Determinação da Constante Cinética da Lectina KM+ pelo Ligante Peroxidase por Meio da Técnica de Microbalança de Cristal de Quartzo

Pesquero, N. C.[1*], *Pedroso, M. M., Bueno, P. R.*[2#], *Faria, R. C., Roque-Barreira, M. C.*[2]

[1] Instituto de Química, Departamento de Físico-Química, Universidade Estadual Paulista, CP 355, 14801-907, Araraquara, SP, Brazil.

[2] Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, CP 676,

13560-905, São Carlos, SP, Brazil

[3] Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. dos Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto 14049-900, SP, Brazil

*nairacp@gmail.com, #prbueno@iq.unesp.br

Resumo

Lectinas são proteínas amplamente utilizadas no estudo de eventos biológicos, tais como, interação célula-célula, interação hospedeiro-patógeno, metástase e diferenciação celular. A ampla gama de utilização das lectinas está relacionada com sua capacidade de reconhecer e ligar-se reversível e especificamente a carboidratos. Essas proteínas estão presentes em animais, bactérias, vírus e plantas, sendo que nesta última as lectinas são encontradas principalmente nas sementes. A lectina KM+ é isolada da semente da jaca e possui grande afinidade por resíduos de D-manose. Esta lectina possui forte atuação no sistema imunológico, polarizando a resposta imune adequada contra o parasita intracelular *Leishmania major*, induzindo a mitose das células responsáveis pela defesa do organismo, como linfócitos B e T, e possuindo também a capacidade de acelerar a cicatrização de ferimentos na pele e na córnea. Todos esses eventos ocorrem por meio do reconhecimento e ligação específicos das lectinas às estruturas de carboidratos. Com base nisso, foi realizado o estudo da afinidade da KM+ pelo ligante peroxidase que possui um carboidrato (heptamanosídeo) ligado a sua estrutura, por meio da técnica de microbalança de cristal de quartzo. Pela análise da adição de diferentes concentrações de peroxidase à proteína, foi feito o estudo cinético desta reação e determinada a constante de afinidade cinética da lectina pelo ligante como sendo $1{,}49 \times 10^{4}$M.

Palavras-chave: KM+, lectina, peroxidase de rábano silvestre, constante cinética, microbalança de cristal de quartzo.

Introdução

Moléculas, células e organismos revelam informações a seu respeito na forma de glicoconjugados. Esta informação é decodificada por proteínas altamente específicas em sua ligação por carboidratos, denominadas lectinas [1]. Lectinas são proteínas de origem não imune que se ligam especifica e reversivelmente a carboidratos, e não possuem atividade catalítica [2]. As lectinas estão envolvidas em diversos processos biológicos tais como, reconhecimento célula-célula, interações patógeno-hospedeiro, metástase de cânceres e diferenciação [3]. As lectinas são encontradas em diversos organismos desde vírus e bactérias até plantas e animais, sendo que as lectinas provenientes das plantas são as mais completamente caracterizadas [2, 3]. Por conta de suas propriedades biológicas importantes e seu uso na pesquisa e na medicina, estudos estruturais das lectinas têm ganhado impulso recentemente [4]. As lectinas de plantas têm sido utilizadas em diversas aplicações biotecnológicas, incluindo a produção de proteínas recombinantes com propósito terapêutico ou para a liberação de drogas endereçadas [5].

Das sementes da jaca (*Artocarpus integrifolia*) foram isoladas duas lectinas, a jacalina e a KM+ também conhecida como artocarpina, as quais apresentam especificidade de ligação por diferentes carboidratos, apesar da similaridade em suas estruturas gerais [5]. Ambas possuem uma estrutura com enovelamento β prismático [4]. A jacalina, a primeira a ser isolada, é uma proteína tetramérica de quatro protômeros idênticos que consistem

de duas cadeias polipeptídicas, uma cadeia leve (β) e uma pesada (α) com 20 e 133 aminoácidos respectivamente [6]. Esta se liga a D-galactose e ao seu derivado Galβ1→3GalNAc, e tal especificidade fornece a jacalina ampla aplicação no isolamento e detecção de proteínas O-glicosiladas de mamíferos e seletividade de interação com IgA1 de soro humano e secreções [5].

A KM+ é, também, uma proteína homotetramérica, porém formada por apenas um protômero. Sua estrutura primária foi determinada por Rosa e colaboradores [7] como sendo uma cadeia polipeptídica composta por 149 aminoácidos, tendo 52% de identidade com a seqüência da jacalina [5]. As diferenças estruturais entre as duas lectinas são devido às especificidades de ligação a diferentes carboidratos [5]. A KM+ liga-se a D-manose e D-glicose, porém possui afinidade preferencial por D-manose [8]. Deste modo, os melhores ligantes para a KM+ são todos aqueles com glicanas N-ligadas contendo o coração trimanosídico Manα1-3[Manα1-6]Man, tal como a glicoproteína peroxidase de rábano silvestre (HRP, do inglês *Horseradish Peroxidase*) [5].

A KM+ tem sido considerada como uma importante ferramenta para diversas aplicações biomédicas [5] devido às suas propriedades de atuação no sistema imune. Entre suas propriedades as que mais se destacam são, sua capacidade de induzir a migração de neutrófilos por haptotaxia [9, 10] (processo de extrema importância na resposta inflamatória, pois o movimento dos leucócitos até o tecido lesado é essencial para a defesa do organismo contra infecções), a indução da produção de IL-12 p40 por macrófagos [11, 12] (defesa e/ou imunização de ratos da linhagem BALB/c contra o parasita *Leishmanis major*) e também efeito mitogênico sobre linfócitos T e B e efeito de maturação sobre a última [13] (as quais são células responsáveis pela defesa do organismo contra patógenos nocivos). Recentemente, foi relatado o poder de aceleração da cicatrização de ferimentos na pele e córnea pela lectina KM+ [5, 14]. Tal propriedade permitiu o desenvolvimento de uma pomada cicatrizante contendo esta lectina (já testada em cobaias), trabalho desenvolvido pelo grupo da Prof.ª Dr.ª Maria Cristina Roque-Barreira, do Departamento de Medicina da USP de Ribeirão Preto [14].

O estudo das interações proteína-carboidrato é de extrema importância devido à ampla aplicação das lectinas, a qual tem como base a habilidade destas proteínas na discriminação de diferentes açúcares. A técnica de microbalança de cristal de quartzo (QCM, do inglês *quartz crystal microbalance*) vem sendo amplamente utilizada em análises de biorreconhecimento, e sua principal vantagem está na capacidade de medir variações de massa muito pequenas e monitorar a deposição em tempo real [15]. Além disso, os experimentos podem ser realizados utilizando moléculas nativas sem qualquer tipo de marcador. Sendo assim, a técnica de QCM possui diversas vantagens quando comparada às técnicas tradicionais de imunossensor, tais como o sistema ELISA e a Ressonância de Superfície de Plasma [16, 17]. A confiabilidade dos resultados da QCM tem sido verificada por diferentes métodos complementares tais como, impedância [18], análises eletroquímicas [19, 20], espectroscopia de fluorescência [21, 22], ressonância de superfície de plasma [21, 23, 24], microscopia de força atômica [21, 25, 26] e espectroscopia de fotoelétrons [27].

Este trabalho tem como objetivo o estudo da interação da lectina KM+ com o ligante pelo qual possui maior afinidade, a enzima HRP, por meio da técnica de microbalança de cristal de quartzo, determinando, desta maneira, a constante de afinidade cinética de tal interação.

Experimental

Reagentes e Soluções

Neste trabalho foi utilizada a lectina KM+, a qual foi extraída das sementes da jaca, *Artocarpus integrifolia*, e purificada por cromatografia de afinidade. A enzima HRP (Sigma) foi utilizada como ligante da KM+.

Todas as soluções utilizadas nos experimentos foram preparadas com água destilada.O ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA) (Sigma), o 2-mercaptoetanol (Sigma), o N-etil-N-(dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) (Fluka) e o N-hidroxisuccinimida (NHS) (Sigma) foram utilizados no processo de imobilização da lectina. A KM+ foi preparada e utilizada em solução em tampão fosfato 0,1M e pH 7,0. Gelatina, foi utilizada para reagir com os grupamentos ácido carboxílico remanescentes.

Instrumentação

Os experimentos na QCM foram realizados utilizando cristais de corte AT com freqüência fundamental de 5 MHz de 16mm de diâmetro contendo eletrodos de ouro concêntricos. Primeiramente os eletrodos foram limpos em solução piranha ($7H_2SO_4$(conc.): 3 H_2O_2(30%)) recém preparada, enxaguados em água pura e secos ao ar. Os cristais foram colocados em uma célula de medida em fluxo, na qual somente um dos lados do cristal permanecesse em contato com a solução. Foi utilizada a solução tampão fosfato como fluxo carreador a uma vazão de 8,4 $\mu L.min^{-1}$ utilizando uma bomba peristáltica Ismatec modelo IPC de quatro canais.

As medidas de variação de freqüência em função do tempo foi realizada utilizando a microbalança de cristal de quartzo da Q-sense modelo E4.

Imobilização da Proteína

O procedimento utilizado para a imobilização da lectina foi baseado na imobilização utilizando camadas autoorganizadas na superfície do ouro do cristal de quartzo [28]. O cristal de quartzo piezelétrico foi exposto em uma solução contendo uma mistura dos tióis, MUA e 2-mercaptoetanol, na proporção de 1:100 ($0,1x10^{-3}$M e $10x10^{-3}$M), respectivamente, utilizando como solvente álcool etílico. O cristal foi mantido nesta solução por três horas, após este período foi lavado com etanol e com solução tampão fosfato. Após a lavagem o cristal foi exposto à uma solução de EDC/NHS em concentração 10.10^{-3}M e 20.10^{-3}M respectivamente. O cristal foi mantido nesta solução por duas horas. Novamente o cristal foi lavado com tampão fosfato. Em seguida o cristal foi mantido em solução tampão fosfato contendo 0,15 $mg.mL^{-1}$ de KM+ por duas horas. Após este período o cristal foi lavado e exposto a uma solução de gelatina à 0,001% por duas horas, para reagir com os grupos carboxílicos remanescentes e novamente lavado com tampão fosfato e seco ao ar. Após estas etapas o cristal contendo KM+ imobilizada é fixado na célula de fluxo da QCM e as medidas são realizadas utilizando solução tampão como fluxo carreador.

Resultados

Os cristais contendo a lectina imobilizada foram colocados em uma célula e um fluxo contínuo de solução tampão foi utilizado até a estabilização da resposta de freqüência do sistema. À diferentes cristais imobilizados foi adicionada uma solução contendo a enzima HRP em diferentes concentrações: 0,15; 0,30; 0,50; 0,75 e 1,0 mM. A resposta de freqüência em função do tempo foi medida para cada adição de HRP.

A reação entre a HRP e a KM+, descrita pela Equação 1, pode ser descrita de uma maneira similar a ligação receptor-ligante [17].

KM+ (sítios livres) + HRP $\rightarrow$
HRP-KM+ (receptor-ligante) (1)

As velocidades de formação do complexo e a liberação do ligante são descritas pelas constantes de velocidade de associação (k_1) e dissociação (k_{-1}), respectivamente. Quando o receptor está imobilizado em uma superfície ocorre uma reação similar. Neste caso, a percentagem de ligantes associados a receptores (θ_t) presentes na superfície do cristal a um dado tempo *t*, depois da adição dos ligantes é dada pela Equação 2 [17].

$$\theta_t = \theta_{eq}\left(1 - e^{-(1/\tau)t}\right) \qquad (2)$$

Onde τ é um tempo de relaxação e θ_{eq} é a percentagem de ligantes associados no equilíbrio. O tempo de relaxação τ está relacionado com a concentração inicial de ligante pela Equação 3.

$$\tau^{-1} = k_1.[ligante] + k_{-1} \qquad (3)$$

Onde τ^{-1} é conhecido como a relaxação da constante de velocidade, ou constante de relaxação do processo. Ambas as constantes, de associação e dissociação, estão presentes nesta relação.

A percentagem de ligantes associados no equilíbrio, θ_{eq}, corresponde à percentagem máxima de complexos receptor-ligante presentes na superfície do cristal ao final da reação. O aumento de θ_t é proporcional ao aumento de massa do cristal de quartzo, o que é representado pela Equação 4.

$$\Delta m_t = \Delta m_{máx}\left(1 - e^{-(1/\tau)t}\right) \qquad (4)$$

Quando as variações de massa são pequenas e não alteram, significantemente, as propriedades viscoelásticas da superfície do quartzo, então pode-se

assumir que essas variações de massa são proporcionais às variações de freqüência. Portanto, as variações de freqüência são dadas pela Equação 5.

$$\Delta f_t = \Delta f_{máx}\left(1 - e^{-(1/\tau)t}\right) \qquad (5)$$

A Equação 5 é usada para a determinação dos parâmetros cinéticos que descrevem a interação, ou seja, a formação dos complexos receptor-ligante [17, 19].

Portanto, por meio das medidas de variação de freqüência (Δ*f*) em função do tempo é realizado um ajuste nas mesmas utilizando como modelo a Eq. 5. A partir deste ajuste é possível obter os valores de $\Delta f_{máx}$ e τ^{-1} para cada uma das adições de HRP nas diferentes concentrações acima apresentadas. Na Figura 1 são apresentadas as respostas de variação de freqüência para cada adição de HRP. A partir dos gráficos da Figura 1 foram realizados os ajustes e os valores de $\Delta f_{máx}$ e τ^{-1} são apresentados na Tabela 1.

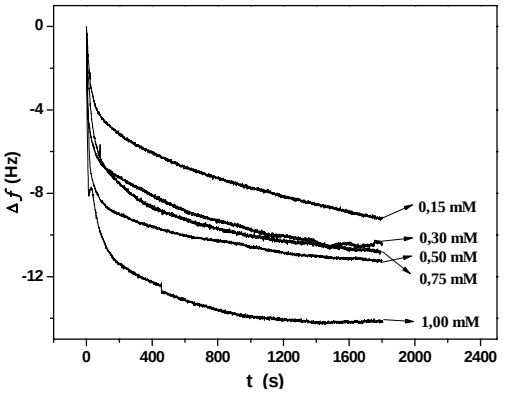

Figura 1: Variação de freqüência em função do tempo para a adição de diferentes concentrações de HRP ao cristal contendo KM+ imobilizado.

Tabela 1: Resultados obtidos por meio do ajuste das curvas Δf vs. t pela Equação 5.

[HRP] / (mmol.L^{-1})	-Δf $_{máx}$ / Hz	τ^{-1}/ 10^{-3} s^{-1}
0,15	9,09	2,70
0,30	10,50	15,01
0,50	10,39	24,30
0,75	10,79	22,40
1,00	13,54	35,40

Os valores de τ^{-1} foram organizados em função da concentração da enzima HRP, e por meio de linearização da curva obteve-se os valores do coeficiente angular e linear, os quais correspondem aos valores de k_1 e k_{-1}, respectivamente.

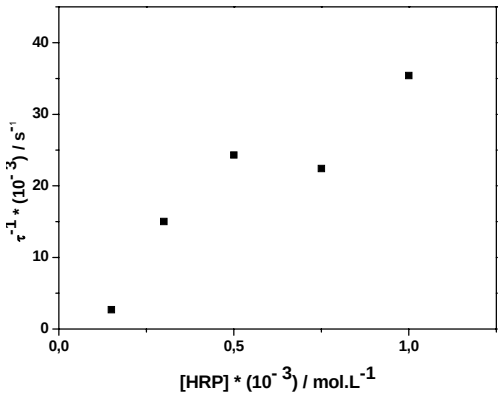

Figura 2: Variação de τ^{-1} em função da concentração de HRP adicionada (Equação 2).

Sabendo-se que a constante de velocidade de equilíbrio de associação é dada pela relação apresentada na Equação 6, pôde-se, então, calculá-la para a interação entre a lectina KM+ e a enzima HRP, sendo seu valor 1,49x10^{4}M.

$$K_a = \frac{k_1}{k_{-1}} \qquad (6)$$

O valor da constante de equilíbrio encontrada para a interação entre a KM+ e a enzima HRP está de acordo com o trabalho de Nakamura-Tsuruda *et al.* [29], no qual foram determinadas as constantes de afinidade da KM+ por diversos ligantes, por meio da técnica de cromatografia de afinidade.

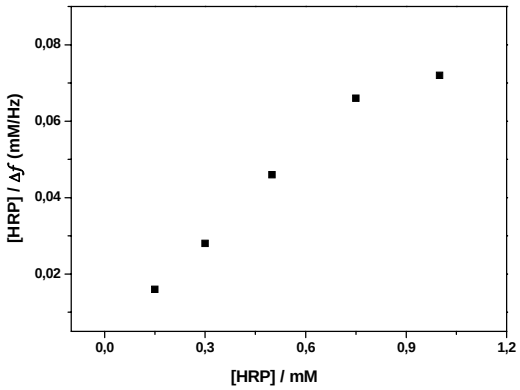

Figura 3: Isoterma de Langmuir obtida para a interação HRP-KM+, calculada por meio do estudo realizado com a QCM.

A interação entre a KM+ e a HRP também foi estudada e caracterizada pelo modelo de adsorção de Langmuir. Neste modelo a variação da freqüência no equilíbrio relaciona-se com a concentração do ligante pela relação apresentada na Equação 7.

$$\frac{C}{\Delta f} = \frac{C}{\Delta f_{máx}} + \frac{1}{\Delta f_{máx}} \cdot \frac{1}{K_A} \qquad (7)$$

Onde Δf é a variação da freqüência no equilíbrio, C é a concentração da HRP (ligante), $\Delta f_{máx}$ é a variação da freqüência quando C é infinita e K_A é a constante de afinidade aparente. A Equação 7, denominada Isoterma de Langmuir, é uma equação da reta, sendo que K_A é dada pela relação entre o coeficiente angular e o linear desta curva [15, 30].

A Isoterma de Langmuir para a interação entre a KM+ e a HRP foi construída utilizando-se os dados provenientes da Figura 1, sendo apresentada na Figura 3. O valor de K_A obtido para a interação em estudo foi de $0{,}82 \times 10^4$ M.

Os valores das duas constantes encontradas, embora calculadas por metodologias distintas, possuem valores próximos, principalmente quando se considera a ordem de grandeza das mesmas.

Conclusão

A interação HRP-KM+ foi estudada por meio da técnica de QCM integrado a um sistema de fluxo. Tal técnica permitiu a caracterização da interação lectina-ligante, e sua descrição quantitativa pela determinação das constantes de associação no equilíbrio e de afinidade aparente. Portanto, a técnica apresentou-se como uma importante ferramenta para o estudo de sistemas específicos em tempo real. A metodologia utilizada para a construção das monocamadas mostrou-se adequada, pois possibilitou a ligação da biomolécula à superfície do transdutor sem a perda de sua conformação o que poderia acarretar em uma perda de sua função, prejudicando, desta forma, sua interação com o ligante. As constantes encontradas para a interação HRP-KM+ estão de acordo entre si, pois pertencem à mesma ordem de grandeza, embora tenham sido calculadas por meio de metodologias diferentes. Os valores encontrados também estão em concordância com os valores previamente relatados por Nakamura-Tsuruda *et al*. apesar de terem sido determinados por meio da técnica de cromatografia de afinidade.

Agradecimentos

Os autores agradecem o suporte financeiro da agência brasileira de financiamento à pesquisa CNPq. Agradecemos também à Sandra Maria de Oliveira Thomaz pela purificação da lectina KM+ utilizada nos experimentos.

Referências

[1] Misquith, S., P.G. Rani, and A. Surolia, The Journal of Biological Chemistry, Vol. 269, No. 48, pp.30393-30401, 1994.

[2] Sharon, N., Lis, H., Chemical Reviews, Vol. 98, No. 2, pp.637-674, 1998.

[3] Jeyaprakash, A.A., et al., Journal of Molecular Biology, Vol. 338, No. pp.757-770, 2004.

[4] Pratap, J.V., et al., Journal of Molecular Biology, Vol. 317, No. pp.237-247, 2002.

[5] Silva, L.L.P., Molfetta-Machado, J. B., Panunto-Castelo, A., Denecke, J., Goldman, M. H. S., Biochimica et Biophysica Acta, Vol. 1726, No. pp.251-260, 2005.

[6] Bourne, Y., et al., Biochemical Journal, Vol. 364, No. pp.173-180, May, 2002.

[7] Rosa, J.C., et al., Protein Science, Vol. 8, No. 1, pp.13-24, Jan, 1999.

[8] Barre, A., et al., Biochimie, Vol. 86, No. pp.685-691, 2004.

[9] Ganiko, L., et al., Biochimica et Biophysica Acta, Vol. 1721, No. pp.152-163, 2005.

[10] Silva, G.P., et al., Biochimica et Biophysica Acta, Vol. 1760, No. pp.86-94, 2006.

[11] Teixeira, C.S., et al., Vaccine, Vol. 24, No. 15, pp.3001-3008, 2006.

[12] Panunto-Castelo, A., et al., Glycobiology, Vol. 11, No. 12, pp.1035-1042, 2001.

[13] Bunn-Moreno, M.M. and A. Campos-Neto, Journal of Immunology, Vol. 127, No. pp.427-429, 1981.

[14] Pinto da Silva, L.L., et al., "Composition for Preventing or Treating Appearance of Epithelia Wounds or for Immunomodulating, comprises lectin", WO2004100861-A2, November, 2004.

[15] Pedroso, M.M., et al., Microchemical Journal, Vol. 89, No. 2, pp.153-158, 2008.

[16] Pei, Z., et al., Biosensors & Bioelectronics, Vol. 21, No. pp.60-66, 2005.

[17] Lebed, K., et al., Journal of Colloid and Interface Science, Vol. 299, No. pp.41-48, 2006.

[18] Buttry, D.A. and M.D. Ward, Chemical Reviews, Vol. 92, No. 6, pp.1355-1379, 1992.

[19] Mao, Y.A., et al., Analytical Biochemistry, Vol. 306, No. 1, pp.23-30, Jul, 2002.
[20] Kim, G.H., A.G. Rand, and S.V. Letcher, Biosensors & Bioelectronics, Vol. 18, No. 1, pp.83-89, 2003.
[21] Cho, Y.K., et al., Journal of Colloid and Interface Science, Vol. 278, No. 1, pp.44-52, Oct, 2004.
[22] Ha, T.H., et al., Biosensors & Bioelectronics, Vol. 20, No. 2, pp.378-389, 2004.
[23] Okahata, Y., et al., Analytical Sciences, Vol. 16, No. 11, pp.1113-1119, Nov, 2000.
[24] Laricchia-Robbio, L. and R.P. Revoltella, Biosensors & Bioelectronics, Vol. 19, No. 12, pp.1753-1758, 2004.
[25] Coffey, T., M. Abdelmaksoud, and J. Krim, Journal of Physics-Condensed Matter, Vol. 13, No. 21, pp.4991-4999, May, 2001.
[26] Caruso, F., E. Rodda, and D.N. Furlong, Journal of Colloid and Interface Science, Vol. 178, No. 1, pp.104-115, Mar, 1996.
[27] Kristensen, E.M.E., et al., Biomaterials, Vol. 24, No. 23, pp.4153-4159, 2003.
[28] Gooding, J.J. and D.B. Hibbert, Trends in Analytical Chemistry, Vol. 18, No. 8, 1999.
[29] Nakamura-Tsuruta, S., et al., Febs Journal, Vol. 275, No. 6, pp.1227-1239, 2008.
[30] Zhang, Y., et al., Analytical Chemistry, Vol. 78, No. 6, pp.2001-2008, 2006.