic snake venom metalloprotease*. **Protein Expression and Purification.**, 19, 41-47, 2000.

- Serrano L. *Comparison between the phi distribution of the amino acids in the protein database and NMR data indicates that amino acids have various phi propensities in the random coil conformation.* **Jol. Mol. Biol.** **254** 322, 1995.
- Sharon N. and Lis H. *Carbohydrates in cell recognition.* **Scientific American**, **268(1)**: 82, 1993.
- Sharon N. *Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals: an atomic view.* **Trends Biochem. Sci.**, **18**: 221, 1993.
- Silow M. e Oliveberg M. *Transient aggregates in protein folding are easily mistaken for folding intermediates.* **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, **94** 6084, 1997.
- Silva-Lucca R.A.; Tabak M.; Nascimento O.R.; Roque-Barreira M.C.; Beltramini, L.M. *Structural and thermodynamic studies of KM+, a D-mannose binding lectin from Artocarpus integrifolia seeds.* **Biophys. Chem.**, **79** 81-93, 1999.
- Sosnick T. R., Mayne L., Hiller R., e Englander S. W. *The barriers in protein folding.* **Nat. Struct. Biol.**, **1**: 149-156, 1994.
- Thirumalai D. *From minimal models to real proteins – time scales for protein folding kinetics.* **J. Phys I**, **5**: 1457-1467, 1995.
- Thirumalai D., e Guo Z. Y. *Kinetics of protein folding – nucleation mechanism, time scales and pathways.* **Biopolymers**, **35**: 137-140, 1995.
- Trindade M.B., Monteiro-Moreira A.C.O., Oliva M.L.V., Moreira R.A., Moraes D.I., Souza C.R., e Beltramini L.M. **International Workshop on Spectroscopy for Biology**, São Paulo, 2001.
- Weismann J.S.e Kim P.S. *Reexamination of the folding of BPTI – Predominance of native intermediates.* **Science**, **253** 1386, 1991.
- Wuthrich K. *NMR assignments as a basis for structural characterization of denatures states of globular proteins* **Curr. Op. in Structural Biology**, **4**, 93, 1994.
- Young N. M., Johnston R. A. Z., Watson D. C. *The amino-acid-sequences of jacalin and the maclura pomifera agglutinin.* **FEBS**, **282**, 382, 1991.
- Young N.M., Johnston R.A.Z., Szabo A.G., Watson D.C. *Homology of the D-Galactose-specific lectins from Artocarpus integrifolia and maclura pomifera and the role of an unusual small polypeptide subunit.* **Archives of Biochem. And Biophys**, **270(2)**, 596-603, 1989.

Zhang Y, Hongsham L., Wu H., Don Y., Liu N., Yang K. *Functional implications of disulfide bond, Cys45-Cys50, in recombinant prochymosin.* **Biochimica et Biophysica Acta**, **1343**, 278-286, 1997.

Zhu L., Fan Y., Zhou J. *identification of equilibrium and kinetic intermediates involved in folding of urea-denatured creatine kinase.* **Biochimica et Biophysica Acta**, **1544**, 320-332, 2001.