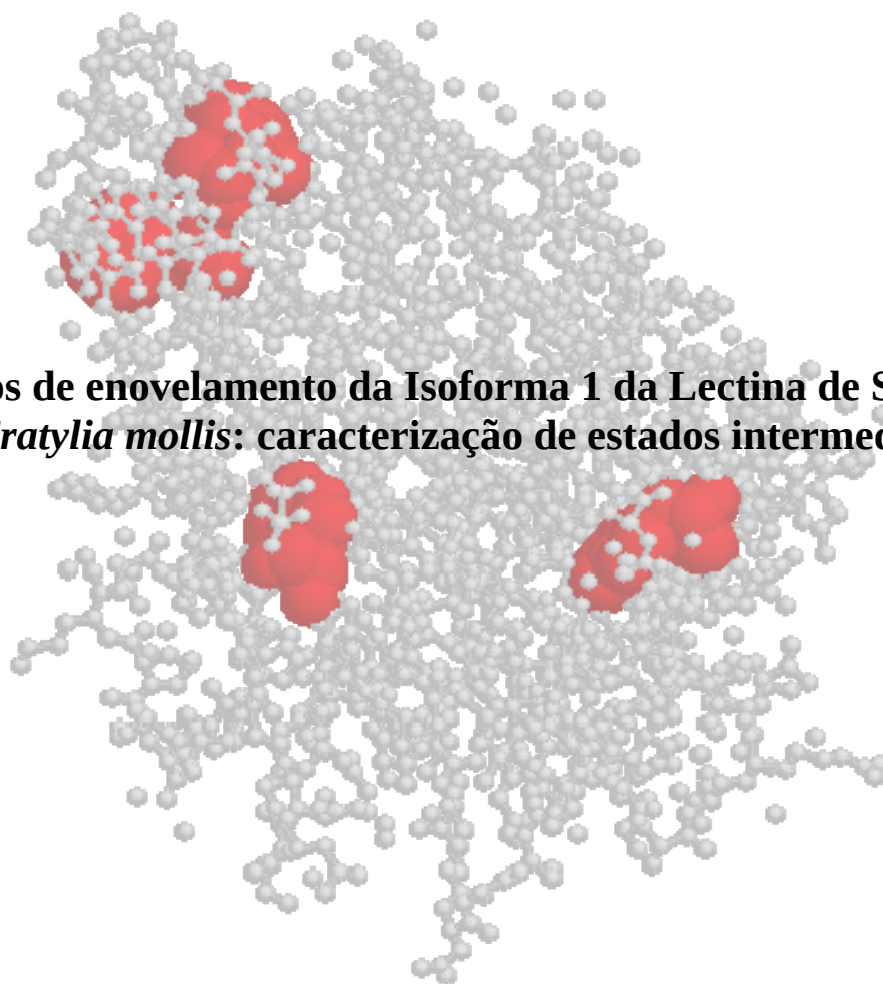


Nathalia Varejão Nogueira da Paz

**Estudos de enovelamento da Isoforma 1 da Lectina de Sementes de
Cratylia mollis: caracterização de estados intermediários**



Recife, 2006

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM BIOQUÍMICA**

**Estudos de enovelamento da Isoforma 1 da Lectina de Sementes de
Cratylia mollis: caracterização de estados intermediários**

Autor: Nathalia Varejão Nogueira da Paz

Orientador: Prof^a. Dr^a. Débora Foguel

Co-Orientador: Prof^a. Dr^a. Maria Tereza dos Santos Correia

Recife, 2006

Nathalia Varejão Nogueira da Paz

**Estudos de enovelamento da Isoforma 1 da Lectina de Sementes de
Cratylia mollis: caracterização de estados intermediários**

**Dissertação apresentada para o
cumprimento parcial das
exigências para obtenção do
título de Mestre em
Bioquímica pela Universidade
Federal de Pernambuco.**

Aprovado por: _____

Data: ____/____/____

Paz, Nathalia Varejão Nogueira da

**Estudos de enovelamento da Isoforma 1 da Lectina de Sementes de
Cratylia mollis : caracterização de estados intermediários / Nathalia Varejão
Nogueira da Paz. – Recife: O Autor, 2006.**

64 folhas : il., fig., gráf.

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
CCB. Ciências Biológicas. Bioquímica, 2006.**

Inclui bibliografia.

1. Proteínas 2. Lectinas 3. Cratylia mollis I. Título.

**577.112
572.6**

**CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)**

**UFPE
CCB – 2006 - 021**

Ata da defesa de dissertação da Mestranda **Nathalia Varejão Nogueira da Paz**, realizada em 22 de fevereiro de 2006, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Às 14:10 horas, do dia 22 de fevereiro de 2006, foi aberto, no Auditório Prof. Marcionilo Barros Lins, Depto. de Bioquímica/CCB/UFPE, o ato de defesa de dissertação da mestranda **Nathalia Varejão Nogueira da Paz**, aluna do Curso de Mestrado em Bioquímica/CCB/UFPE. Iniciando os trabalhos a Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva, Vice-Coordenadora do Curso supra citado, em substituição a Profa. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima, por motivo de doença, fez a apresentação da aluna, de sua orientadora Profa. Dra. Débora Foguel, que por motivos particulares não pode está presente, de sua Co-orientadora, Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia, e da Banca Examinadora composta pelos professores doutores: Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho, na qualidade de Presidente, Maria Tereza dos Santos Correia, Nereide Stela Santos Magalhães, ambas do Depto. de Bioquímica/CCB/UFPE e Adriana Carla Cavalcante Malta Argolo, Pesquisadora do Depto. de Bioquímica/CCB/UFPE. Após as apresentações, a Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva passou a palavra a Presidente da Banca que convidou a aluna para a apresentação de sua dissertação intitulada: "**Estudos de Enovelamento da Isoforma 1 da Lectina de Sementes de *Cratylia mollis*: Caracterização de Estados Intermediários**", e informou que de acordo com o Regimento Interno do Curso, a candidata dispõe de até 50 (cinquenta) minutos para apresentação do trabalho e o tempo de arguição para cada examinador, juntamente com o tempo gasto pelo aluno para responder às perguntas será de 30 (trinta) minutos. A aluna procedeu a explanação e comentários acerca do tema em 40 (quarenta) minutos. Após a apresentação da mestranda, foi concedido um intervalo de 15 minutos. Reiniciando os trabalhos, a Sra. Presidente convidou a Banca Examinadora para ocupar seus lugares e passou a palavra ao primeiro examinador, Profa. Dra. Adriana Carla Cavalcante Malta Argôlo, que agradeceu o convite, fez alguns comentários e deu algumas sugestões, iniciando sua arguição. Ao final, a referida professora deu-se por satisfeita. Em seguida, a Sra. Presidente passou a palavra para a Profa. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães, que agradeceu o convite, fez alguns comentários e sugestões, e iniciou sua arguição. Ao final a referida professora deu-se por satisfeita. Daí a Sra. Presidente passou a palavra para a Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia, que fez alguns comentários e agradecimentos. Em seguida, a Sra. Presidente usou da palavra para tecer alguns comentários, agradecer à Banca Examinadora e parabenizar a candidata, em seguida iniciou sua arguição. Ao final, a referida professora deu-se por satisfeita. Finalmente, a sessão foi suspensa para proceder ao julgamento pela Banca Examinadora, a qual se reuniu na Secretaria do Curso. Após alguns comentários, a Banca decidiu, por unanimidade, conceder a menção "**Aprovada com Distinção**". Nada mais havendo a tratar, lavrei a presente ata que vai assinada por mim, Secretário, e demais membros da Banca Examinadora. Recife, 22 de fevereiro de 2006.

Adriana Carla Cavalcante Malta Argolo
Nereide Stela Santos Magalhães
Adriana Carla Cavalcante Malta Argolo
Maria Tereza dos Santos Correia

**À minha mãe e à minha
Vida.**

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª. Dr^ª. Maria Tereza dos Santos Correia. Se a mim um perguntasse o motivo para agradecê-la diria: — Foi o momento inicial, a primeira aula, ela estava lá. Daquele dia em diante, eu vi quem eu queria ser; então, obrigada Tereza por ter sido, nesses anos todos, a ponte para as minhas conquistas e por me ensinar lições muito mais profundas do que poderia eu almejar naquele dia mágico!

À Prof^ª. Dr^ª. Débora Foguel pela constante disposição em me ensinar, pelos incentivos tão estimados. Obrigada pela espontânea, sincera e, com certeza, duradoura amizade que me fez sentir tão bem acolhida!

Às Prof^ª. Dr^ª. Patrícia Maria Guedes Paiva e Luana Cassandra B. B. Coelho por me deixarem contribuir com o desenvolvimento do nosso grupo.

À Prof^ª. Dr^ª. Vera Lúcia de Menezes Lima pelo apoio prestado e pelo convívio conquistado.

A todos os professores que tive durante essa etapa de minha vida pelas valorosas contribuições acadêmicas.

À todos os funcionários do Departamento de Bioquímica da UFPE e a Emerson Gonçalves e D. Silvia da UFRJ pela disposição diária.

Para cada uma das situações sempre existiu uma, algumas ou todas vocês para me compartilhar um sorriso, um abraço, uma repreensão, uma ajuda, um olhar, uma brincadeira. E assim foi, é e, onde quer que estejamos, será. Às minhas espetaculares amigas Adriana Argolo, Andréa Santos, Cynthia Nascimento, Danielly Oliveira, Flávia Araújo, Mariana Pinheiro, Regina Araújo e aos meus sempre queridos amigos do Laboratório de Glicoproteínas da UFPE, obrigada por tudo!

Aos meus súbitos e já tão estimados amigos cariocas Karolyna Gomes, Leonardo Palmieri, Yraima Cordeiro, Mônica Freitas, Mariana Pierre, Priscila, Talita, Rodolpho Machado... A lista se estenderia um a um, adorei todos vocês, obrigada por toda ajuda e atenção. Em especial,

gostaria de agradecer à Carolina Braga e à Juliana Cortines pela preciosa ajuda e amizade, sem as quais eu não teria sido tão feliz!

À Maria Reis e a Seu João por sempre e sempre estarem presentes
para o que for preciso. Vocês me são inestimáveis!

Ah Mãe, quanto mais os anos passam e tenho que renovar as declarações, mais fica difícil expressar em palavras o meu infinito amor, ele só cresce, enquanto que ‘palavras são palavras’.
Obrigada por me amar!

À minha vovó, só ela sabe como deve ter sido difícil esse tempo sem me ver e,
só eu sei o quanto ela torce por mim. Obrigada pelo amor de sempre!

À Nívea, por ser a melhor irmã, ou melhor, por ser a irmã que eu mais amo, a única.
Àquela que me faz sentir o máximo! Ao meu irmão Filipe,
mesmo parecendo longe, você é parte essencial da minha vida!

A Mazinho por sempre ter estado aqui. Obrigada por ter tornado grande
parte da minha vida possível!

Em nome dos meus primos Rodrigo, Renan e João Carlos, David e Daniel, Rudi,
Pedro e Mateus, agradeço a todos da minha família e aos amigos Jorge e Fafa
por me aplaudirem e me fazerem sentir mais do que realmente sou;
em parte vocês são quem sou. Obrigada por me fazerem sentir especial!

“Ao que se repete e que nunca é igual!” E assim eu agradeço a
Renata Angeli, a melhor pessoa que eu poderia ter encontrado na vida!
Em extensão, a Maria de Lourdes e Renato Angeli, por serem também minha família.

“A flor respondeu: – Bobo! Acha que abro minhas pétalas para que vejam? Não faço isso para os outros, é para mim mesma, porque gosto. Minha alegria consiste em ser e desabrochar”.

Arthur Schopenhauer

RESUMO

Além do de interesse acadêmico, o conhecimento acerca do enovelamento de proteínas é empregado em muitas aplicações biotecnológicas com importância industrial. Lectinas são proteínas capazes reconhecer com especificidade diferentes sacarídeos, estando envolvidas em uma variedade processos biológicos. Diversos modelos de associações quaternárias levam as lectinas de leguminosas a apresentarem peculiaridades no reconhecimento de carboidratos. Cramoll 1 é a principal isolectina encontrada em sementes de *Cratylia mollis*. Essa lectina glucose/manose específica pode apresentar-se como dímeros ou tetrâmeros. Resultados expressivos como caracterização de células transformadas, atividade mitogênica e inibição tumoral estimulou a realização do presente estudo. Utilizando espectroscopia de fluorescência e dicroísmo circular, características do processo de desenovelamento de Cramoll 1 induzido por uréia e altas pressões hidrostáticas (HHP) foram obtidas. Em pH 7,0, o centro de massa de triptofano não apresentou qualquer alteração significativa até 3 M de uréia sugerindo que a proteína ainda está na sua forma nativa. Como esperado, uma vez que a lectina é um dímero naquele pH, o processo foi dependente de concentração. Bis-ANS é uma sonda fluorescente usada para detectar intermediários de enovelamento de proteínas. Interessantemente, a lectina mostrou um aumento na capacidade de ligação a bis-ANS, principalmente na faixa de 3-5 M de uréia. Na presença de 3 M de uréia, existiram pouquíssimas mudanças no espectro de dicroísmo circular, mostrando que a estrutura secundária de Cramoll 1 está quase intacta sob esta condição. Reunidos, esses resultados sugerem que o desenovelamento de Cramoll 1 é um processo que ocorre em mais de dois estágios, com acumulação de uma espécie intermediária (I_{3M}) na presença de 3 M de uréia. 3,1 kbar a 37 e 1 °C não foi capaz de deslocar o centro de massa de triptofano, apontando que a lectina é pressão-resistente. A única condição em que o dímero de Cramoll 1 foi efetivamente dissociado foi quando 3 M de uréia foi adicionado ao tampão. Ao avaliar a ligação da proteína a bis-ANS sob pressão na presença de 3 M de uréia, observou-se que mesmo depois de 100 min, quando os triptofanos já foram expostos ao solvente, a lectina aumentou sua capacidade de ligar essa sonda. Essa observação implica que Cramoll 1 não está totalmente desenovelada sob HHP, exibindo mais uma espécie intermediária (I_P). No entanto, é necessário salientar que I_P é diferente de I_{3M} uma vez que o último mantém seus triptofanos em seu ambiente

nativo. Em conjunto, os dados descritos aqui sugerem que o processo de desenovelamento de Cramoll 1 pode ser esquematizado como: $N \rightarrow I_{3M} \rightarrow I_P \rightarrow U$.

ABSTRACT

Besides that, the answers to these questions are of academic interest, knowledge about protein folding is nowadays being exploited in many practical applications in biotechnology and is thus also of industrial importance. Lectins are proteins that recognize specifically carbohydrates. Large variability in quaternary association resulting from small alterations in essentially the same tertiary structure is a property exhibited specially by legume lectins, generating carbohydrate specificity. Cramoll 1 is a major lectin isolated from *Cratylia mollis* seeds, specific for mannose/glucose and presents assemblies' patterns in dimer or tetramer. Interesting results (differential binding to normal and transformed human mammary cells, antitumor activity, mitogenic potential, another) have been the major stimulus for the present study. Using fluorescence spectroscopy and circular dichroism (CD) new insights about Cramoll 1 unfolding process induced by urea and High Hydrostatic Pressure (HHP) were obtained. At pH 7.0, the tryptophan center of mass did not present any significant alteration up to 3 M urea suggesting that the protein is still in its native state. As expected, since the protein is a dimer, the process present concentration dependence. Bis-ANS has been used to map intermediate species present during the unfolding of several proteins. Interestingly, the protein presented an enhanced capacity to bind bis-ANS, mainly in the urea range of 3-5 M. In the presence of 3 M urea, there are very little changes in the CD spectrum what suggests that the secondary structure of Cramoll 1 is almost intact under this condition. Taken together these results suggest that the unfolding process of Cramoll 1 is a three-state process with the accumulation of an intermediate species (called I_{3M}) in the presence of 3 M urea. Since Cramoll 1 is a dimeric protein at pH 7.0, we decided to use HHP to study its dissociation. 3.1 kbar at 37 and 1°C there was almost no change in the tryptophan center of mass suggesting that the protein is pressure-resistant. The only condition where Cramoll 1 was effectively dissociated by HHP was when 3 M urea was added to the buffer. When we evaluated the bis-ANS binding of the protein under pressure in the presence of 3 M urea we observed that even after 100 min when the trps were already exposed, the protein presented an enhanced capability to binding this probe. This observation suggests that Cramoll 1 is not completely unfolded under HHP. However, we have to assume that this intermediate species (I_P) is different from the one observed in the presence of 3 M urea (I_{3M}), since the later species maintains its trp in the native environment. Taken together the data described here suggest that the unfolding process of Cramoll 1 can be summarized as: $N \rightarrow I_{3M} \rightarrow I_P \rightarrow U$.

Lista de Figuras

Figura 1 – Colapso hidrofóbico do enovelamento protéico.

Figura 2 – Fases do enovelamento protéico.

Figura 3 – *Molten globule* e forma nativa do citocromo.

Figura 4 – Estrutura terciária de uma lectina de leguminosa.

Figura 5 – Monômero da isoforma 1 da lectina de *Cratylia mollis* – Cramoll 1.

Figura 6 – Elétrons-*spins*.

Figura 7 – Diagrama de Jabłoński.

Figura 8 – Transições de energia no fenômeno de fluorescência.

Figura 9 – Espectros de absorção e emissão do triptofano em água.

Figura 10 – STOKES' *shift* do espectro de emissão do triptofano.

Figura 11 – Fórmula estrutural para bis-ANS.

Figura 12 – Ondas linearmente polarizadas.

Figura 13 – Ondas circularmente polarizadas.

Figura 14 – Interação da luz polarizada com material que exibe dicroísmo circular.

Figura 15 – Ângulo θ .

Figura 16 – Espectros de dicroísmo circular.

Figura 17 – Espalhamento de luz na desnaturação térmica de Cramoll 1.

Figura 18 – Espectros de dicroísmo circular de Cramoll em diferentes temperaturas.

Figura 19 – Estabilidade de Cramoll 1 em diferentes valores de pH.

Figura 20 – Fluorescência intrínseca e extrínseca das isoformas 1, 3 e 1,4 de Cramoll.

Figura 21 – Grau de desnaturação de estrutura terciária das isoformas de Cramoll 1, Cramoll 3 e Cramoll 1,4 em função da concentração de uréia.

Figura 22 – Estabilidade das isoformas 1, 3 e 1,4 de Cramoll a altas pressões.

Figura 23 – Aglutinação de *Trypanosoma cruzi* induzida por Cramoll 1,4.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
1.1	PROTEÍNAS	12
1.1.1	Enovelamento de Proteínas	12
1.2	LECTINAS	15
1.2.1	Generalidades	15
1.2.2	Detecção e Especificidade	16
1.2.3	Ocorrência e Importância Fisiológica	17
1.2.4	Lectinas de Leguminosas	17
1.2.4.1	Características e Importância Estrutural	17
1.2.4.2	Cramoll 1	18
1.3	FLUORESCÊNCIA	20
1.3.1	Generalidades	20
1.3.2	Fluorescência Intrínseca em Proteínas	23
1.3.3	Fluorescência Extrínseca em Proteínas	25
1.4	DICROÍSMO CIRCULAR	26
1.4.1	Ondas Eletromagnéticas	26
1.4.2	Medidas de Dicroísmo Circular	28
1.4.3	Aplicações de CD em Bioquímica	29
2.	OBJETIVOS	31
2.1	Objetivo Geral	31
2.2	Objetivos Específicos	31
	ARTIGO	32
I.	OUTROS RESULTADOS	48
I.I	Desnaturação Térmica de Cramoll 1	48
I.II	Estabilidade de Cramoll 1 em diferentes pH	49
I.III	Comparação entre as isolectinas 1, 3 e 1,4 de <i>Cratyilia mollis</i>	50
I.IV.I	Aglutinação de <i>Trypanosoma cruzi</i> por Cramoll 1,4	52
I.IV.II	Metodologia do ensaio de aglutinação	53
	CONCLUSÕES	54
	REFERÊNCIAS	56

1.1 Proteínas

1.1.1 Enovelamento de Proteínas

Cada polipeptídeo inicia sua existência emergindo de um ribossoma. Sua sequência de aminoácidos inicial é a completa tradução da sequência em que os códons estão arranjados no RNA mensageiro. Em algum ponto, o polipeptídeo começa a se enovelar para assumir a sua conformação nativa. A estrutura nativa de uma proteína é aquela conformação em que ela será capaz de exercer sua função biológica, sendo também conhecida como estado enovelado.

Uma proteína é mantida em seu estado nativo por uma soma de interações não-covalentes fracas – como interações hidrofóbicas, interações eletrostáticas e pontes de hidrogênio – mas que juntas mantêm a proteína na conformação nativa (BARBOSA, GARCIA e PEREIRA DE ARAUJO, 2005). O efeito hidrofóbico, que faz com que substâncias apolares se aproximem para minimizar seus contatos com a água, é um fator determinante que garante as proteínas se enovelarem conforme visto na figura 1 (KYTE, 1995).

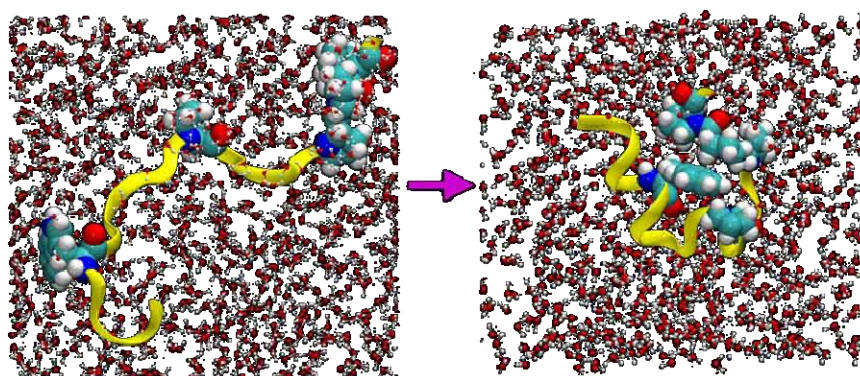


Figura 1 – Colapso hidrofóbico do enovelamento protéico.
Obtido de: <http://www.ncsa.uiuc.edu>.

A característica fundamental do processo de enovelamento é que a sequência de aminoácidos de cada proteína contém a informação que especifica a sua estrutura nativa e o caminho para alcançar esse estado, sendo um processo espontâneo que acontece em poucos segundos (ANFINSSEN, 1973; DOBSON, EVANS e RADFORD, 1994). Para que o enovelamento ocorra de forma rápida e segura, a cadeia polipeptídica, em vez de

experimental um número enorme de possibilidades conformacionais, assume conformações definidas, denominadas intermediários do enovelamento (Figura 2). Então, ao dobrar-se, uma proteína tem sua estabilidade conformacional aumentada de modo abrupto (i. e., sua energia livre diminui bruscamente), o que torna o dobramento um processo de sentido único.

De maneira geral, o enovelamento de uma proteína é iniciado com a formação de segmentos locais de estrutura secundária (α -hélices e folhas β). Uma vez que as proteínas nativas contêm cernes hidrofóbicos compactos, é muito provável que a força que inicia o dobramento da proteína seja o que tem sido denominado colapso hidrofóbico (Figura 1). Após este colapso, os elementos de estrutura secundária aparecem formando estruturas intermediárias que apresentam, portanto, uma estrutura secundária um tanto organizada, porém com estrutura terciária ainda flutuante. No estágio final do enovelamento, a proteína sofre uma série de ajustes complexos, por meio dos quais adquire uma organização mais rígida de suas cadeias laterais e pontes de hidrogênio internas, enquanto as moléculas de água remanescentes são expelidas do interior hidrofóbico, definindo assim a estrutura terciária (Figura 2).

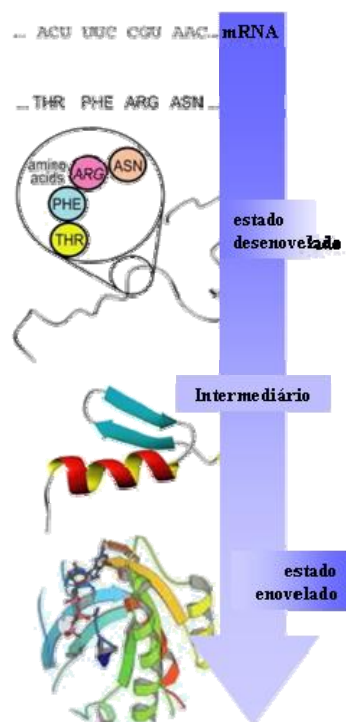


Figura 2 – Fases do enovelamento protéico.
Esquema criado pela autora.

Devido ao fato de que os polipeptídeos enovelados em sua forma nativa são estáveis, em condições fisiológicas de temperatura e pH, a concentração do estado desenovelado em circunstâncias normais é baixa. Assim, a única maneira de estudar o processo de

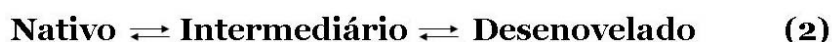
enovelamento é deslocar o equilíbrio com a introdução de perturbações não naturais, tais como variação de temperatura e pH, adição de agentes caotrópicos como uréia e cloreto de guanidina em altas concentrações, aumento de pressão hidrostática, ou uma combinação deles. Em qualquer medida significativa das propriedades de enovelamento-desenovelamento, a condição de reversibilidade da reação deve ser levada em conta, esse requerimento não pode ser descartado. As perturbações térmicas, em alguns casos em pH neutro, as causadas por uréia ou cloreto de guanidina ou as oriundas de aumento de pressão hidrostática são usualmente reversíveis.

O efeito de agentes físicos e/ou químicos na estrutura protéica pode ser avaliado pelo emprego de técnicas espectroscópicas como fluorescência e dicroísmo circular. Avaliando-se se as mudanças na estrutura secundária ocorrem concomitantemente ou não às mudanças na estrutura terciária, informações sobre a presença ou não de intermediários podem ser obtidas. Na ausência desses o equilíbrio ocorre via mecanismo de dois-estados, no qual só o estado enovelado ou só o desenovelado são populados (Eq. (1)); assim, a reação química que acompanha esse processo pode ser representada como o equilíbrio



Esse mecanismo é possível devido à alta cooperatividade do enovelamento protéico e à baixa estabilidade de possíveis intermediários. Conforme esse modelo, qualquer parâmetro termodinâmico do processo pode ser descrito pela contribuição exclusiva dos estados totalmente enovelado ou desenovelado (VAN MIERLO e STEENSMA, 2000).

Entretanto, não são todas as proteínas que obedecem ao modelo de dois-estados. Algumas proteínas em determinadas condições experimentais (mudanças de pH, pressão ou temperatura), apresentam, conforme mencionado, intermediários de enovelamento e, com isso, o equilíbrio segue um modelo de mais de dois estados. Mutações ou mesmo sais podem favorecer o aparecimento ou o acúmulo de intermediários (CAMPOS *et al.*, 2004). A equação 2 descreve o modelo de equilíbrio em três-estados como



A figura 3 apresenta um dos mais bem caracterizados desses intermediários. O chamado ‘glóbulo fundido’ (*molten globule*) (PTITSYN, 1995) aparece onde a molécula protéica é quase tão compacta como no estado nativo (DOLGIKH *et al.*, 1981; UVERSKY, 1993), tem o centro hidrofóbico frouxamente empacotado (DAMASCHUN *et al.*, 1986) e

contém uma significativa quantidade de estrutura secundária, mas com grande flexibilidade das cadeias laterais (NISHII, KATAOKA e GOTO, 1995).

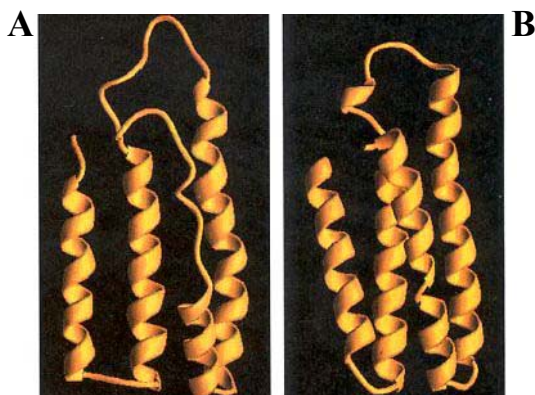


Figura 3 – (a) Glóbulo fundido e (b) forma nativa do citocromo b562. Obtido de ALBERTS *et al.*, 1994.

O conhecimento acerca desses intermediários é essencial para o entendimento do processo de enovelamento, uma vez que eles podem ter importantes papéis, em guiar e direcionar o enovelamento evitando conformações que não resultariam no estado nativo. Entretanto, esses intermediários, podem apresentar ainda resíduos apolares expostos ao solvente e, em alguns casos, podem iniciar eventos de agregação danosos ao organismo. Esses eventos podem estar ligados a doenças humanas como a encefalopatia espongiforme transmissível e outros tipos de amiloidoses (THOMAS, QU e PEDERSEN, 1995). Para algumas proteínas, no entanto, papéis fisiológicos têm sido associados a suas conformações intermediárias (CAMPOS e SANCHO, 2003).

1.2 Lectinas

1.2.1 Generalidades

Proteínas que ligam carboidratos são comumente conhecidas como lectinas ou aglutininas. O exato delineamento do que vem a ser lectinas tem sido tema de longa controvérsia, uma vez que numerosas proteínas com diferentes formas moleculares e especificidades foram classificadas juntas, ao longo dos anos, com base em um só parâmetro, a aglutinação de células. Dessa maneira, em 1980, GOLDSTEIN e colaboradores propuseram lectinas como proteínas ou glicoproteínas de origem não imunológica, capazes de interagir com carboidratos por pelo menos dois sítios de ligação, aglutinando células vegetais ou

animais e precipitando polissacarídeos, glicoproteínas ou glicolipídeos. Em 1981, DIXON anunciou lectinas como proteínas com pelo menos um sítio de ligação a carboidratos. Ainda, BARONDES (1988) e SHARON e LIS (1990) mencionaram a presença de um sítio hidrofóbico adicional, o que possibilita uma interação da lectina com proteínas ou outras substâncias.

Com avanço de técnicas como clonagem molecular e análise de estrutura-função de proteínas, o termo lectina tem sido redefinido pela associação de critérios estruturais aos funcionais. Assim, lectinas são proteínas ubíquas na natureza que exibem considerável diversidade estrutural, capazes de reconhecer hidrofóbica e hidrofílicamente diferentes estruturas sacarídicas com especificidade característica, estando envolvidas em uma variedade de processos biológicos (KENNEDY *et al.*, 1995; VIJAYAN E CHANDRA, 1999).

1.2.2 Detecção e Especificidade

Comumente, a presença de lectinas em materiais biológicos é avaliada pela capacidade de aglutinar eritrócitos, utilizando extratos em solução salina ou tampões (CORREIA e COELHO, 1995; COELHO e DA SILVA, 2000; SHARON e LIS, 2001). A hemaglutinação pode ser testada com eritrócitos tratados (química ou enzimaticamente) ou não, obtidos de sangue humano ou de outras espécies como galinhas, coelhos, ratos e cães (COELHO e DA SILVA, 2000). O tratamento com glutaraldeído ou formaldeído, ajuda a estabilizar as células, promovendo uma preparação padrão de eritrócitos, utilizada por um longo tempo, além de aumentar a sensibilidade das mesmas à aglutinação (OZEKI *et al.*, 1991). A atividade hemaglutinante das lectinas é usualmente medida pela técnica de diluições sucessivas (SYED *et al.*, 1999; GUIMARÃES-GOMES *et al.*, 2004).

Embora lectinas reconheçam e liguem açúcares simples como glicose/manose, galactose, N-acetilglicosamina, N-acetilgalactosamina ou fucose, elas têm uma afinidade muito maior para oligossacarídeos e glicoconjugados (PEUMANS e VAN DAMME, 1996). Com base em sua especificidade a carboidratos, em geral, as lectinas são classificadas de acordo com o monossacarídeo que apresente maior ação inibitória da atividade hemaglutinante (ex.: lectina glicose/manose), existindo aquelas específicas apenas para oligossacarídeos (GOLDSTEIN e PORETZ, 1986).

1.2.3 Ocorrência e Importância Fisiológica

Lectinas podem ser encontradas em todos os reinos desde vírus, bactérias, plantas até mamíferos (DHUNA *et al.*, 2005; SONG *et al.*, 2005; GRANELLI-PIPERNO *et al.*, 2006; PANUNTO *et al.*, 2006), sugerindo um papel funcional fundamental para essas proteínas (ETZLER, 1998). Em sementes de leguminosas, constituem cerca de 10% das proteínas solúveis (SHARON e LIS, 1990). Sua larga distribuição na natureza sugere grande importância fisiológica.

Embora não claramente definidos diversos papéis têm sido propostos para essa classe de proteínas, por exemplo: renovação de glicoproteínas do soro (VIJAYAN e CHANDRA, 1999); defesa contra patógenos (CHANG e ZHU, 2002); proteínas de estocagem (NAKAMURA *et al.*, 2004); adsorção viral (BOTOS e WLODAWER, 2005); resposta imune inata (CHEN, LIU e YANG, 2005); transporte de carboidratos (KAMIYA *et al.*, 2005); bem como mediação de interações célula-célula e parasito-hospedeiro (SAOUROS *et al.*, 2005).

1.2.4 Lectinas de Leguminosas

1.2.4.1 Características e Importância Estrutural

Encontradas principalmente nas sementes da maioria das plantas da família Leguminosae, as lectinas de leguminosas formam um grande grupo de proteínas homólogas que apresentam estruturas terciárias essencialmente idênticas. Contudo, pequenas alterações em suas seqüências de aminoácidos resultam em diferentes tipos de associações quaternárias, conferindo às mesmas especificidades sacarídicas peculiares (LORIS *et al.*, 1998). Assim, essas lectinas têm sido reconhecidas como um importante modelo para estudar interações do tipo proteína-proteína (BUTS *et al.*, 2001) e proteína-carboidrato (SHARON e LIS, 1995).

As lectinas de leguminosa apresentam graus de homologia que variam de 36 a 90% entre aquelas com seqüências conhecidas (SHARON e LIS, 2003). Cerca de 60% da estrutura secundária é composta por folhas β , conectadas por voltas. Como mostrado na figura 4a, todas as lectinas de leguminosas conhecidas até então, apresentam estrutura terciária formada a partir de folhas β antiparalelas, uma dorsal com seis fitas- β e outra frontal com sete fitas- β , cobertas por uma superior, com cinco fitas- β (SRINIVAS *et al.*, 2001). As suas estruturas tridimensionais são as mesmas, exceto por pequenas variações nas voltas (HAMELRYCK *et al.*, 2000).

Todas as lectinas dessa classe (exceto a arcelina 5a, de *Phaseolus vulgaris*) estão organizadas em dímeros ou tetrâmeros, sendo um processo pH-dependente. A dimerização envolve associações do tipo *side-by-side* (Figura 4b) ou *back-to-back* das subunidades monoméricas, assim como os tetrâmeros são formados a partir de um arranjo do tipo *side-by-side* ou *back-to-back* (Figura 4c) de dímeros, sendo também chamados de dímeros de dímeros (LORIS *et al.*, 1998; PRABU, SUGUMA e VIJAYAN, 1999). Pequenas diferenças nas seqüências de aminoácidos nas interfaces monoméricas e ausência ou presença de glicosilação parecem afetar as associações dos monômeros, resultando em diferentes modos de oligomerização (SRINIVAS *et al.*, 2001).

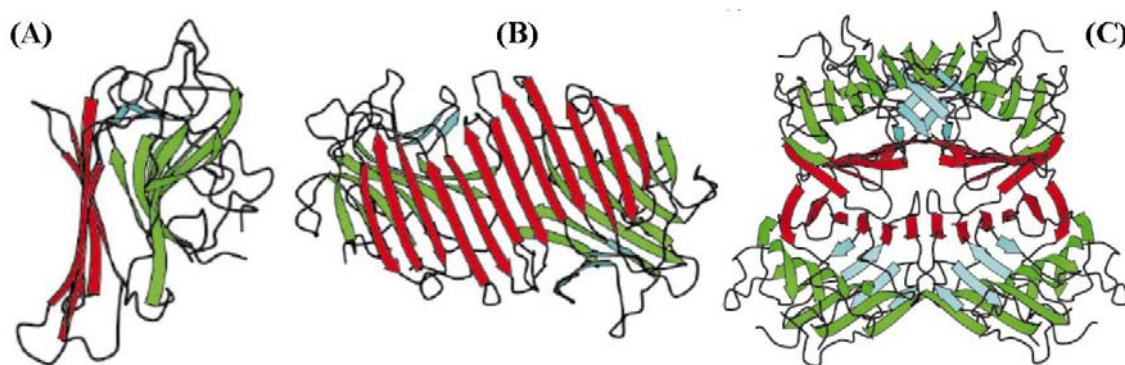


Figura 4 – (a) Estrutura terciária de uma lectina de leguminosa, o monômero pode ser descrito por folhas β antiparalelas (uma ‘dorsal’ com seis fitas- β , uma ‘frontal’ com sete fitas- β e uma superior com cinco fitas- β) todas conectadas por voltas. (b) Dimerização desta lectina do tipo *side-by-side* (conhecido também como modelo canônico), com alinhamento das fitas ‘dorsais’ levando à formação de uma folha de doze fitas- β antiparalelas. (c) Tetramerização do tipo *back-to-back* envolvendo dois dímeros. (Essas figuras foram geradas usando o programa MOLSCRIPT, KRAULIS, 1991).

1.2.4.2 Cramoll 1

Cramoll 1 é uma lectina glicose/manose específica encontrada em sementes de *Cratylia mollis*, família Leguminosae, tribo Phaseolae, subtribo Diocleinae. Essa planta, conhecida como feijão camaratu ou camaratuba é autóctone no Semi-Árido do estado de Pernambuco.

O protocolo de purificação de Cramoll 1 foi estabelecido em 1995 por CORREIA e COELHO, desde então crescentes estudos de caracterização e aplicação biotecnológica vêm sendo desenvolvidos com essa lectina. Recentemente, Cramoll 1 teve sua estrutura resolvida por cristalografia de raios-X com 1,77 Å de resolução (SOUZA, G. *et al.*, 2003). A expressividade de resultados como: caracterização de células transformadas malignamente

(BELTRÃO *et al.*, 1998); sensibilidade eletroquímica (SOUZA, S. *et al.*, 2003); atividade mitogênica (MACIEL *et al.*, 2004) e inibição tumoral (ANDRADE *et al.*, 2004) estimulou a realização de estudos de caracterização estrutural desta proteína, utilizando técnicas espectroscópicas como fluorescência e dicroísmo circular, constituindo uma importante etapa para uma utilização racional dessa molécula para fins biotecnológicos.

Taxonomicamente correlacionada com a concanavalina A (lectina extraída de *Canavalia ensiformis*), Cramoll 1 apresenta 82% de homologia em sequência de aminoácidos e compartilha com aquela lectina uma grande similaridade em estrutura terciária e quaternária, embora apresentem diferenças significativas em aplicações biológicas (LIMA *et al.*, 1997). O monômero de Cramoll 1 (Figura 5) possui 236 aminoácidos (dentre os quais quatro triptofanos), exibindo uma estrutura clássica de lectinas de leguminosa, conforme descrito (SRINIVAS *et al.*, 2001).

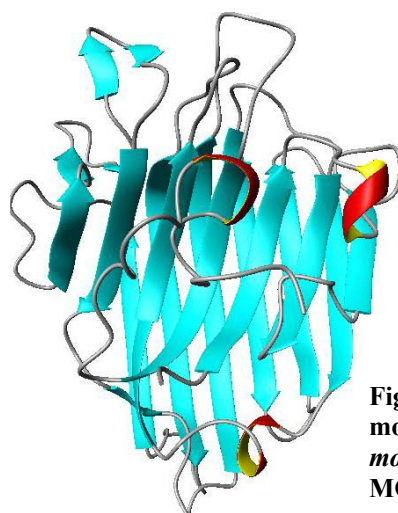


Figura 5 – Estrutura tridimensional do monômero da isoforma 1 da lectina de *Cratylia mollis* – Cramoll 1. Originada pelo programa MOLMOL (KORADI *et al.*, 1996).

A dimerização de Cramoll 1, que ocorre em torno de pH 5,0, é do tipo *side-by-side* entre duas folhas dorsais, resultando em uma grande folha de 12 fitas- β com diminuição de 51% de exposição de área hidrofóbica. Com a elevação do pH acima de 7,0, ocorre a tetramerização de Cramoll 1, resultado da interação do tipo *back-to-back* entre dímeros, resultando na oclusão de 61% da superfície hidrofóbica. Devido a uma pequena concavidade da folha de 12 fitas- β , há a formação de um canal no centro do tetrâmero de Cramoll 1 que é completamente acessível ao solvente no qual ela se encontra.

1.3 Fluorescência

1.3.1 Generalidades

Moléculas que absorvem luz, tipicamente perdem o excesso de energia por processos não radiativos, como, por exemplo, liberando calor. Em alguns casos, a energia é re-emitida como luz, um fenômeno conhecido como fluorescência. Esse processo pode ser definido como a emissão de luz a partir de um estado excitado do tipo singleto, estado em que todos os elétron-*spins* estão pareados (Figura 6).

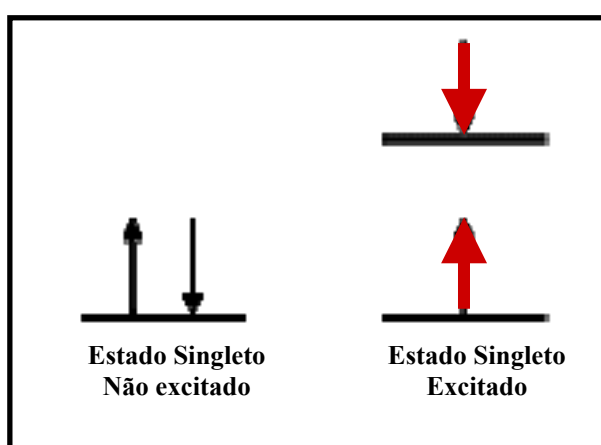


Figura 6 – Elétrons-*spins* nos estados de energia não excitado (esquerda) e singleto excitado (direta). Esquema elaborado pela autora.
Linhas horizontais e setas representam os orbitais e os elétrons-*spins*, respectivamente.

Cada elétron tem *spin* $-1/2$ ou $+1/2$. No estado não excitado, os elétrons estão pareados e cada um tem *spins* opostos. Segundo a mecânica quântica, o momento orbital angular de qualquer nível de energia é predito pela equação $M = 2S + 1$, onde S corresponde ao *spin*; logo, para estados que apresentam elétrons-*spins* pareados $M = 2(-1/2 + 1/2) + 1 = 1$, assim, os estados não excitado e singleto podem ser definidos como $M = 1$.

A fluorescência tipicamente ocorre em moléculas aromáticas que apresentam grupamentos fluorescentes denominados fluoróforos. Os fluoróforos estão divididos em duas classes gerais: intrínsecos (quando ocorrem naturalmente) e extrínsecos (aqueles que são adicionados a uma amostra para obter a propriedade espectral desejada). Em bioquímica, a fluorescência intrínseca pode ser encontrada em proteínas e co-fatores enzimáticos (NADH, FAD e FMN), sendo inexistente em sacarídeos e lipídeos e, muito fraca no DNA.

Dados de fluorescência são geralmente apresentados como espectros de emissão, gráfico de intensidade de fluorescência (unidades arbitrárias) *versus* comprimento de onda

(nanômetros) ou números de ondas (cm^{-1}). Os espectros de emissão variam largamente e são dependentes da estrutura química do fluoróforo e do solvente em que este está dissolvido.

Os processos que acontecem entre absorção e emissão da luz podem ser ilustrados pelo diagrama proposto por ALEXANDER JABLOŃSKI em 1935 (Figura 7), existindo em uma variedade de formas para ilustrar vários processos moleculares que podem ocorrer em estados excitados.

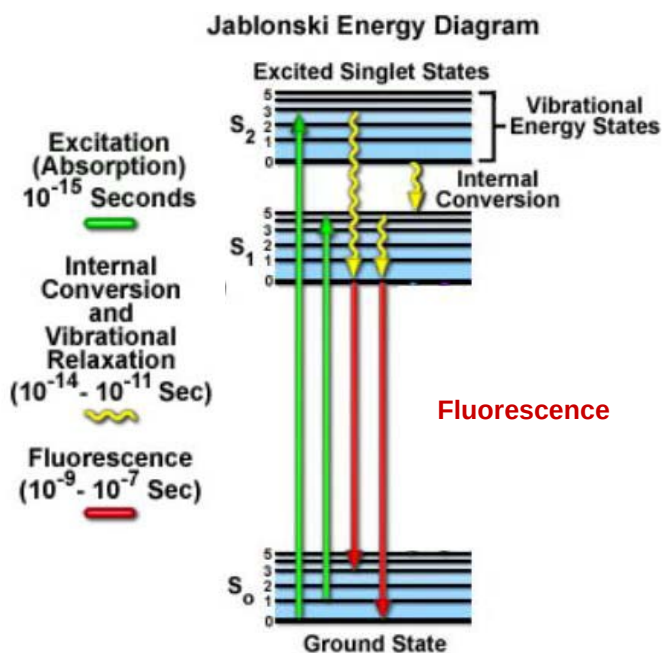


Figura 7 – Uma forma do diagrama de Jabłoński.
Disponível em: <http://www.olympusfluoview.com>.

S_0 corresponde ao estado não excitado, S_1 e S_2 representam os estados eletrônicos de maiores energias, sendo alcançados após absorção da luz. A transição entre estados ocorre em cerca de 10^{-15} , tempo inferior ao necessário para ocorrer deslocamento do núcleo (princípio de FRANCK-CONDON). Ainda, cada estado eletrônico de uma molécula apresenta diversos subníveis de energia vibracional, representados por 0, 1 e 2. Uma molécula pode absorver um fóton que contenha energia igual a diferença entre seu estado inicial e um de seus estados excitados (a energia de um fóton é dada por $E = h\nu$, na qual h é a constante de PLANCK – $6,27 \times 10^{-27}$ erg-s e ν é a frequência da luz).

Dentre as características gerais que podem ser observadas no fenômeno da fluorescência, pode-se destacar que o espectro de emissão, na maior parte dos casos, é independente do comprimento de onda de excitação (regra de KASHA, 1950). Uma vez que o excesso de energia é rapidamente dissipado, num processo conhecido como conversão interna, o fluoróforo passa para o estado de menor energia vibracional do estado singleto S_1 .

antes de ocorrer emissão de fluorescência ($S_1 \rightarrow S_0$), esse retorno é conhecido como tempo de vida de fluorescência (*fluorescence lifetime*), (CRONEY, JAMESON E LEARMONTH, 2001).

Em geral, a emissão de fluorescência ocorre entre 10^{-9} - 10^{-7} s, uma janela de tempo onde ocorrem diversos fenômenos biológicos, como, por exemplo, flutuações na estrutura protéica e, por isso, a fluorescência tem sido empregada com grande sucesso para acompanhar alterações conformacionais de proteínas.

Como consequência da regra de KASHA, outra propriedade da fluorescência pode ser observada: a energia de emissão é menor que a de absorção (deslocamento de STOKES ou STOKES's *shift*), assim a fluorescência acontece em comprimentos de ondas mais longos, ou seja, de menor energia. Esse fenômeno foi primeiramente relatado por Sir GEORGE G. STOKES em 1852 ao realizar experimentos com a molécula de quinina (fluoróforo clássico). A perda de energia entre a excitação e a emissão é observada universalmente para moléculas polares em solução, ocorrendo, devido à interação entre os dipolos do solvente e do fluoróforo excitado, o qual perde energia proporcionalmente à polaridade do solvente (NAJBAR, DORFMAN e FAYER, 1990). O tempo de vida de fluorescência é usualmente mais longo que o requerido para acontecer interação com o solvente, assim a emissão de fluorescência ocorre a partir do estado solvente-relaxado; por outro lado, a absorção da luz não sofre a interferência do solvente, uma vez que esse processo requer um tempo menor para acontecer.

Uma última consideração a respeito dos aspectos gerais do fenômeno abordado, diz respeito à regra da imagem especular para os espectros de absorção e emissão. A natureza simétrica desses espectros é resultado das mesmas transições sofridas em ambos os processos e as similaridades dos níveis vibracionais de S_0 e S_1 , o que está de acordo com o princípio de FRANCK-CONDON, ou seja, só há transições verticais sem mudanças na posição do núcleo (Figura 8).

Medidas de fluorescência podem ser classificadas em dois tipos, *steady-state* (estado estacionário) e *time-resolved* (resolvidas no tempo). As medidas obtidas por *steady-state* são aquelas realizadas com iluminação constante, onde a amostra é iluminada com um feixe contínuo de luz e o espectro de intensidade ou emissão de fluorescência é coletado varrendo uma faixa de comprimentos de onda onde ocorre a emissão do dado fluoróforo.

A interação da luz com a matéria tem sido largamente empregada na física, na química e em ciências biológicas (CRONEY *et al.*, 2001). Em bioquímica e biologia molecular, a espectroscopia de fluorescência vem sendo utilizada em: detecção de espécies reativas do oxigênio (GOMES, FERNANDES e LIMA, 2005); análises de sequência de ácidos nucleicos

(DAVIES *et al.*, 2006); identificação celular (FARRUGGIA *et al.*, 2006); imunoenaios (SIN *et al.*, 2006). Apesar de não fornecer informação detalhada sobre a estrutura de uma proteína, a fluorescência é bastante difundida devido à sua sensibilidade (WEISS, 1999) e à capacidade de detectar mudanças nas propriedades dinâmicas e estruturais das mesmas (GE, TOLOSA e RAO, 2004).

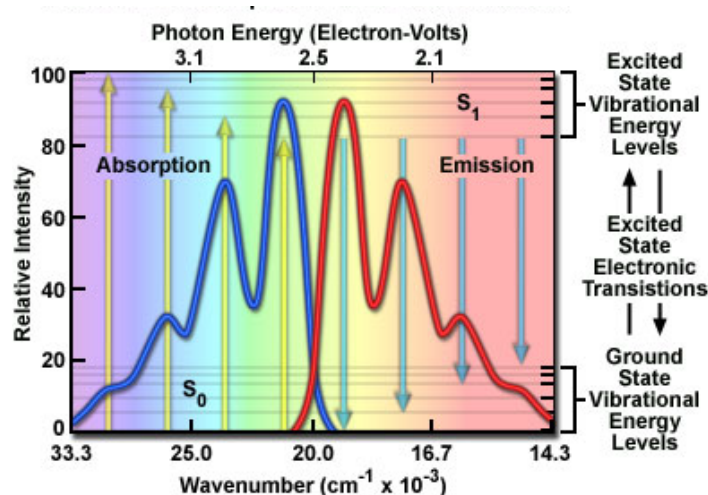


Figura 8 – Transições de energia nos processos de absorção e emissão no fenômeno de fluorescência. Disponível em: <http://www.olympusfluoview.com>.

1.3.2 Fluorescência Intrínseca em Proteínas

Os aminoácidos que contribuem para a fluorescência de proteínas são os aromáticos: fenilalanina, tirosina e triptofano (Trp, W). Esse último é o fluoróforo intrínseco que mais contribui para o espectro de emissão dessas macromoléculas, uma vez que seu rendimento quântico (número de fótons emitidos em relação àqueles absorvidos) e coeficiente de extinção ou absorção molar (força com que a substância absorve a luz) são superiores aos dos demais. O triptofano absorve em torno de 295 nm e tem seu máximo de emissão, em água, perto de 350 nm (Figura 9).

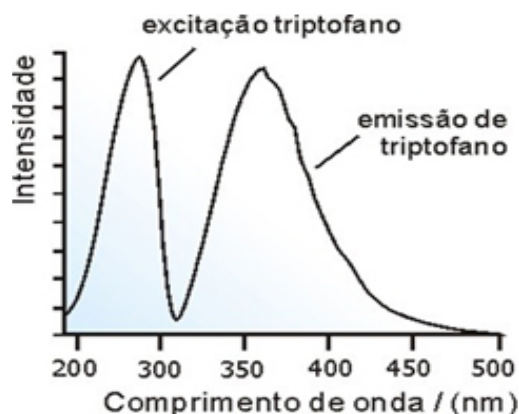


Figura 9 – Espectros de absorção e emissão do triptofano em água. Disponível em: <http://www.chemkeys.com>

Outra característica que faz do triptofano um dos principais alvos no estudo espectroscópico de proteínas é sua sensibilidade à polaridade do solvente, ou seja, o seu espectro de emissão reflete a polaridade do microambiente em que se encontra. Fluoróforos que são sensíveis à polaridade do solvente são aqueles que apresentam uma grande separação de carga no estado excitado, mas esse fator não explica completamente toda a complexidade espectral do anel indol do triptofano, as quais são devidas à presença de duas transições sobrepostas na banda de absorção, transições para o estado 1L_a e 1L_b do indol. Estes estados possuem energias similares, e, dependendo do meio, qualquer um pode ter a menor energia (a emissão ocorre a partir de estados de menores energias – regra de KASHA), como cada estado possui momentos dipolo diferentes eles respondem de maneira diferente à polaridade do solvente (LOUZADA *et al.*, 1996).

A emissão máxima e o rendimento quântico dos resíduos de triptofano em proteínas podem variar muito, e essas variações são devidas à estrutura tridimensional dessas biomoléculas. Como o triptofano responde sensivelmente à polaridade do meio, quando está em ambiente apolar o grupo indol apresenta uma emissão estruturada caracteristicamente deslocada para os comprimentos de onda mais perto da cor azul (maior energia), com o aumento da polaridade do meio há formação de pontes de hidrogênio do resíduo de aminoácido com o solvente, desprovendo o espectro de energia vibracional e deslocando-o para a região do vermelho (menor energia) figura 10.

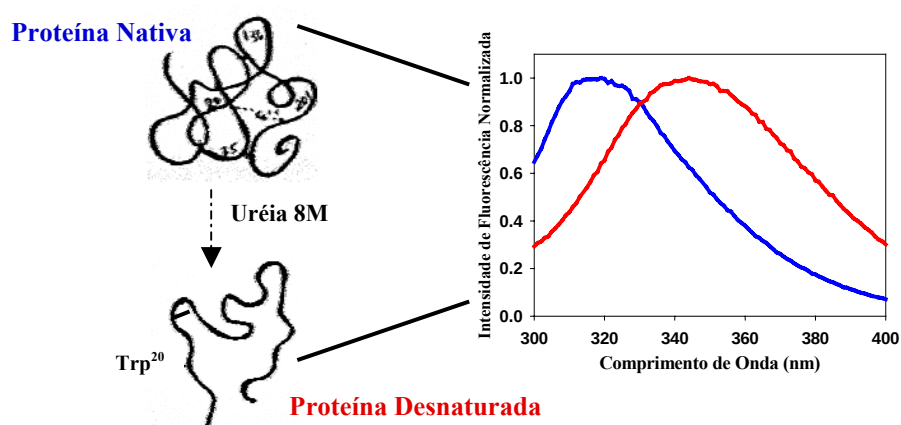


Figura 10 – STOKES' *shift* do espectro de emissão do triptofano quando exposto ao meio polar. Esquema criado pela autora.

1.3.3 Fluorescência Extrínseca em Proteínas

Algumas vezes a molécula de interesse não é fluorescente, ou a fluorescência intrínseca não é adequada para o experimento desejado, nesses casos a fluorescência pode ser obtida através da marcação com sondas extrínsecas, as quais podem se ligar à molécula de interesse covalentemente ou não. No caso de proteínas, o marcador é, na maioria dos casos, um cromóforo que apresenta comprimento de onda de excitação e de emissão mais longos que os aminoácidos aromáticos.

Em geral, as sondas de marcação do tipo covalente são utilizadas para quantificar a ligação de proteínas a outras macromoléculas (DNA, lipídeos), técnica chamada de anisotropia (polarização) de fluorescência, como exemplo tem-se a fluoresceína e a rodamina. Outros marcadores podem ligar-se a proteínas de maneira não covalente, destacando-se os membros da família dos naftalenosulfonatos, como o bis-ANS (4,4'-bis(1-anilidonaphthalene 8-sulfonate)). Essa classe de compostos é fracamente ou não fluorescente em água, mas fluorescem fortemente quando ligados a estruturas hidrofóbicas em proteínas, podendo aumentar em até 200 vezes a fluorescência original (ROSEN e WEBER, 1969).

Os estudos dessa sonda foram primeiramente realizados por GREGÓRIO WEBER em seus experimentos com a albumina de soro bovino, BSA (DANIEL e WEBER, 1966). Hoje, o bis-ANS é muito utilizado para investigar a conformação de proteínas e o efeito de modificações ambientais sobre as mesmas. O bis-ANS (Figura 11) é uma molécula anfipática, absorvendo em torno de 360 nm e emitindo entre 400 e 600 nm. Uma vez que só a sua região hidrofóbica contribui para emissão de fluorescência, essa sonda, quando ligada a estruturas protéicas parcialmente enoveladas, que apresentam exposição de sítios hidrofóbicos é capaz de fluorescer. Quando livre em solução, o bis-ANS não apresenta emissão de fluorescência significativa e, com isso, se pode avaliar de forma bastante clara se esta sonda está livre ou ligada às proteínas e, com isso, inferir sobre o estado de enovelamento da proteína em questão.

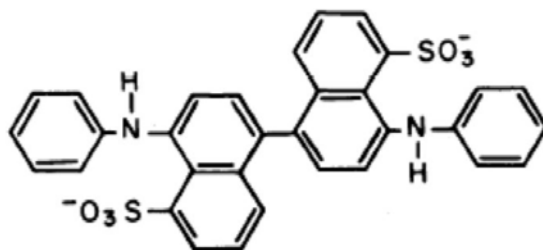


Figura 11 – Fórmula estrutural de 4,4'-bis(1-anilidonaphthalene 8-sulfonate).
Obtido de: TAKASHI, TONOMURA e MORALES, 1977.

1.4 Dicroísmo Circular

1.4.1 Ondas Eletromagnéticas

Ondas eletromagnéticas são mudanças periódicas de campos elétrico e magnético no espaço em função do tempo. Essas ondas se propagam na velocidade da luz e, em qualquer ponto do feixe de luz o campo magnético é sempre perpendicular ao elétrico. Analisando apenas o campo elétrico pode-se inferir que se o vetor desse campo (medido em um ponto fixo do espaço) oscila em torno de uma linha reta então essa onda é chamada de plano-polarizada ou linearmente polarizada, podendo esse plano ser vertical ou horizontal (Figura 12).

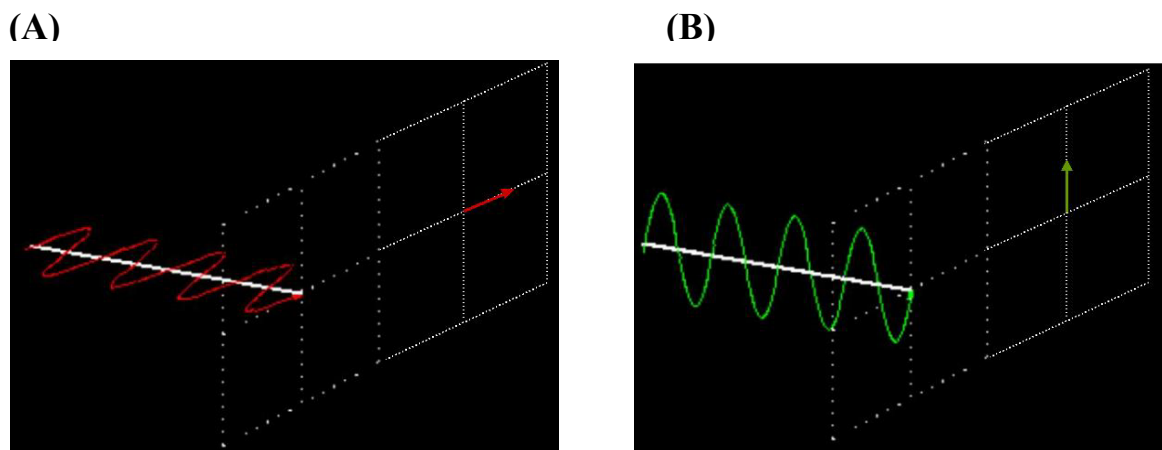


Figura 12 – Ondas linearmente polarizadas: (a) horizontalmente e (b) verticalmente.
Disponível em: <http://www.enzim.hu/~szia/cddemo>.

A superposição de duas ondas de iguais amplitude e comprimento que estão polarizadas em dois planos perpendiculares, mas com uma diferença de fase de 90° entre elas, gera um vetor resultante que gira em um círculo enquanto seu comprimento permanece constante. Essas ondas são denominadas de circularmente polarizadas. Quando a diferença de fase é de 90° o vetor gira no sentido horário e a luz é dita circularmente polarizada à direita (Figura 13a), da mesma forma quando essa diferença é de -90° o vetor gira no sentido anti-horário e a luz é dita circularmente polarizada à esquerda (Figura 13b). De maneira inversa, a superposição de ondas de luz circularmente polarizada à esquerda e à direita resulta em ondas de luz linearmente polarizada (KELLY, JESS e PRICE, 2005).

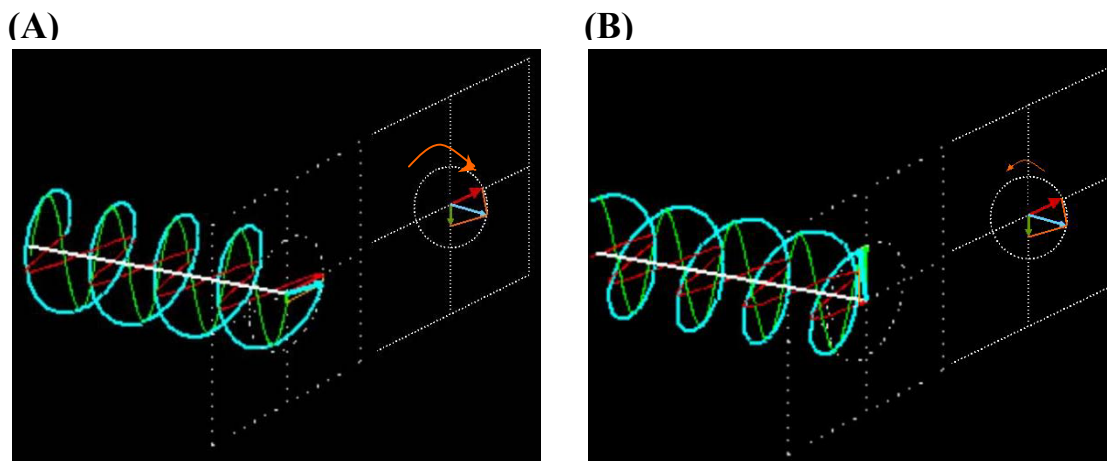
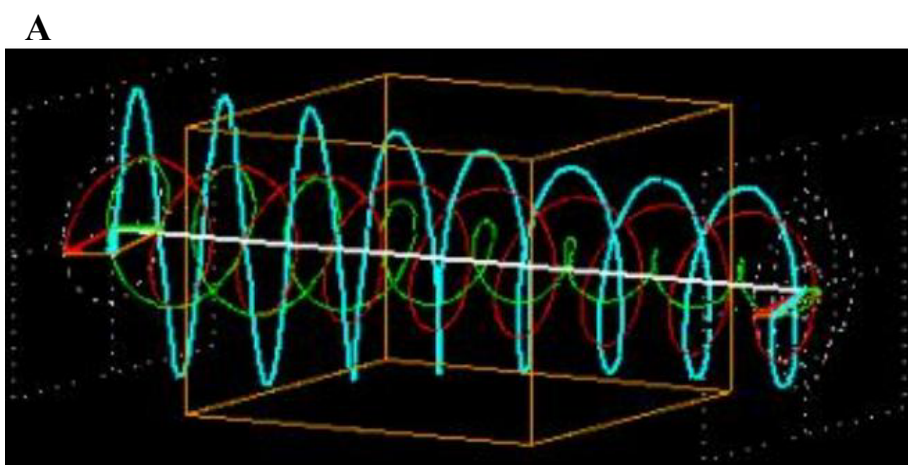


Figura 13 – Ondas circularmente polarizadas: (a) à direita e (b) à esquerda.
Disponível em: <http://www.enzim.hu/~szia/cddemo>.

Alguns materiais possuem uma propriedade especial: eles absorvem diferentemente a luz circularmente polarizada à esquerda da polarizada à direita. Este fenômeno é conhecido como dicroísmo circular (*circular dichroism*, CD). Assim, se uma luz linearmente polarizada atravessa um meio que apresenta CD, suas propriedades serão mudadas porque esse meio absorve diferentemente os dois componentes circulares, formando um vetor resultante que gira em torno de uma elipse (luz elipticamente polarizada), figura 14 a e b. Para exibir semelhante característica uma molécula deve ser quiral, ou seja, sua imagem especular não pode ser superposta a ela e, portanto, não deve apresentar qualquer elemento de reflexão simétrica.



B

Antes de Interação com a Matéria

Após Absorção pela Matéria

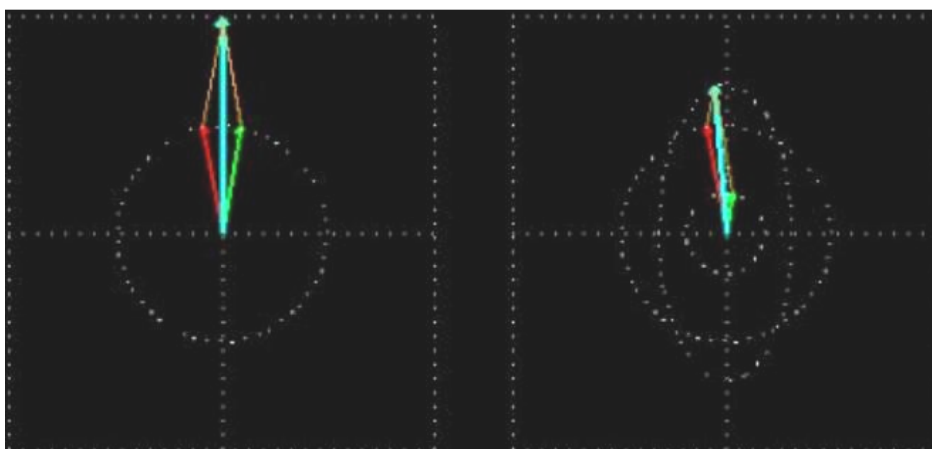


Figura 14 – (a) Interação de luz linearmente polarizada com material que exibe dicroísmo circular; (b) Secção frontal do material. Disponível em <http://www.enzim.hu/~szia/cddemo>.

1.4.2 Medidas de Dicroísmo Circular

Como definido CD é a diferença de absorção da luz circularmente polarizada à esquerda e à direita, podendo ser mensurado conforme a Lei de LAMBERT-BEER:

$$\Delta A = A_e - A_d = \epsilon_e Cl - \epsilon_d Cl = \Delta \epsilon Cl$$

onde ϵ_e e ϵ_d representa o coeficiente de extinção molar para a luz circularmente polarizada à esquerda e à direita, respectivamente, C constitui a concentração molar do soluto quiral e l é a distância percorrida pela luz.

No entanto, uma outra medida de CD é largamente empregada, especialmente em bioquímica. O método original de medida de CD (LOWRY, 1935) uma luz plano-polarizada atravessa um meio circularmente dicróico, e, conforme já mencionado, a absorção diferencial dos componentes circulares origina uma luz elipticamente polarizada (Figura 15). Quando os vetores elétricos dos dois componentes circulares estão na mesma direção, a soma de suas magnitudes forma o semi-eixo maior da elipse, e quando estão em direções opostas, a diferença de suas magnitudes forma o semi-eixo menor da elipse. CD pode ser caracterizado pela proporção dos semi-eixos menor e maior, que é a tangente de um ângulo θ , chamado elipticidade. Assim, espectros de CD são freqüentemente reportados em termos de elipticidade molar, em vez de θ (NAEEM, KHAN e KHAN, 2005; CHATTERJEE e MANDAL, 2005).

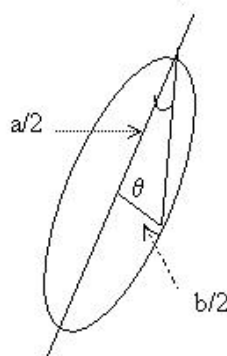


Figura 15 – Luz elípticamente polarizada, formada pela luz circularmente polarizada para esquerda e para a direita de intensidades diferentes. A elipticidade é o ângulo θ , que é a tangente da proporção entre o menor (b) e o maior (a) eixo da elipse (SNATZKE, 1994).

1.4.2 Aplicações de Dicroísmo Circular em Bioquímica

CD é uma das mais sensíveis técnicas físicas para determinação de estruturas e monitoramento de mudanças estruturais de biomoléculas. Em proteínas o principal grupo opticamente ativo são as ligações amidas do esqueleto peptídico e as cadeias laterais dos aminoácidos aromáticos. Em polipeptídeos e proteínas existem regiões onde os cromóforos peptídicos estão em arranjos fortemente organizados, semelhantes a α -hélices e folhas β . Dependendo da orientação das ligações peptídicas nos arranjos, as transições ópticas das ligações amidas podem ser divididas em múltiplas transições, podendo os comprimentos de onda e as intensidades dessas transições serem aumentados ou diminuídos (GREENFIELD, 1996). Conseqüentemente, os diferentes tipos de estrutura secundária apresentam espectros de CD característicos.

Para determinação de estrutura secundária de proteínas, ambos, cálculos teóricos e medições experimentais têm demonstrado a alta sensibilidade de espectros de CD na região abaixo de 250 nm, chamada *far*-UV CD. A figura 16 ilustra os espectros de CD para três classes de proteínas. Em um espectro de CD, os números negativos significam que a absorção é preferencialmente da luz circularmente polarizada à esquerda, os positivos à direita e o zero representa a ausência do fenômeno. As proteínas que são formadas exclusivamente por α -hélices mostram um forte duplo mínimo em 222 e 208-210 nm e um pico positivo em 191-193 nm. Proteínas constituídas de 100% de folhas β , usualmente têm uma única banda de CD negativa (entre 210 e 225 nm) e uma positiva (entre 190 e 200 nm); existe uma maior variabilidade entre os espectros relatados para as folhas β , uma vez que podem estar presentes

na forma paralela, antiparalela, ou uma mistura de ambas, e podem estar torcidas de várias maneiras. A classe de proteínas desordenadas inclui: muitos oligopeptídeos, pequenos peptídeos com pontes dissulfeto ou grupos prostéticos, e proteínas desnaturadas. Estas últimas não apresentam sinal de dicroísmo na região onde as α -hélices e folhas beta absorvem (VENYAMINOV e YANG, 1996).

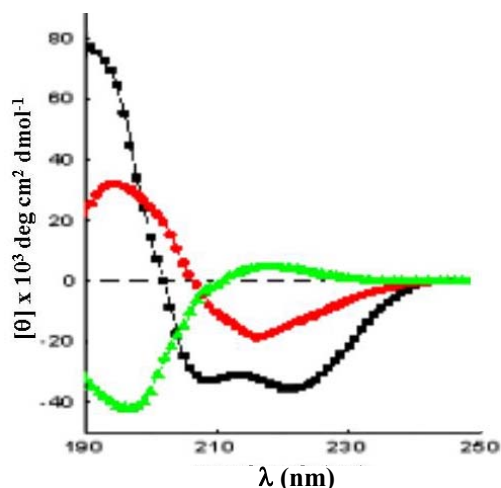


Figura 16 – Espectros de dicroísmo circular, representativos de α -hélices (—), folhas β (---) e proteínas desestruturadas (---). Disponível em: <http://biophysics.uchicago.edu>.

Obviamente, o CD não pode competir com técnicas como difração de raios-X ou ressonância magnética nuclear em providenciar detalhes sobre a estrutura de uma proteína, mas pode ser uma poderosa ferramenta para estimar frações de resíduos de aminoácidos em estrutura tipo α -hélices, folhas β e desordenada. Este dado é muito útil quando informações sobre a estrutura em alta resolução não existem, e mesmo se esta estiver disponível o CD pode dar informações sobre o efeito da temperatura, pH, agentes químicos, mutações, dentre outros na estrutura secundária de forma bem mais eficiente (KELLY, JESS e PRICE, 2005).

2.1 Objetivo Geral

Realizar estudos de caracterização estrutural com a isoforma 1 da lectina de sementes de *C. mollis* (Cramoll 1), purificada à homogeneidade.

2.2 Objetivos Específicos

- Obter Cramoll 1 purificada;
- Promover a desnaturação e dissociação das estruturas protéicas;
- Monitorar o processo de desnaturação das lectinas por técnicas fluorimétricas e de dicroísmo circular;
- Avaliar o conteúdo das estruturas secundária e terciária das proteínas antes e após a desnaturação.

Artigo a ser submetido ao periódico Biochimica et Biophysica Acta.



Intermediate species are present in the unfolding pathway of Cramoll 1, the major isolectin from *Cratylia mollis* seeds

Nathalia V. N. Paz¹, Luana C. B. B. Coelho¹, Débora Foguel², Maria Tereza S. Correia¹

¹Departamento de Bioquímica, CCB, Universidade Federal de Pernambuco,
Av. Moraes Rego s/n, 50670-420, Recife, Brazil

²Instituto de Bioquímica Médica, CCS bloco E sala 42, Universidade Federal do Rio de Janeiro,
Av. Bauhinia 400, 21941-590, Rio de Janeiro, Brazil

1. Introduction

Lectins are multi-valent carbohydrate binding proteins of non-immune origin [1]. They exist in almost all living organisms; in vegetables, lectins constitute up to 10% of the soluble protein content of seeds in leguminous plants [2]. Besides wide application on medicine: cancer inhibition [3], apoptosis induction [4], HIV infection [5,6], these proteins are excellent model to study the molecular basis of oligomeric proteins folding. Despite having the same tertiary structural fold at monomeric level, lectins exhibit considerable variation in their patterns of assembly into dimers and tetramers arising from small alterations sequence variations [7], making these proteins also of interest to analyse the details of protein–protein interaction [8].

Cramoll 1 is a major isolectin isolated from *Cratylia mollis* seeds [9] from the Leguminosae family and the Diocleinae subtribe. Taxonomically related with concanavalin A (82% identity), Cramoll 1 is a Glc/Man-specific lectin, exists as a dimer at pH 7.0, with each monomer (236 aminoacids, $M_r = 30,000$) possessing one saccharide binding site as well as a transition metal ion site Mn^{2+} and Ca^{2+} site [10] (Fig. 1). The three-dimensional structure of Cramoll 1, determined by crystallographic structure at 1.77 Å resolution, revealed that its topological architecture is essentially identical to Con A [10].



Figure 1 – Tertiary structure of Cramoll 1 monomer by ribbon representation. This picture was originated by MOLMOL script [11].

Indeed, the legume lectin fold has now been recognized as an important carbohydrate-binding motif that occurs, with different degrees of variations, in other proteins as well [12-15]. Although Cramoll 1 are closely related taxonomically with Con A, in immobilized form these two lectins bind different glycoproteins present in human plasma [16], and they also show differential binding to normal and transformed human mammary cells [17].

The specific properties of proteins can only be understood once a deep knowledge of the structure-function relationship is obtained from chemical or physical sources. One of the most active fields of research in this context has been the use of the optical properties of different chromophores to get information about protein conformations and elementary stages of their interactions [18]. In particular, the aminoacid tryptophan has been the standard probe of protein structure and dynamics [19], especially due to its efficient emission properties, in fluorescence. A combination of circular dichroism and fluorescence spectroscopy is often used to demonstrate whether denaturant-induced equilibrium (un)folding of proteins takes place via either a two-state mechanism or involves relatively stable protein folding intermediates.

There are few reports on the literature where the unfolding process of plant lectins has been investigated. In these reports it has been shown that lectins are usually very stable against several denaturing agents such as guanidine hydrochloride, urea and temperature [20-22]. Thus we decided to investigate the unfolding process of the Cramoll 1 through the use of urea and high hydrostatic pressure (HHP).

2. Materials and methods

2.1. Purification and Quantification of Cramoll 1

Cramoll 1 was isolated as described by [9]. Briefly, an extract of *C. mollis* seeds was separated into two fractions with ammonium sulfate, 0-40% and 40-60% saturation. The 40-60% fraction was dialyzed against 0.15 M NaCl (F2) overnight at 4-6 °C and affinity chromatographed on Sephadex G-75 using a 1.9 x 70.0 cm column equilibrated with 0.15 M NaCl. Elution was performed with 0.3 M D-glucose, and the protein was dialyzed against 10 mM sodium citrate phosphate buffer, pH 5.5 (F3). F3 was chromatographed on a 1.5 x 31.0 cm column containing 50 ml CM-cellulose (Sigma) equilibrated with 10 mM sodium citrate phosphate buffer, pH 5.5, and eluted with a 0-0.4 M NaCl linear gradient.

The concentration of Cramoll 1 was determined spectrophotometrically at 280 nm using an ϵ of 33,000 for the monomer ($M_r = 30,000$).

2.2. Spectroscopic measurements

The Trp and bis-ANS fluorescence spectra were recorded on an ISSK2 spectrofluorimeter. Tryptophan emission spectra were obtained by setting the excitation at 280 nm and collecting the emission in the 300 to 400 nm range. The bis-ANS spectra were recorded by exciting the sample at 360 nm and collecting emission from 400 to 600 nm. Bis-ANS was evaluated by area of intensity fluorescence in arbitrary units.

Trp fluorescence spectra were quantified as the center of spectral mass ν :

$$\nu = \sum \nu_i F_i / \sum F_i \quad (\text{Eq. (1)})$$

where F_i stands for the fluorescence emission at wavelength ν_i and the summation is carried out over the range of appreciable values of F .

The degree of dissociation (α) is related to (ν) by the expression:

$$\alpha = [(\nu_u) - (\nu_i)] / [(\nu_i) - (\nu_f)] \quad (\text{Eq. (2)})$$

where (ν_i) and (ν_f) are the initial and final values of center of spectral mass, respectively, while (ν_u) is the center of spectral mass in the presence of urea.

2.3. Urea induced unfolding

The urea-induced equilibrium unfolding curves were performed by incubating the protein (1 and 10 μ M) for 12 h in urea (0-8 M) in 25 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 7.0, at 25 °C.

2.4. High-hydrostatic pressure (HHP) induced unfolding

The high-pressure cell equipped with optical windows was purchased from ISS (ISS Inc., Champaign, IL). The temperature is controlled by a water bath.

The pressure was increased up to 3.1 kbar in steps of 0.35 bar where the spectroscopic measurements were performed. The kinetic experiments were performed by incubating the protein at 3.1 kbar at the desired temperature and collecting the emission spectrum in intervals of 10 min. The experiments were performed in 25 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 7.0 at 37 or 1 °C. When necessary, 3 M urea was included in the mentioned buffer to facilitate the unfolding reaction.

2.5. Circular dichroism measurements

Circular dichroism (CD) measurements were performed in a Jasco-715 spectropolarimeter (Jasco Corporation, Tokyo, Japan) using a 2.0-mm path-length quartz cuvette. For spectra determinations in the presence of the urea (0-8 M), 5 μ M of the Cramoll 1 was prepared in 10 mM phosphate buffer, 100 mM NaCl, pH 7.0. Data were averaged for 5 scans at a speed of 100 nm/min, collected in 0.1 nm steps. The baselines (buffer alone) were subtracted.

The degree of denaturation extracted from the CD measurements was calculated according to:

$$\alpha = [(\theta_u) - (\theta_i)] / [(\theta_i) - (\theta_f)] \quad (\text{Eq. (3)})$$

where (θ_i) and (θ_f) are the initial and final values of CD signals at 223 nm, respectively, while (θ_u) is the ellipticity at 223 nm in the presence of urea.

3. Results

3.1. Urea-induced unfolding of Cramoll 1

By the use of fluorescence and circular dichroism initially we decided to investigate the unfolding process of Cramoll 1 induced by urea and HHP. Since the legume lectins have been shown to be resistant proteins, Cramoll 1 was incubated in the presence of increasing concentrations of urea at pH 7.0 for 12 h. At this pH the protein is predominantly a dimer.

Figure 2 shows the changes in the center of spectral mass of trp emission that take place when 1 and 10 μ M of Cramoll 1 were incubated in the presence of increasing concentrations of urea at 25 °C. In the native protein, the trps of Cramoll 1 present a very blue shifted emission (336 nm) what suggests that they are buried in the protein core. As seen, by increasing the concentration of urea, there is a progressive shift in the maximum emission to the red what is compatible with the dissociation-denaturation of the protein. Up to 3 M urea the center of mass did not present any significant alteration suggesting that the protein is still in its native state. From 3 to 8 M urea, there was a transition and the center of mass shifted almost 17 nm to the red. Indeed, in the presence of 8 M urea the value achieved (353 nm) suggest fully exposition of these residues to the aqueous environment what is compatible with the complete denaturation of the protein. As expected, since the protein is a dimer, the process is concentration dependent and the experiment performed at 10 μ M of protein was displaced to higher urea concentrations (Fig. 2, open circles). The inset shows the fluorescence intensity

spectra of the protein in the 0, 3 and 8 M urea, where it is possible to see the mentioned shift in the center of mass.

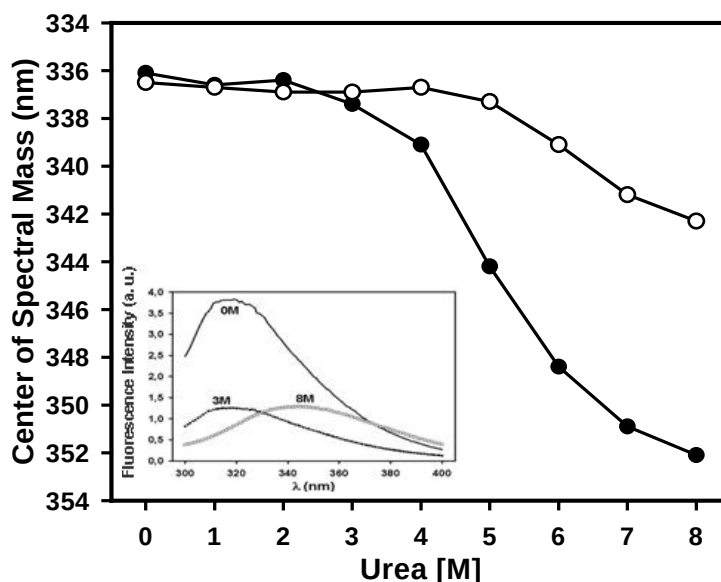


Figure 2 – The center of spectral mass of tryptophan as a function of urea concentration in 25 mM Tris-HCl, 0.1 M NaCl, pH 7.0 at 25 °C. The protein concentration was 1 (●) and 10 (○) μM. *Inset*: Trp fluorescence intensity (raw data) in 0, 3 and 8 M urea.

Bis-ANS has been used to map intermediate species present during the unfolding of several proteins [23,24]. This is because when free in solution bis-ANS fluoresces weakly; however, when it binds to hydrophobic surfaces in proteins its fluorescence enhances [25] allowing its use as a sensor of intermediate state present in the unfolding pathway of several proteins since this species exposes hydrophobic patches to the aqueous environment.

In its native state, Cramoll 1 binds weakly bis-ANS (inset Fig. 3). Interestingly, upon urea addition, the protein presented an enhanced capacity to bind this probe, mainly in the urea range of 2-5 M (Fig. 3). This result suggests that there is an intermediate species present during the unfolding process of Cramoll 1 that binds bis-ANS and was not revealed by the use of trp fluorescence. As expected, above 7 M urea there was no bis-ANS binding (see also the inset), what is compatible with the complete denaturation of the protein.

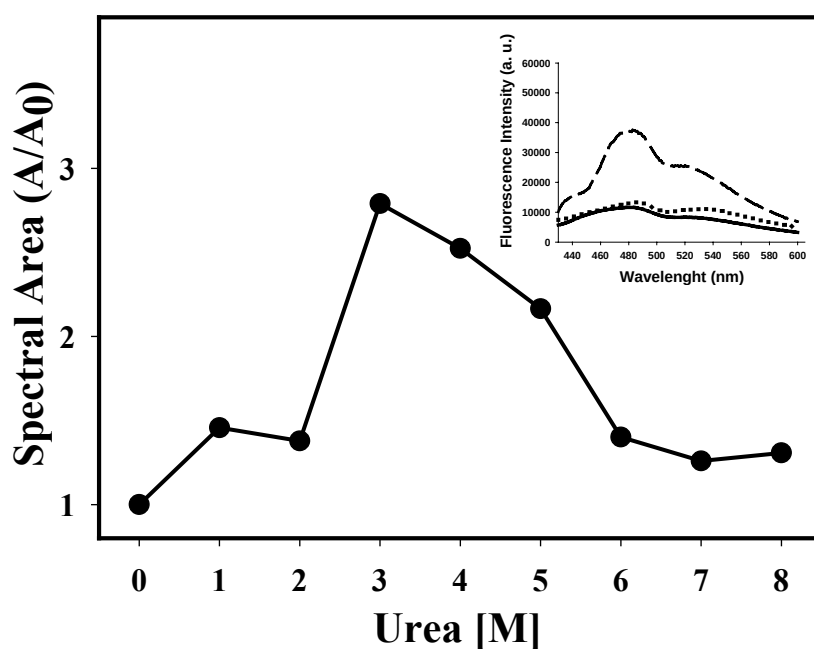


Figure 3 – bis-ANS spectral area as a function of urea concentration in 25 mM Tris-HCl, 0.1 M NaCl, pH 7.0 at 25 °C. The protein concentration was 1 μ M. Excitation was set at 360 nm and emission collected from 400 to 600 nm. *Inset*: bis-ANS fluorescence intensity (raw data).

Taken together these results suggest that the unfolding process of Cramoll 1 is a three-state process with the accumulation of an intermediate species in the urea range of 3-5 M. At 3 M urea, the center of mass of trp emission has changed very little to the red (336 nm; Fig. 2 filled circles) while the bis-ANS binding was maximal (Fig. 3) indicating that under this conditions the trps are in their native environment while there is a large hydrophobic segment of the protein already dismantled and exposed to the solvent.

Aiming to have insights into the secondary structural changes that take place upon urea-induced unfolding, circular dichroism (CD) measurements were performed (Fig. 4). The inset of figure 4 shows the far-UV CD spectra of Cramoll 1 in the presence of 0, 3 and 8 M urea at pH 7.0. The spectrum of the native protein shows a negative band at 223 nm which is characteristic of β -sheet rich proteins. It is interesting to note that in the presence of 3 M urea, there is very little changes in the CD spectrum what suggests that the secondary structure of Cramoll 1 is almost intact under this condition although the binding of bis-ANS was maximum (Fig. 3). In the presence of 8 M urea, although the some weak CD signal is still present, there is a massive loss of the secondary structure as expected, confirming its complete unfolding. Figure 4 shows the progressive loss in the ellipticity at 223 nm as a function of urea addition what is compatible with the loss of the secondary structure of the protein.

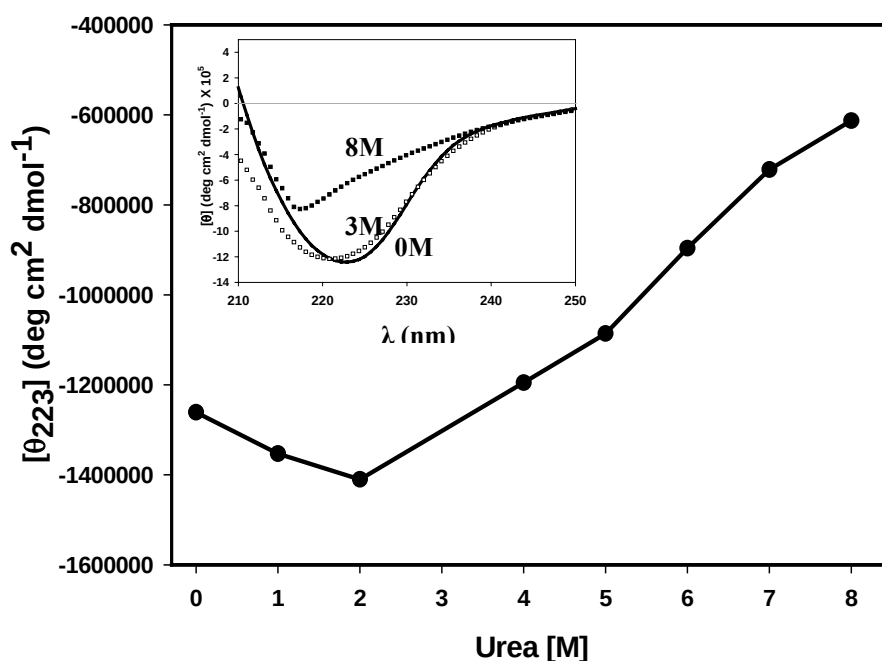


Figure 4 – Molar ellipticity values at 223 nm of the dimeric Cramoll 1 at 25 °C in 10 mM phosphate, 0.1 M NaCl, pH 7.0 in the presence of different concentrations of urea (0-8 M). The protein concentration was 5 µM. The spectra were taken in 2 mm path length cell using a scan speed of 100 nm min⁻¹, and averaged over five scans. *Inset*: The far-UV CD spectra of Cramoll 1 in 0 M (—), 3 M (□) and 8 M (•) urea.

Figure 5 shows the degree of denaturation of Cramoll 1 extracted from the data presented in Figure 4 (change in CD signal, secondary structure loss) and from change in the trp emission of the lectin at 5 µM (data not show). As seen, the two curves almost overlap but the tertiary structure loss occurred in smaller urea concentrations, as expected in reactions where intermediate species are present. This reinforces the presence of a relatively stable folding intermediate in the unfolding process of Cramoll 1. The intermediate is characterised by the loss of native tertiary interactions as its fluorescence emission intensity is decreased compared to that of the native state. The intermediate however, has an appreciable amount of secondary structure as shown by CD spectroscopy. In its most simple form, the unfolding pathway of Cramoll 1 can be described by the following three-state model, in which a relatively stable folding intermediate is present at equilibrium.



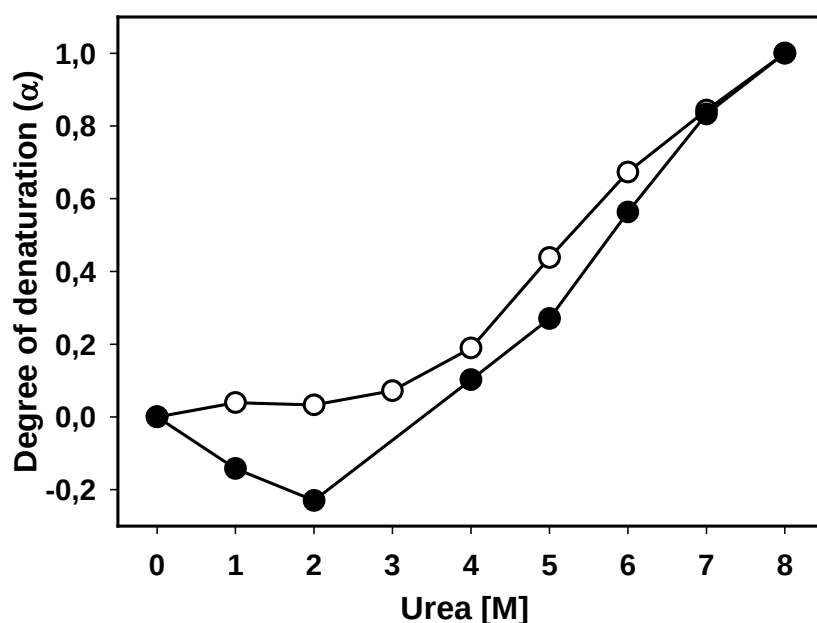


Figure 5 – Degree of denaturation of the tertiary (○) and secondary (●) structures as a function of urea concentrations calculated from equation 2 and 3 using fluorescence trp data and the CD signals. The protein concentration was 5 μ M.

3.2. Pressure-induced unfolding of Cramoll 1

It has been shown research that HHP is a gentle tool to dissociate-denature proteins [26,27]. Since Cramoll 1 is a dimeric protein at pH 7.0, we decided to use HHP to study its dissociation. However, since Cramoll 1 presented a slow denaturation process requiring several hours in the presence of urea, we decided to subject the protein to the maximum pressure achieved in our equipment and follow the changes in the center of mass of trp emission along time (Fig. 6). Initially, the protein was incubated at 3.1 kbar at 37 °C (hollow squares, Fig. 6) and the trp emission recorded. As seen, there was almost no change in the center of mass suggesting that the protein is pressure-resistant. As shown before, the combination of pressure and low temperature facilitates the dissociation process of several proteins since low temperatures weaken the hydrophobic interactions [28]. Thus we decided to combine HHP with low temperature (1 °C). As seen, even when HHP was applied at 1 °C (hollowed circles, Fig. 6), the center of mass shifted only 6 nm to the red suggesting partial denaturation of the protein under pressure at this temperature.

Once the combination of HHP and low temperature was not sufficient to promote the complete denaturation of the Cramoll 1, we decided to combine HHP with subdenaturing concentrations of urea (3 M). This approach has been used before to promote the dissociation of several proteins including virus [29]. However, when the protein is incubated in the

presence of 3 M urea along time, an intermediate species builds up as shown before in figure 3. Thus, to avoid the formation of the intermediate species observed in the presence of 3 M urea, we added 3 M urea to the protein and subjected it immediately to HHP. By using this approach we would have information about the dissociation-denaturation process of the native protein.

Figure 6 shows that when the protein is incubated in the presence of 3 M urea and immediately subjected to HHP, there is a progressive and relevant shift in the maximum emission of the trps to the red (10 nm) (filled squares, Fig. 6), this process requested 240 min. Then, we decided to combine HHP with 3M urea at 1 °C to force the complete denaturation of Cramoll 1 and as seen (filled circles Fig. 6), the denaturation process was complete and faster and the center of mass achieved after 100 min under pressure was similar to the one presented in the presence of 8 M urea (350 nm). The data obtained of association of 3 M urea and 3.1 kbar allowed to go with the kinetic unfolding (Fig. 6).

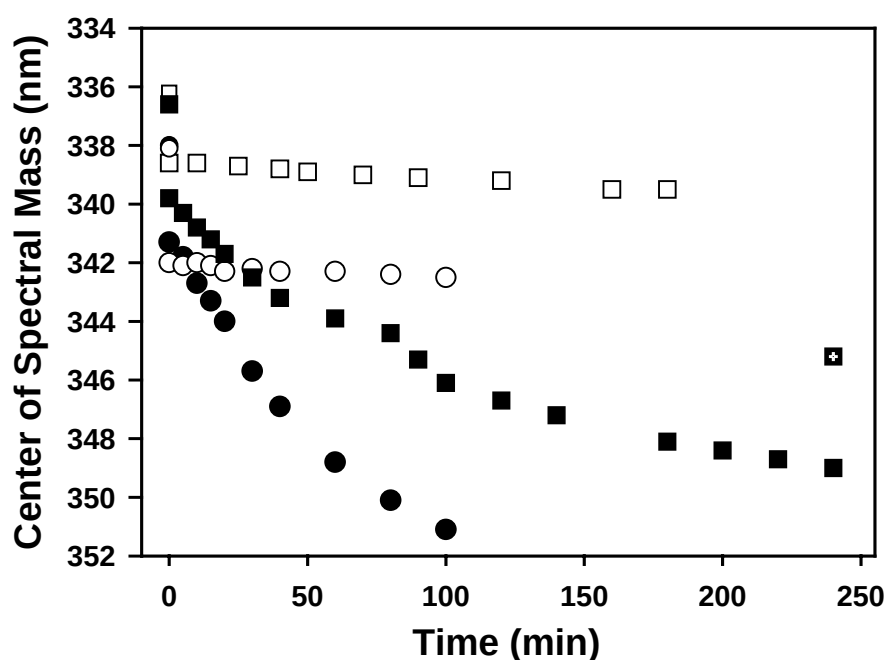


Figure 6 – Dissociation–denaturation of dimeric Cramoll by HHP (3.1 kbar) in the presence of the 0M (□,○) and 3M (■,●) urea at 37 or 1 °C, respectively, ■ represent the return to atm. The center of spectral mass of tryptophan was followed as a function of pressure at pH 7.0. Protein concentration was 1 μM in all cases. Excitation was set at 280 nm and emission collected from 300 to 400 nm.

In order to have additional insight about the tertiary structure of Cramoll 1 under HHP, we performed bis-ANS binding experiments as presented in figure 7. It is interesting to note that although the trps of Cramoll 1 are completely exposed to the solvent in the presence of 3

M urea after 200 min under 3.1 kbar at 37 °C, the protein was able to bind this probe suggesting that it is not fully unfolded even under these harsh conditions (Fig. 7 and inset). This result suggests that Cramoll 1 forms an intermediate species under HHP in the presence of urea. This intermediate has a conformation different from the one detected in the presence of 3 M urea, since the formed has its trp residues completely exposed to the solvent (350 nm), while in the later the trps are still buried in the protein core (336 nm).

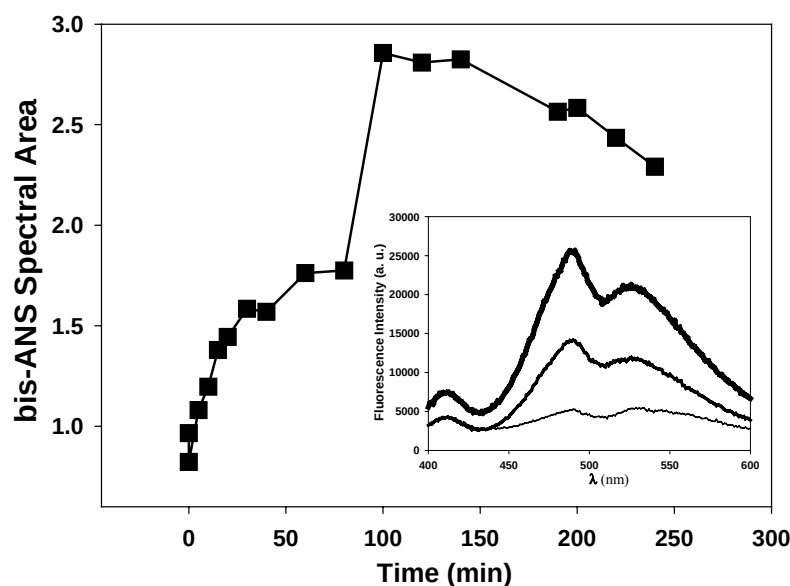


Figure 7 – Spectral area of bis-ANS binding Cramoll 1 as a function of time in presence of 3 M urea under 3.1 kbar in 25 mM Tris-HCl, 0.1 M NaCl, pH 7.0 at 37 °C. The protein concentration was 1 μ M. Excitation was set at 360 nm and emission collected from 400 to 600 nm. *Inset*: bis-ANS fluorescence intensity (raw data).

4. Discussion

Much of the current knowledge on the tertiary structural changes of proteins that take place when they undergo denaturation has been accumulated through the use of fluorescence emission, specifically from trp residues as well as from extrinsic probes such as ANS and their derivatives [30]. Circular dichroism also has been used extensively to furnish information about the secondary structure changes that take place upon protein denaturation. Cramoll 1 contains four residues of trp on each monomeric subunit. In the native Cramoll 1, the trps present a very blue-shifted emission (336 nm) what suggests that they are buried in the protein core. This observation is in agreement with their localization in the crystal structure of this protein as previously described [10]. This property makes these trps of Cramoll 1 ideal to

follow its unfolding since they can be a sensor of the tertiary structure loss (denaturation) of the protein.

In the present study we have used urea and HHP as perturbing tools to promote the complete denaturation of Cramoll 1. As seen, increasing the concentration of urea, there was a progressive shift in the center of spectral mass of the trps to the red, what is compatible with the dissociation-denaturation of the protein. Up to 3 M urea the center of mass did not present any significant alteration suggesting that the protein is still in its native state. From 3 to 8 M urea, there was a transition and the center of mass shifted almost 16 nm to the red. Indeed, in the presence of 8 M urea the value achieved (352 nm) suggest fully exposition of these residues to the aqueous environment what is compatible with the complete denaturation of the protein.

As expected, at pH 7.0, where the protein is a dimer, the dissociation-denaturation of Cramoll 1 induced by urea presented concentration dependence (Fig. 2) and the unfolding curve of the higher concentration used was displaced to higher urea concentrations. By circular dichroism, we observed a progressive decline in the signal at 223 nm (beta sheet signal) suggesting the loss of the secondary structure as the protein dissociates-unfolds. However, by using bis-ANS we were able to detect an intermediate species that accumulates in the presence of 3 M urea. We have called this species as I_{3M} and the urea-induced unfolding of Cramoll 1 can be described as:



The non-coincidence of the normalised fluorescence and far-UV CD data (Fig. 5) reinforces the idea of a relatively stable folding intermediate in the urea-induced unfolding of the protein. The trps in I_{3M} are in their native environment (336 nm), but displays a higher bis-ANS binding capacity. The intermediate however, has an appreciable amount of secondary structure as shown by CD spectroscopy. Folding intermediates with such characteristics have been observed for a few globular proteins and are called molten globules [31].

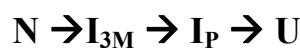
Another tool that was used in our studies was HHP. Since Cramoll 1 is a dimeric protein at pH 7.0, we decided to use HHP to study its dissociation-denaturation process. Pressure affects only the volume of the system under study [32]. In contrast, temperature denaturation involves changes in both the volume and the thermal energy. It is found for a large number of proteins that, while denaturation by pressure or chemical denaturants is reversible, temperature denaturation results in irreversible aggregation. In the case of Cramoll

1, pressure induced unfolding showed to be irreversible although aggregation was not observed under or after HHP. Further studies are required to address why this protein unfolds irreversibly and how this process can take place inside the plant cell in order to allow the formation of the native lectin. For the Cramoll 1, pressure had to be combined with subdenaturing concentration of urea to allow the complete unfolding of the protein. The majority of the dimeric protein studies thus far by HHP presented susceptibility to this tool. This suggests that the dimer of Cramoll is unexpectedly more stable than other dimers. This great stability of Cramoll 1 probably is associated with the fact that the protein experiences different stress conditions such as the high temperatures, low water content and the acidic pH found inside the vesicles where the lectin is stored [33].

Since Cramoll 1 presented a slow denaturation process requiring several hours in the presence of urea, we decided to subject the protein directly to the maximum pressure achieved in our equipment and follow the changes in the center of spectral mass (ν) of trp emission along time (Fig. 6). Even with long incubation times, the protein showed to be pressure-resistant. Then, we decided to combine HHP + low temperatures (1 °C) and again, although a little faster, the process was not completed. The only condition where Cramoll 1 was effectively dissociated by HHP was when 3 M urea was added to the buffer (Fig. 6 filled square). Subdenaturing concentrations of urea can be used to poise the system towards unfolding so that pressure denaturation is achieved within the experimentally accessible HHP range [34].

When we evaluated the bis-ANS binding of the protein under pressure in the presence of 3 M urea we observed that even after 100 min when the trps were already exposed (346 nm), the protein presented an enhanced capability to binding this probe. This observation suggests that Cramoll 1 is not completely unfolded under HHP. However, we have to assume that this intermediate species is different from the one observed in the presence of 3 M urea (I_{3M}), since the later species maintains its trp in the native environment. We called this new intermediate as I_P .

Taken together the data described here suggest that the unfolding process of Cramoll 1 can be summarized as:



Further studies are necessary to unravel the physiological implication of these intermediate species and how is the in vivo folding process of this lectin.

Acknowledgements

The authors are very grateful to MSc. Carolina Braga, MSc. Juliana Cortines, MSc. Mônica Freitas and Dr. Yraima Cordeiro from the Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil, who facilitate the use of the spectrofluorometer and circular dichroism. This paper was financially supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

- [1] I.J. Goldstein, R.C. Hughes, M. Monsigny, T. Osawa, N. Sharon What should be called a lectin?, *Nature* 285 (1980) 66.
- [2] N. Sharon, H. Lis, Legume lectins – a large family of homologous proteins, *FASEB J.* 4 (1990) 3198-3208.
- [3] C.A.S. Andrade, M.T.S. Correia, L.C.B.B. Coelho, S.C. Nascimento, N.S. Santos-Magalhães Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes, *International Journal of Pharmaceutics* 278 (2004) 435-445.
- [4] V. Lavastre, S. Chiasson, H. Cavalli, D. Girard Viscum album agglutinin-I (VAA-I) induces apoptosis and degradation of cytoskeletal proteins in human leukemia PLB-985 and X-CGD cells via caspases: Lamin B1 is a novel target of VAA-I, *Leukemia Research* 29 (2005) 1443-1453.
- [5] E.J. Soilleux, N. Coleman Transplacental transmission of HIV: a potential role for HIV binding lectins, *IJBCB* 35 (2003) 283-287.
- [6] I. Botos, A. Wlodawer Proteins that bind high-mannose sugars of the HIV envelope, *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 88 (2005) 233-282.
- [7] M.M. Prabu, K. Suguma, M. Vijayan Variability in quaternary association of proteins with the same tertiary fold: a case study and rationalization involving legume lectins, *Proteins: Structure, Function, and Genetics* 35 (1999) 58-69.
- [8] R. Loris, T. Hamelryck, J. Bouckaert and L. Wyns Legume lectin structure, *Biochim. Biophys. Acta*, 1383 (1998) 9-36.
- [9] M.T.S. Correia, L.C.B.B. Coelho Purification of a glucose/manose specific Lectin, isoforma 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). *Applied Biochemistry and Biotechnology* 55 (1995) 261-273.
- [10] G.A. de Souza, P.S.L. Oliveira, S. Trapani, A.C.O. Santos, J.C. Rosa, H.J. Laure, V.M. Faça, M.T.S. Correia, G.A. Tavares, G. Oliva, L.C.B.B. Coelho and L.J. Greene Amino acid sequence and tertiary structure of *Cratylia mollis* seed lectin, *Glycobiology* 13 (2003) 961-972.

- [11] R. Koradi, M. Billeter, K. Wüthrich MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *Journal of Molecular Graphics* 14 (1996) 51-55.
- [12] D.-I. Liao, G. Kapadia, H. Ahmed, G.R. Vasta, O. Herzberg Structure of S-Lectin, a developmentally-regulated vertebrate beta-galactoside binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 91 (1994) 1428-1432.
- [13] S. Crennel, E. Garman, G. Laver, E. Vimr, G. Taylor Crystal structure of *Vibrio cholerae* neuraminidase reveals dual lectinlike domains in addition to the catalytic domain. *Structure* 2 (1994) 535-544.
- [14] Y.D. Lobsanov, M.A. Gitt, H. Leffler, S.H. Barondes, J.M. Rini X-ray crystal structure of the human dimeric S-lac lectin, L-14-II, in complex with lactose at 2.9 Å resolution. *J Biol. Chem.* 268 (1993) 27034–27038.
- [15] J. Emsley, H.E. White, B.P. O'Hara, G. Oliva, N. Srinivasan, I.J. Tickle, T.L. Blundell, M.B. Pepys, S.P. Wood. Structure of pentameric human serum amyloid P component, *Nature* 367 (1994) 338-345.
- [16] V.L.M. Lima, M.T.S. Correia, Y.M.N. Cechinel, C.A. Sampaio, J.S. Owen, L.C.B.B. Coelho Immobilized *Cratylia mollis* lectin as potential matrix to isolate plasma glycoproteins including lecithin cholesterol acyltransferase. *Carbohydrate Polymers* 31 (1997) 27-32.
- [17] E.I. Beltrão, M.T.S. Correia, J. Figueredo-Silva, L.C.B.B. Coelho Binding evaluation of Isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to human mammary tissues. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 74 (1998) 125-134.
- [18] A.P. Demchenko Ultraviolet Spectroscopy of Proteins, Springer-Verlag, Berlin, (1986).
- [19] L.M. Saviotti, W.C. Galley *Proc. Natl. Acad. Sci.* 71 (1974) 4154.
- [20] A. Chatterjee, D.K. Mandal Quaternary association and reactivation of dimeric concanavalin A, *International Journal of Biological Macromolecules* 35 (2005) 103-109.
- [21] S. Biswas, A.M. Kayastha, Unfolding and refolding of Leuoagglutinin (PHA-L), an oligomeric lectin from kidney beans (*Phaseolus vulgaris*), *Biochimica et Biophysica Acta*, 1674 (2004) 40-49.
- [22] V.R. Srinivas, G.B. Reddy, N. Ahmad, C.P. Swaminathan, N. Mitra, A. Surolia Legume lectin family, the 'natural mutants of the quaternary state', provide insights into the relationship between protein stability and oligomerization. *Biochimica et Biophysica Acta* 1527 (2001) 102-111.
- [23] M.M Iglesias, M.T. Elola, V. Martinez, N. Fink, C. Wolfenstein-Todel Identification of an equilibrium intermediate in the unfolding process of galectin-1, wich retains its carbohydrate-binding specificity, *Biochimica et Biophysica Acta* 1648 (2003) 164-173.
- [24] A. Naeem, A. Khan, R.H. Khan Partially folded intermediate state of concanavalin A retains its carbohydrate specificity, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 331 (2005) 1284-1294.

- [25] J. Salvik *Biochimica et Biophysica Acta* 694 (1982).
- [26] M. Gross, R. Jaenicke Proteins under pressure, *Eur. J. Biochem.* 221 (1994) 617-630.
- [27] J.L. Silva, G. Weber Pressure stability of proteins, *Annu. Rev. Phys. Chem.* 44 (1993) 89-113.
- [28] D. Foguel, G. Weber Pressure-induced dissociation and denaturation of allophycocyanin at subzero temperatures, *JBC* 270 (1995) 28759-28766.
- [29] H. Herberhold, C.A. Royer, R. Winter Effects of chaotropic and kosmotropic cosolvents on the pressure-induced unfolding and denaturation of proteins: an FT-IR study on staphylococcal nuclease, *Biochemistry* 43 (2004) 3336-3345.
- [30] J.C. Croney, D.M. Jameson, R.P. Learmonth Fluorescence spectroscopy in biochemistry: teaching basic principles with visual demonstration, *Biochemistry and Molecular Biology Education* 29 (2001) 60-65.
- [31] O.B. Ptitsyn The molten globule state. In: Creighton, T.E. (Ed.), *Protein Folding*. W.H. Freeman and Company, New York, (1992) 243-300.
- [32] G. Weber, H.G. Drickamer The effect of high pressure upon proteins and other biomolecules, *Q. Rev. Biophys* 16 (1983) 89-112.
- [33] A.C.O. Santos, C.A. Peixoto, L.C.B.B. Coelho Ultrastructural analysis and immunocytochemical localization of isolectins in *Cratylia mollis* seeds, *Micron* 35 (2004) 613-618.
- [34] S. Parrett, J.M. Zhou Expanding the pressure technique: insights into protein folding from combined use of pressure and chemical denaturants, *Biochimica et Biophysica Acta* 1595 (2002) 210-223.

Abstract

Large variability in quaternary association resulting from small alterations in essentially the same tertiary structure is a property exhibited specially by legume lectins, generating their carbohydrate specificity. Cramoll 1 is a major lectin isolated from *Cratylia mollis* seeds, specific for mannose/glucose and presents assemblies's patterns in dimer or tetramer. Interesting results (differential binding to transformed cells, antitumor activity, mitogenic potential,) have been the major stimulus for the present study. Using fluorescence spectroscopy and circular dichroism (CD) new insights about Cramoll 1 unfolding process induced by urea and high hydrostatic pressure (HHP) were obtained. At pH 7.0, the tryptophan center of mass did not present any significant alteration up to 3 M urea suggesting that the protein is still in its native state. As expected, since the protein is a dimer, the process present concentration dependence. Interestingly, the protein presented an enhanced capacity to bind bis-ANS, mainly in the urea range of 3-5 M. In the presence of 3 M urea, there are very little changes in the CD spectrum what suggests that the secondary structure of Cramoll 1 is almost intact under this condition. Taken together these results indicate that the unfolding process of Cramoll 1 is a three-state process with the accumulation of an intermediate species (called I_{3M}) in the presence of 3 M urea. On the other hand, 3.1 kbar at 37 and 1 °C there was almost no changed the tryptophan center of mass suggesting that the protein is pressure-resistant. The only condition where Cramoll 1 was effectively dissociated by HHP was when 3 M urea was added to the buffer. When we evaluated the bis-ANS binding of the protein under pressure in the presence of 3 M urea we observed that even after 100 min when the trps were already exposed, the protein presented an enhanced capability to binding this probe. This observation suggests that Cramoll 1 is not completely unfolded under HHP. However, we have to assume that this intermediate species (I_P) is different from the one observed in the presence of 3 M urea (I_{3M}), since the later species maintains its trp in the native environment. So, the data described here suggest that the unfolding process of Cramoll 1 can be summarized as: $N \rightarrow I_{3M} \rightarrow I_P \rightarrow U$.

OUTROS RESULTADOS

I.I Desnaturação Térmica de Cramoll 1

Para algumas lectinas, o modelo de desnaturação por agentes químicos é diferente do proposto para desnaturação térmica. Em certos casos, a desnaturação induzida por temperatura ocorre com a formação de agregados insolúveis.

O centro de massa de Cramoll 1 se manteve estável em torno de 335 nm quando esta foi aquecida até 60 °C (não mostrado), mostrando mais uma vez, uma grande estabilidade desta proteína. Após essa temperatura, houve um aumento dos valores de espalhamento de luz, demonstrando a formação de agregados insolúveis em decorrência do aumento de temperatura em pH 7,0 (Figura 17), mesmo numa baixa concentração de proteína (1 μ M) como usado neste experimento. A formação de agregados protéicos é um fato bem documentado (WILHELMUS *et al.*, 2006) e tem sido reportado em algumas doenças neurodegenerativas como Alzheimer, por exemplo. As formas agregadas são originadas a partir de interações errôneas de estruturas locais de intermediários do enovelamento. Estudos de ligação de bis-ANS a Cramoll 1, no processo de desnaturação térmica, possibilitarão a detecção de novas espécies intermediárias presentes no caminho de desenovelamento dessa lectina.

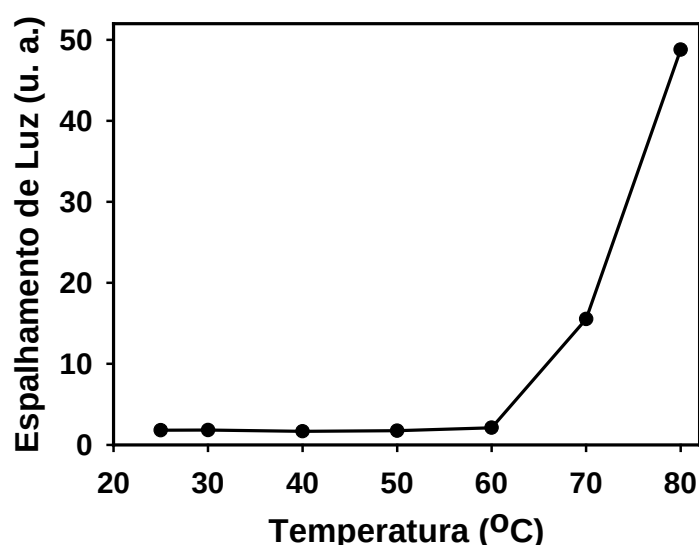


Figura 17 – Espalhamento de luz no processo de desnaturação térmica de Cramoll 1. A concentração de proteína foi 1 μ M. A excitação foi ajustada em 320 nm e a emissão coletada entre 315 e 325 nm.

Espectros de CD corroboram com a proposta de estabilidade térmica de Cramoll 1. Como visto na figura 18, a estrutura secundária continua organizada até 70 °C em pH 7,0. Uma súbita e abrupta perda dessa estrutura ocorreu quando o subsequente aumento de 70 para 80 °C. Como apresentado por SRINIVAS e colaboradores (2001), as lectinas que apresentam modelo de dimerização do tipo ‘canônico’ (semelhante a Con A e Cramoll 1) se desenovelam como se fossem uma única entidade molecular, embora apresentem interações não-covalentes entre os monômeros. A extensão das interações entre os monômeros parece ser responsável pela sua alta cooperatividade no desenovelamento induzido por temperatura.

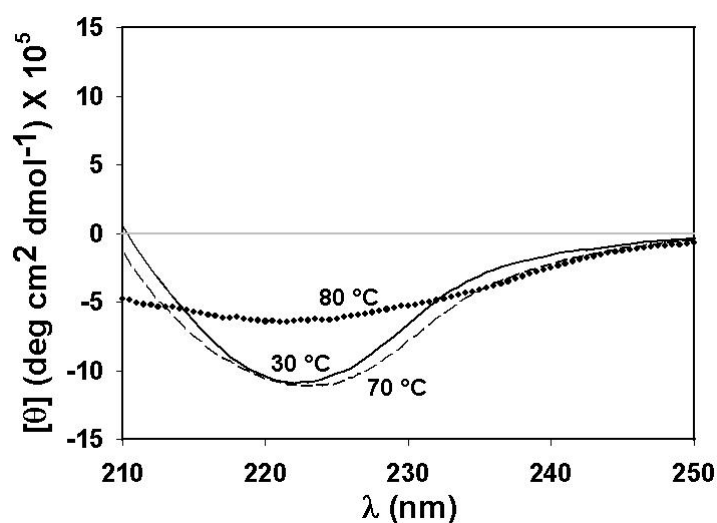


Figura 18 – Espectros de CD do dímero de Cramoll 1 em tampão fosfato de sódio 10 mM contendo NaCl 0,1 M, pH 7,0 em 30 °C (—), 70 °C (---) and 80 °C (●). A concentração de proteína foi 5 µM. Uma média de 5 espectros foi obtida a partir de um caminho ótico de 2 mm usando uma velocidade de 100 nm min⁻¹.

Esses resultados ajudam a explicar a permanência de atividade hemaglutinante de Cramoll 1 visualizada por CORREIA e COELHO (1995) em altas temperaturas (80 °C), uma vez que a estrutura da proteína é mantida nessa mesma faixa de temperatura.

I.II Estabilidade de Cramoll 1 em diferentes pH

Soluções de Cramoll 1 foram feitas em diferentes tampões em uma faixa de pH de 1 a 12. Como mostrado na figura 19, a lectina foi estável em uma ampla faixa de pH (1 a 10). De pH 1 até 10, o centro de massa dos trps desviou apenas 4 nm para o vermelho sugerindo uma alta resistência desta proteína também a variações de pH. Em pH acima de que 10, observamos um desvio do máximo da emissão dos trp de aproximadamente 10 nm, sugerindo perda de estrutura terciária.

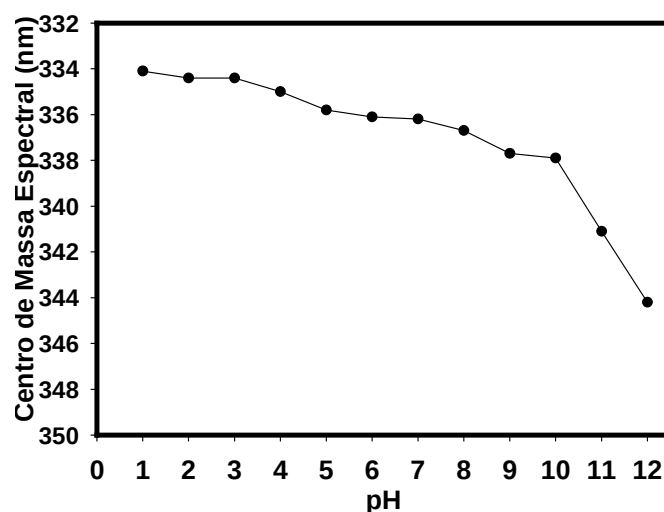


Figura 19 – Estabilidade de Cramoll 1 a diferentes pH. Os tampões usados foram glicina-HCl (pH 1-3), acetato (pH 4), citrato fosfato (pH 5), fosfato de sódio (pH 6 e 7), tris-HCl (pH 8 e 9), glicina-NaOH (pH 10-12) todos a 25mM contendo NaCl 0,1 M. A concentração de proteína foi 1 μ M. A excitação foi ajustada em 280 nm e emissão coletada de 300-400 nm. O experimento foi feito em 25 °C.

I.III Comparação entre as isolectinas 1; 3; 1,4 de *Cratylia mollis*

As isolectinas 1 e 3 de *C. mollis* e a preparação contendo uma mistura das isoforma 1 e 4 (Cramoll 1,4) apresentaram comportamentos similares de desnaturação induzida por uréia avaliada por fluorescência intrínseca e extrínseca (Figura 20 A e B, respectivamente), grau de desnaturação (Figura 21) e de resistência à pressão (Figura 22).

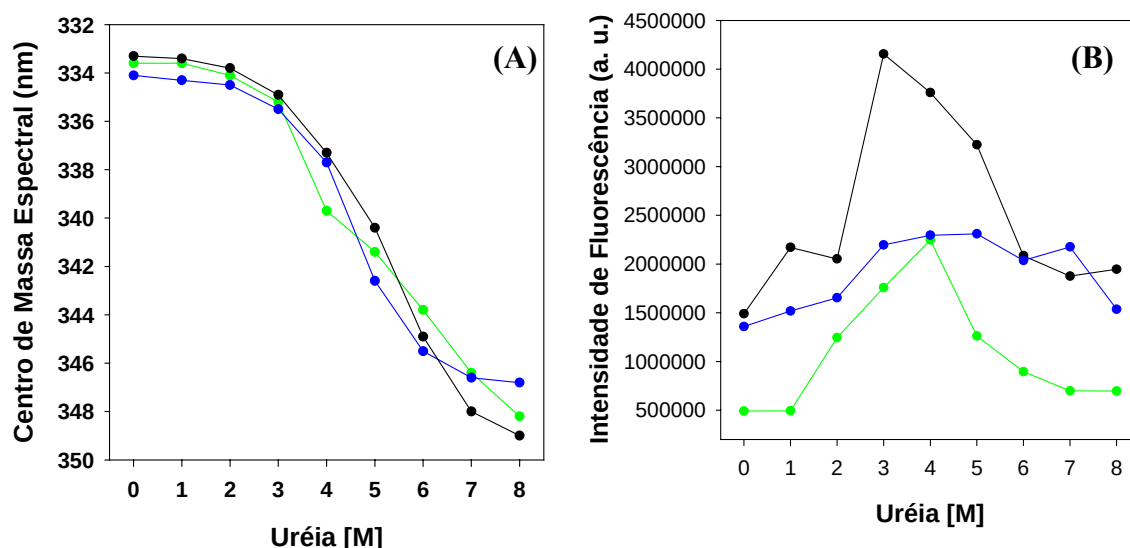


Figura 20 – Fluorescência intrínseca (A) e extrínseca (B) das isoformas 1, 3 e 1,4 de lectina de *Cratylia mollis*. (●) Cramoll 1, (●) Cramoll 3, (●) Cramoll 1,4. A concentração de proteína utilizada foi 1 μ M.

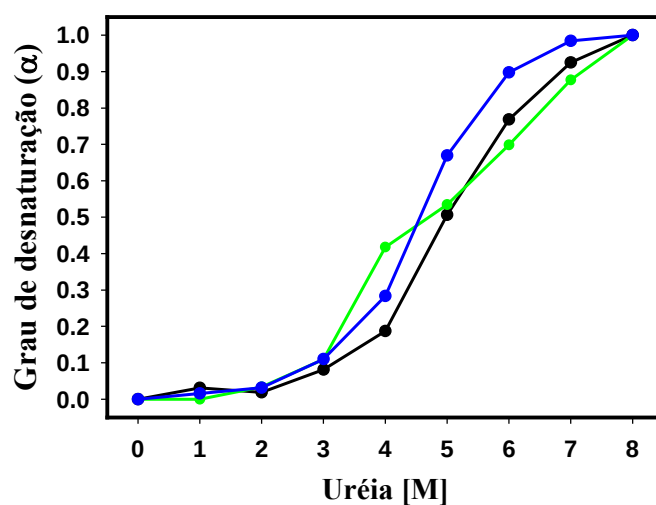


Figura 21 – Grau de desnaturação de estrutura terciária das isoformas de lectinas de sementes de *C. mollis*: Cramoll 1 (●), Cramoll 3 (●) e Cramoll 1,4 (●) em função da concentração de uréia. Esse coeficiente foi calculado a partir da equação 2 do artigo, utilizando dados de centro de massa de trp. A concentração de proteínas foi de 1 μ M em todos os casos.

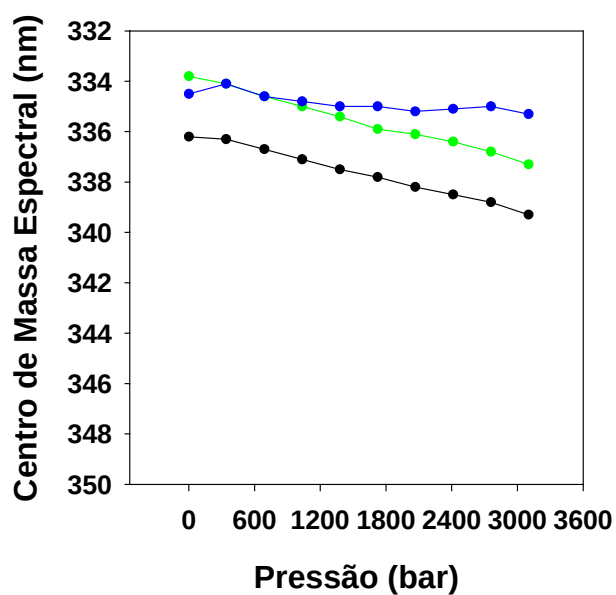


Figura 22 – Comparação da estabilidade das isoformas de lectinas de sementes de *C. mollis* à pressão hidrostática. (●) Cramoll 1, (●) Cramoll 3, (●) Cramoll 1,4. A concentração das proteínas foi 1 μ M. A excitação foi ajustada em 280 nm e a emissão foi coletada de 300 a 400 nm.

I.IV.I Aglutinação de *Trypanosoma cruzi* por Cramoll 1,4

Trypanosoma cruzi é um protozoário parasita homoflagelado transmitido por insetos (da família Reduviidae) para humanos e outros mamíferos. Ele é o agente etiológico da doença de Chagas, um dos maiores problemas de saúde pública na América do Sul e Central.

É sabido que a forma tripomastigota apresenta a membrana coberta por glicoinositolfosfolídeos e mucinas ancoradas por glicofosfatidilinositol (GPI) (FERGUSON, 1999) expressando resíduos de GlcNAc (HICKS *et al.*, 2000). De fato, essas glicoproteínas ancoradas na membrana do *T. cruzi* têm sido descritas como alvo para atuação de agentes líticos, pelo fato de que esses apresentam domínios com propriedade lectínica (FONTT *et al.*, 2002).

Ensaio iniciais revelaram que, diferentemente do descrito para outras moléculas com atividade lectínica, Cramoll 1,4 não foi capaz de lisar as formas tripomastigotas de *T. cruzi* mas favoreceu uma forte aglutinação das células parasitas (Figura 23).

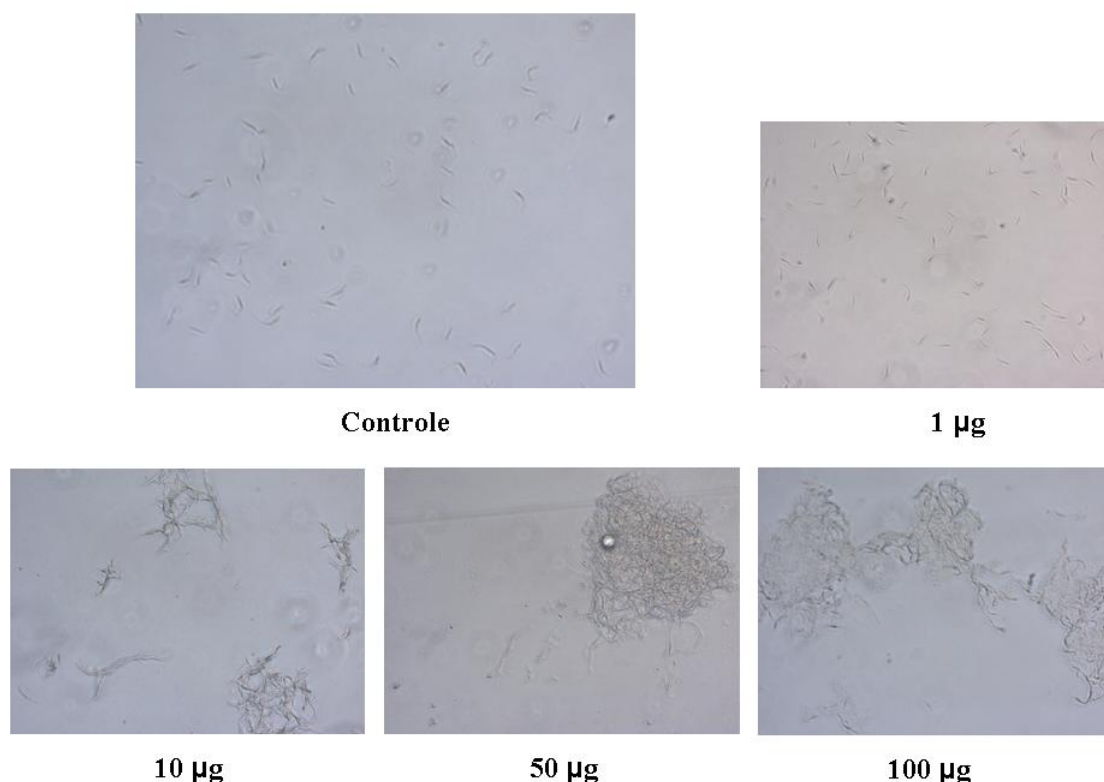


Figura 23 – Aglutinação de formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* após incubação com 1, 10, 50 e 100 µg de Cramoll 1,4.

Esses resultados podem ser parcialmente explicados pela exclusiva atividade lectínica de Cramoll 1,4 a despeito de propriedades adicionais de ativação de mecanismos de defesa nas células infectadas. Esses estudos são bastante promissores e serão continuados durante o doutorado.

I.IV.II Metodologia do ensaio de aglutinação

Brevemente, 85 µL microlitros da suspensão de formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* foram misturados com 10 µL de Cramoll 1,4 (1, 10, 50 e 100 µg) e 5 µL de LDL em placas de microtitulação e incubadas em 37 °C e 5% de CO₂ por 3 horas (FONNT *et al.*, 2002). A aglutinação foi quantificada pela contagem de parasitas na câmara de Neubauer ou pela visualização em microscópio.

CONCLUSÕES

Os sítios hidrofóbicos onde estão localizados os triptofanos de Cramoll 1 foram estáveis a concentrações de uréia até 3 M.

O uso de bis-ANS revelou uma conformação intermediária com exposição de sítios hidrofóbicos em 3 M de uréia, chamado de I_{3M} .

Na faixa de uréia onde havia um afrouxamento da estrutura terciária, a estrutura secundária de Cramoll 1 se manteve preservada, o que é característico de estados intermediários.

A perda de estrutura terciária e secundária no desenovelamento de Cramoll 1 induzido por uréia ocorreu quase que em concomitância, com um leve favorecimento da manutenção da estrutura secundária.

O uso de altas HHP mesmo quando associado a baixas temperaturas não foi hábil de dissociar o dímero de Cramoll 1.

A única condição em que HHP foi capaz de desenovelar Cramoll 1 foi quando 3 M de uréia foi adicionado ao tampão, sendo essa uma reação irreversível.

A 1 °C a reação de desnaturação de Cramoll 1 por HHP + uréia aconteceu mais rapidamente do que a 37 °C.

Mais uma vez, a sonda de ANS revelou um estado intermediário. Esse intermediário apareceu quando Cramoll 1 foi submetida a uma pressão de 3,1 kbar na presença de 3 M de uréia após 100 min, sendo chamado de I_P , momento em que os triptofanos da lectina estavam já expostos ao solvente.

Interpretados em conjunto, os resultados de desenovelamento de Cramoll 1 induzidos por uréia e HHP sugerem que esse processo passa por dois intermediários (I_{3M} e I_P).

O centro de massa de triptofanos de Cramoll 1 se manteve estável em temperaturas de até 60 °C, após essa temperatura, a proteína começou a formar agregados.

Espectros de dicroísmo circular mostraram que a estrutura secundária de Cramoll 1 é preservada mesmo quando a molécula é mantida a 70 °C, perdendo abruptamente a sua estrutura após essa temperatura.

Cramoll 1 foi estável a uma ampla faixa de pH (1 a 10), só perdendo a sua estrutura em valores de pH muito básicos.

As isolectinas 1 e 3 de *C. mollis* (Cramoll 1 e Cramoll 3) e uma preparação contendo uma mistura das isoformas 1 e 4 (Cramoll 1,4) apresentaram comportamentos similares de desenovelamento por uréia e HHP.

Cramoll 1,4 foi capaz de promover aglutinação de formas tripomastigotas de *T. cruzi*.

REFERÊNCIAS

Referências Bibliográficas

- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J. RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. Protein Function. In: *Molecular Biology of the Cell*. Nova Iorque: Garland Publishing, 3^a ed., p. 213- 215, 1994.
- ANFINSEN, C. B. Principles that govern the folding of protein chains. *Science*, v. 181, p. 223-230, 1973.
- BAI, Y. Energy barriers, cooperativity, and hidden intermediates in the folding of small proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, v. 340, p. 976-983, 2006.
- BARBOSA, M. A.; GARCIA, L. G.; PEREIRA DE ARAUJO, A. F. Entropy reduction effect imposed by hydrogen bond formation on protein folding cooperativity: Evidence from a hydrophobic minimalist model. *Physical Review. E, Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*, v. 72, p.051903, 2005.
- BARONDES, S. H. Lectins: their múltiple endogenous cellular function. *Annual Review of Biochemistry*, v. 50, p. 207-231, 1981.
- BELTRÃO, E. I.; CORREIA, M. T. S.; FIGUEREDO-SILVA, J.; COELHO, L. C. B. B. Binding evaluation of Isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to human mammary tissues. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 74, p. 125-134, 1998.
- BOTOS, I.; WLODAWER, A. Proteins that bind high-mannose sugars of the HIV envelope. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, v. 88, p. 233–282, 2005.
- BUTS, L.; DAO-THI, M.-H.; LORIS, R.; WYNS, L.; ETZLER, M.; HAMELRYCK, T. Weak protein-protein interactions in lectins: the crystal structure of a vegetative lectin from the legume *Dolichos biflorus*. *Journal of Molecular Biology*, v. 309, p. 193-201, 2001.
- CAMPOS, L. A.; BUENO, M.; LOPEZ-LLANO, J.; JIMÉNEZ, M. A.; SANCHO, J. Structure of stable protein folding intermediates by equilibrium ϕ -analysis: the apoflavodoxin thermal intermediate. *Journal of Molecular Biology*, v. 344, p. 239-255, 2004.
- CAMPOS, L. A.; SANCHO, J. The active site of pepsin is formed in the intermediate conformation dominant at mildly acidic pH. *FEBS Letters*, v. 538, p. 89-95, 2003.
- CHANG, T. J.; ZHU, Z. Plant lectin and its application in insect-resistant plant genetic engineering. *Yi Chuan.*, v. 24, p. 493-500, 2002.

- CHATTERJEE, A.; MANDAL, D. K. Quaternary association and reactivation of dimeric concanavalin A. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 35, p. 103-109, 2005).
- CHEN, H. Y.; LIU, F. T.; YANG, R. Y. Roles of galectin-3 in immune responses. *Archivum Immunologiae et therapiae experimentalis*, v. 53, p. 497-504, 2005.
- COELHO, L. C. B. B.; DA SILVA, M. B. R. Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. *Phytochemical Analysis*, v. 11, p. 1-6, 2000.
- CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B. Purification of a glucose/manose specific Lectin, isoforma 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 55, p. 261-73, 1995.
- CRONEY, J. C.; JAMESON, D. M.; LEARMONTH, R. P. Fluorescence spectroscopy in biochemistry: teaching basic principles with visual demonstrations. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 29, p. 60-65, 2001.
- DAMASCHUN, G.; GERNAT, C.; DAMASCHUN, H.; BYCHKOVA, V. E.; PTITSYN, O. B. Comparison of intramolecular packing of a protein in native and 'molten globule' states. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 8, p. 226-230, 1986.
- DANIEL, E.; WEBER, G. Cooperative effects in binding by bovine serum albumin. I. The binding of 1-anilino-8-naphthalene-sulfonate. Fluorimetric titrations. In: *Cooperative Effects in binding Albumin*, v. 5, p. 1893-1900, 1966.
- DAVIES, H.; DICKS, E.; STEPHENS, P.; COX, C.; TEAGUE, J.; GREENMAN, C.; BIGNELL, G.; O'MEARA, S.; EDKINS, S.; PARKER, A.; STEVENS, C.; MENZIES, A.; BLOW, M.; BOTTOMLEY, B.; DRONSFIELD, M.; FUTREAL, P. A.; STRATTON, M. R.; WOOSTER, R. High throughput DNA sequence variant detection by conformation sensitive capillary electrophoresis and automated peak comparison. *Genomics*, Article in Press, Corrected Proof, 2006.
- DHUNA, V.; BAINS, J. S.; KAMBOJ, S. S.; SINGH, J.; KAMBOJ, S.; SAXENA, A. K. Purification and characterization of a lectin from *Arisaema tortuosum* Schott having in-vitro anticancer activity against human cancer cell lines. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, v. 38, p. 526-532, 2005.
- DIXON, H. B. F. Defining a lectin. *Nature*, v. 292, p. 192, 1981.
- DOBSON, C. M. Protein folding and misfolding. *Nature*, v. 426, p. 884-890, 2003.
- DOBSON, C. M., EVANS, P. A., RADFORD, S. E. Understanding how proteins fold-the lysozyme story so far. *Trends in Biochemical Science*, v. 19, p. 31-37, 1994.
- DOLGIKH, D.A.; GILMANSHIN, R. I.; BRAZHNIKOV, E. V.; BYCHKOVA, V. E.; SEMISOTNOV, G. V.; VENYAMINIV, S. Y.; PTITSYN, O. B. Alpha-Lactalbumin: compact state with fluctuating tertiary structure? *FEBS Letters*, v. 136, p. 311-315, 1981.

EFTINK, M. R. Fluorescence quenching reactions. In: *Biophysical and Biochemical Aspects of Fluorescence Spectroscopy* (Dewey, T. G. ed.). Nova Iorque: Plenum Press, p. 1-41, 1991.

ETZLER, M. E. From structure to activity: new insights into the functions of legume lectins. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, v. 53, p. 247-255, 1998.

FARRUGGIA, G.; IOTTI, S.; PRODI, L.; MONTALTI, M.; ZACCHERONI, N.; SAVAGE, P. B.; TRAPANI, V.; SALE, P.; WOLF, F. I. 8-Hydroxyquinoline Derivatives as Fluorescent Sensors for Magnesium in Living Cells. *Journal of the American Chemical Society*, v. 128, p. 344-350, 2006.

FERGUSON, M. A. The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research. *Journal of Cell Science*, v. 112, p. 2799-2809, 1999.

FONTT, E. O.; BESCHIN, A.; VAN DIJCK, E.; VERCRUYSSSE, V.; BILEJ, M.; LUCAS, R.; DE BAETSELIER, P.; VRAY, B. *Trypanosoma cruzi* is lysed by coelomic cytolytic factor-1, an invertebrate analogue of tumor necrosis factor, and induces phenoloxidase activity in the coelomic fluid of *Eisenia foetida foetida*. *Developmental and Comparative Immunology*, v. 26, p. 27-34, 2002.

GE, X.; TOLOSA, L.; RAO, G. Dual-labeled glucose binding protein for ratiometric measurement of glucose. *Analytical Chemistry*, v. 76, p. 1403-1410, 2004.

GOLDSTEIN, I. J.; HUGHES, R. C.; MONSIGNY, M.; OSAWA, T.; SHARON, N. What should be called a lectin? *Nature*, v. 285, p. 66, 1980.

GOLDSTEIN, I. J.; PORETZ, R. D. Isolation, physicochemical characterization, and carbohydrate-binding specificity of lectins. In: LIENER, I. E.; SHARON, N.; GOLDSTEIN, I. J. (Eds) *The Lectins: properties, functions, and applications in biology and medicine*. Nova Iorque: Academic Press, p.33-248, 1986.

GOMES, A.; FERNANDES, E.; LIMA, J. L. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v. 65, p. 45-80, 2005.

GRANELLI-PIPERNO, A.; SHIMELIOVICH, I.; PACK, M.; TRUMPFHELLER, C.; STEINMAN, R. M. HIV-1 Selectively infects a subset of nonmaturing BDCA1-positive dendritic cells in human blood. *Journal of Immunology*, v. 176, p. 991-998, 2006.

GREENFIELD, N. J. Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data. *Analytical Biochemistry*, v. 235, p. 1-10, 1996.

GUIMARÃES-GOMES, V.; OLIVEIRA-CARVALHO, A. L.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M.; DUTRA, D. L. S.; PUJOL-LUZ, M.; CASTRO, H. C.; LEE HO, P.; ZINGALI, R. B. Cloning, characterization, and structural analysis of a C-type lectin from *Bothrops insularis* (BiL) venom. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 432, p. 1-11, 2004.

HAMELRYCK, T. W.; MOORE, J. G.; CHRISPEELS, M. J.; LORIS, R.; WYNS, L. The role of weak protein-protein interactions in multivalent lectin-carbohydrate binding: crystal structure of cross-linked FRIL. *Journal of Molecular Biology*, v. 299, p. 875-883, 2000.

HICKS, S. J.; THEODOROPOULOS, G.; CARRINGTON, S. D.; CORFIELD, A. P. The role of mucins in host-parasite interactions. Part I – protozoan parasites. *Parasitology Today*, v. 16, p. 476-481, 2000.

HUBNER, I. A.; EDMONDS, K. A.; SHAKHNOVICH, E. I. Nucleation and the transition state of the SH3 domain. *Journal of Molecular Biology*, v. 349, p. 424-434, 2005.

JABLOŃSKI, A. Über den Mechanismus der Photolumineszenz von Farbstoffphosphoren. *Zeitschrift für Physik*, v. 94, p. 38-46, 1935.

KAMIYA, Y.; YAMAGUCHI, Y.; TAKAHASHI, N.; ARATA, Y.; KASAI, K.; IHARA, Y.; MATSUO, I.; ITO, Y.; YAMAMOTO, K.; KATO, K. Sugar-binding properties of VIP36, an intracellular animal lectin operating as a cargo receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 280, p. 37178-37182, 2005.

KASHA, M. Characterization of electronic transitions in complex molecules. *Discussions of Faraday Society*, v. 9, p. 14-19, 1950.

KELLY, S. M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1751, p. 119-139, 2005.

KENNEDY, J. F.; PAIVA, P. M. G.; CORREIA, M. T. S.; CAVALCANTI, M. S. M; COELHO, L. C. B. B. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. *Carbohydrates Polymers*, v. 26, p. 219-230, 1995.

KORADI, R.; BILLETER, M.; WÜTHRICH, K. MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *Journal of Molecular Graphics*, v. 14, p. 51-55, 1996.

KRAULIS, P. J. MOLSCRIPT: A program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*, v. 24, p. 946-950, 1991.

KYTE, J. Folding and Assembly. In: *Structure in Protein Chemistry*, Garland Publishing, 1995.

LIMA, V. L. M.; CORREIA, M. T. S.; CECHINEL, Y. M. N.; SAMPAIO, C. A.; OWEN, J. S.; COELHO, L. C. B. B. Immobilized *Cratylia mollis* lectin as potential matrix to isolate plasma glycoproteins including lecithin cholesterol acyltransferase. *Carbohydrate Polymers*, v. 31, p. 27-32, 1997.

LINDORFF-LARSEN, K.; ROGEN, P.; PACI, E.; VENDRUSCOLO, M.; DOBSON, C. M. Protein folding and the organization of the protein topology universe. *TRENDS in Biochemical Sciences*, v. 30, p. 13-19, 2005.

- LOPEZ, S.; CODINA, C.; BASTIDA, J.; VILADOMAT, F.; DAVIDSON, E.; STEWART, D. Biodiversity of mannose-specific lectins within *Narcissus* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, p. 2507-2513, 2002.
- LOUZADA, P. R. F. Jr; SCARAMELLO, M. E.; MAYA-MONTEIRO, C.; RIETVELD, A. W. M.; FERREIRA, S. T. Effect of hydrostatic pressure on the fluorescence of indole derivatives. *Journal of Fluorescence*, v. 6, p. 231-236, 1996.
- LOWRY, T. M. Optical rotatory power. London: Longmans, Green. Nova Iorque: Dover Publications, 1964.
- MACIEL, E. V. M.; ARAÚJO-FILHO, V. S.; NAKAZAWA, M.; COELHO, L. C. B. B.; CORREIA, M. T. S. Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. *Biologicals*, v. 32, p. 57-60, 2004.
- NAJBAR, J.; DORFMAN, R. C.; FAYER, M. D. Solvent relaxation effects on the kinetics of photoinduced electron transfer reactions. *Journal of Chemical Physics*, v. 94, p. 1081-1092, 1990.
- NAEEM, A.; KHAN, A.; KHAN, R. H. Partially folded intermediate state of concanavalin A retains its carbohydrate specificity. *Biochemical and biophysical Research Communications*, v. 331, p.1284-1294, 2005.
- NAKAMURA, S.; IKEGAMI, A.; MIZUNO, M.; YAGI, F.; NOMURA, K. The expression profile of lectin differs from that of seed storage proteins in *Castanea crenata* trees. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 68, p. 698-705, 2004.
- NISHII, I.; KATAOKA, M.; GOTO, Y. Thermodynamic stability of the molten globule states of apomyoglobin. *Journal of Molecular Biology*, v. 250, p. 223-238, 1995.
- NISHIMURA, C.; DYSON, H. J.; WRIGHT, P. E. Identification of native and non-native structure in kinetic folding intermediates of apomyoglobin. *Journal of Molecular Biology*, v. 355, p.139-156, 2006.
- OZEKI, Y.; MATSUI, T.; NITTA, K.; KAWAUCHI, H.; TAKAYANAGI, Y.; TITANI, K. Purification and characterization of β -galactoside binding lectin from frog (*Rana catesbeiana*) eggs. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, v. 178, p. 407-413, 1991.
- PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (camaratu bean). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 36, p. 113-118, 1992.
- PAN, P. W.; GORDON, H. L.; ROTHSTEIN, S. M. Local-structural diversity and protein folding: Application to all-beta off-lattice protein models. *The Journal of Chemical Physics*, v. 124, p. 24905, 2006.
- PANUNTO, P. C.; DA SILVA, M. A.; LINARDI, A.; BUZIN, M. P.; MELLO, S. M.; PRADO-FRANCESCHI, J.; HYSLOP, S. Biological activities of a lectin from *Bothrops*

jararacussu snake venom. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*, v. 47, p. 21-31, 2006.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Prevalence, biological activity and genetic manipulation of lectins in foods. *Trends in Food Science & Technology*, v. 7, p. 132-138, 1997.

PEUMANS, W. J.; ZHANG, W.; BARRE, A.; ASTOUL, C. H.; KURTI-BALINK, P.; ROVIRA, P.; ROUGÉ, P.; MAY, G. D.; VAN LEUVEN, F.; TRUFFA-BACHI, P.; VAN DAMME, E. J. M. Fruit-specific lectins from banana and plantain. *Planta*, v. 211, p. 546-554, 2000.

PRABU, M. M.; SUGUMA, K.; VIJAYAN, M. Variability in quaternary association of proteins with the same tertiary fold: a case study and rationalization involving legume lectins. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, v. 35, p. 58-69, 1999.

ROSEN, C. G.; WEBER, G. Dimer formation from 1-amino-8-naphthalenesulfonate catalyzed by bovine serum albumin. A new fluorescent molecule with exceptional binding properties. *Biochemistry*, v. 8, p. 3915-3920, 1969.

SAOUROS, S.; EDWARDS-JONES, B.; REISS, M.; SAWMYNADEN, K.; COTA, E.; SIMPSON, P.; DOWSE, T. J.; JAKLE, U.; RAMBOARINA, S.; SHIVARATTAN, T.; MATTHEWS, S.; SOLDATI-FAVRE, D. A novel galectin-like domain from *Toxoplasma gondii* micronemal protein 1 assists the folding, assembly, and transport of a cell adhesion complex. *The Journal of Biological Chemistry*, v.280, p. 38583-38591, 2005.

SHARON, N.; LIS, H. Legume lectins – a large family of homologous proteins. *FASEB Journal*, v. 4, p. 3198-3208, 1990.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins-protein with a sweet tooth: functions in cell recognition. *Essays in Biochemistry*, v. 30, p. 59-75, 1995.

SHARON, N.; LIS, H. The structural basis for carbohydrate recognition by lectins. *The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates*, v. 2, p.1-16, 2001.

SHARON, N.; LIS, H. *Lectins* (2° ed.), Holanda: Kluwer Academic Publishers, 2003.

SIN, K. K.; CHAN, C. P.; PANG, T. H.; SEYDACK, M.; RENNEBERG, R. A highly sensitive fluorescent immunoassay based on avidin-labeled nanocrystals. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Jan, p. 1-7, 2006.

SMEETS, K.; VAN DAMME, E. J. M.; PEUMANS, W. J. Developmental Regulation of Lectin and Alliinase Synthesis in Garlic Bulbs and Leaves. *Plant Physiology*, v. 113, p. 765-771, 1997.

SNATZKE, G. Circular dichroism: An introduction. In: *Circular Dichroism: Principles and Applications* (NAKANISHI, K.; BEROVA, N. e WOODY, R. W., eds.). Nova Iorque: VCH Publishers, p. 59-84, 1994.

- SONG, H.; BELANGER, M.; WHITLOCK, J.; KOZAROV, E.; PROGULSKE-FOX, A. Hemagglutinin B is involved in the adherence of *Porphyromonas gingivalis* to human coronary artery endothelial cells. *Infection and immunity*, v. 73, p. 7267-73, 2005.
- SOUZA, G. A.; OLIVEIRA, P. S. L.; TRAPANI, S.; SANTOS, A. C. O.; ROSA, J. C.; LAURE, H. J.; FAÇA, V. M.; CORREIA, M. T. S.; TAVARES, G. A.; OLIVA, G.; COELHO, L. C. B. B.; GREENE, L. J. Amino acid sequence and tertiary structure of *Cratylia mollis* seed lectin. *Glycobiology*, v. 13, p. 961-972, 2003.
- SRINIVAS, V. R.; REDDY, G. B.; AHMAD, N.; SWAMINATHAN, C. P.; MITRA, N.; SUROLIA, A. Legume lectin family, the 'natural mutants of the quaternary state', provide insights into the relationship between protein stability and oligomerization. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1527, p. 102-111, 2001.
- STOEVA, S.; FRANZ, M.; WACKER, R.; KRAUSPENHAAR, R.; GUTHÖHRLEIN, E.; MIKHAILOV, A.; BETZEL, C.; VOELTER, W. Primary structure, isoforms, and molecular modeling of a chitin-binding mistletoe lectin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 292, p. 23-31, 2001.
- STOKES, G. G. On the change of refrangibility of light. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, London, v. 142, p. 463-562, 1852.
- SYED, F. B.; JOSHI, B. N.; SIVARAMAN, H.; KHIRE, J. M.; KHAN, M. I. Purification and characterization of a cell-surface lectin (Lectin II) from *Agrobacterium radiobacter* NCIM 2443. *Biochemistry and Molecular Biology International*, v. 47, p. 361-367, 1999.
- TAKASHI, R.; TONOMURA, Y.; MORALES, M. F. 4,4'-Bis(1-anilinonaphthalene 8-sulfonate) (bis-ANS): A New Probe of the Active Site of Myosin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 74, p. 2334-2338, 1977.
- THOMAS, P. J., QU, B. H.; PEDERSEN, P. L. Defective protein folding as a basis of human disease. *TRENDS in Biochemical Sciences*, v. 20, p. 456-459, 1995.
- UVERSKY, V. N. Use of fast protein size-exclusion liquid chromatography to study the unfolding of proteins which denature through the molten globule, *Biochemistry*, v. 32, p. 13288-13298, 1993.
- VAN MIERLO, C. P. M.; STEENSMA, E. Protein folding and stability investigated by fluorescence, circular dichroism (CD), and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy: the flavodoxin story. *Journal of Biotechnology*, v. 79, p. 281-298, 2004.
- VENDRUSCOLO, M.; DOKHOLYAN, N. V.; PACI, E.; KARPLUS, M. Small-world view of the amino acids that play a key role in protein folding. *Physical Review. E, Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*, v. 65, p. 061910, 2002.
- VENYAMINOV, S. Y.; YANG, J. T. Determination of protein secondary structure. In: *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*, (Fasman, G. D. ed.). Nova Iorque: Plenum Press.

VIJAYAN, M.; CHANDRA, N. Lectins. *Current Opinion Structural Biology*, v. 9, p. 707-714, 1999.

WEISS, S. Fluorescence spectroscopy of single molecules. *Science*, v. 283, p. 1676-1683, 1999.

WILHELMUS, M. M.; BOELEN, W. C.; OTTE-HOLLER, I.; KAMPS, B.; MAAT-SCHIEMAN, M. L.; DE WAAL, R. M.; VERBEEK, M. M. Small heat shock protein HspB8: its distribution in Alzheimer's disease brains and its inhibition of amyloid-beta protein aggregation and cerebrovascular amyloid-beta toxicity. *Acta Neuropathologica, In Press*, 2006.

<<http://www.biophysics.uchicago.edu/spectroscopy.htm>> Acesso em 19/01/2006.

<http://www.chemkeys.com/bra/md/ede_5/eede_11/oede_23/oede_23.htm> Acesso em 19/01/2006.

<<http://www.olympusfluoview.com/theory/fluoroexciteemit.html>> Acesso em 19/01/2006.

<<http://www.ncsa.uiuc.edu/News/Access/Stories/proteins/page3.htm>> Acesso em 25/01/2006

Bibliografias Consultadas

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *NBR 6023*. Informação e documentação: referências - elaboração. Rio de Janeiro: ABNT, ago. 2002.

LAKOWICZ, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 2ª ed. Nova Iorque: Kluwer Academic/Plenum Press, 1999.

KYTE, J. Folding and Assembly. In: *Structure in Protein Chemistry*. Garland Publishing, 1995.

WOODY, R. W. Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules (ed. FASMAN, G. D.). Nova Iorque: Plenum Press, 1996.