



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Pós-Graduação em Biologia Molecular

Análise de associações de *major royal jelly protein 1* por cromatografia de exclusão molecular

Humberto Gonczarowska Jorge

Orientador: Marcelo Valle de Sousa

Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas

Brasília, Agosto de 2012



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Pós-Graduação em Biologia Molecular

Análise de associações de *major royal jelly protein 1* por cromatografia de exclusão molecular

Humberto Gonczarowska Jorge

Orientador: Marcelo Valle de Sousa

Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre.

Brasília, Agosto de 2012.

Agradecimentos

Agradeço antes de tudo a Deus, está dando tudo certo!

À minha família, mesmo havendo contratempos, sempre estiverem dispostos a me ajudar nas necessidades que apareceram ao longo do tempo! Sou muito grato a todos vocês! Obrigado por não deixarem faltar nada para mim!

Aos meus amigos do Laboratório de Química e Bioquímica de Proteínas e dos diversos outros laboratórios da UnB. Em especial o grupo de pesquisa do Professor Marcelo Valle de Sousa: Dr. Gabriel Costa, MSc. Elaine Marinho, Juliana Hosoume, Marcos Vinícius, Dr. Luiz Henrique do Vale, Alessandra Pellegrini e mais especialmente ainda ao meu grande amigo MSc. Jaques Miranda, que melhor companheiro de aventuras dentro e fora do laboratório não há.

Aos amigos do laboratório MSc. Adelson Joel, MSc. Aline Barbosa, MSc. Ana Toledo, MSc. Anne Neves, Bruna Gomes, MSc. César Prías, MSc. Diana Mendoza, MSc. Elaine Aquino, Dr. Everton da Rosa, Fabiano Costa, Guilherme Pinheiro, MSc. Jéssica Costa, Giselle Reis, MSc. Muhammad Tahir, MSc. Natália von Gal Milanezi, MSc. Pedro Martins, MSc. Pollyana Farias, Priscila Arquelau, Rayner Myr, MSc. Rosa Cuellar, Thaís de Almeida, Mara Machado, Samuel Mandacaru e Siliana Martins pelos bons momentos passados juntos.

Aos meus amigos de fora do laboratório, especialmente aos Amiguxos (Alexandre Botin, André Lopes, Caio Simões, Pedro Teixeira, Rômulo Klein, Thiago Bahé), pelos momentos divertidos e conversas que passamos.

A Bruna Brandão pela paciência e carinho.

A Professora Dra. Maria Júlia Martins Silva pelos incentivos.

A Professora Dra. Sônia Freitas, do Laboratório de Biofísica, pelos ensinamentos de técnicas biofísicas, as quais jurei que não iria aprender nunca e hoje conseguiria me virar sozinho. Às suas alunas MSc. Alice Morales, MSc. Mary-Ann Xavier e MSc. Sandriele Aires pela paciência e disposição de me ajudar.

Aos Professores do Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas Dra. Consuelo Medeiros R. Lima, Dra. Mariana S. Castro, Profa. Dra. Fabiane Hiratsuka Veiga de Souza, Dr. Carlos André Ornelas Ricart, Dr. Wagner Fontes, Dr. Magno Junqueira, Dr. Sebastien Olivier Charneau, Dr. Pedro Zanotta. A amizade e o conhecimento de vocês me tornaram uma pessoa melhor!

Aos técnicos de laboratório Nuno Manuel, MSc. Daniel Logrado e Micaella Pereira. Sem vocês eu não teria chegado até aqui!

A Universidade de Brasília por essa grande oportunidade.

A CAPES pelo fornecimento da minha bolsa e à FINEP pela infraestrutura do laboratório.

E obviamente ao meu orientador Professor Doutor Marcelo Valle de Sousa! Se um dia meus conhecimentos e habilidades chegarem aos pés dos seus, serei mais do que muitos pesquisadores um dia pensaram em ser na vida! Muito obrigado mesmo por essa confiança!

Resumo

Polifenismo é a habilidade de um genoma expressar múltiplos fenótipos morfológica e comportamentalmente distintos. Em abelhas *Apis mellifera*, o polifenismo é essencial, uma vez que gera divisão de tarefas na colméia, vital para sua viabilidade. A plasticidade fenotípica das abelhas é mediada nutricionalmente pela geleia real (GR). A *major royal jelly protein 1* (MRJP1) é a mais abundante proteína da GR, e é descrita como o principal fator ativo na diferenciação de castas de *Apis mellifera*. A MRJP1 é uma glicoproteína que se liga fortemente a um peptídeo chamado apisimina (5,5 kDa) e se auto-associa, formando complexos de diferentes tamanhos, podendo se apresentar em diversas formas moleculares numa única solução. O objetivo deste trabalho foi caracterizar associações de MRJP1 sob diversas condições. MRJP1 foi purificada em um único passo de cromatografia de troca iônica. Por cromatografia de exclusão molecular foi possível observar que a MRJP1 tende a se oligomerizar ou até mesmo a se agregar em tampões ácidos, em amostras aquecidas a 60°C ou em tampões com alta molaridade de sal (2 M de NaCl) ou de glicina (2 M). Em tampão PBS pH neutro e tampão carbonato/bicarbonato pH 10,0, a MRJP1 está presente em três formas -pentâmero (290 kDa), dímero (120 kDa) e monômero (55 kDa). Ao se adicionar 0,5 M de glicina em tampão carbonato/bicarbonato pH 10,0, a MRJP1 se dissocia, apresentando-se mais abundante nas formas dimérica e monomérica. A presença dos surfactantes dodecil sulfato de sódio, Tween® 20 e Brij 35 induz um aumento na massa dos complexos de MRJP1, causado provavelmente pela ligação de moléculas do detergente com a proteína, podendo também induzir oligomerização ou agregação. Logo, conclui-se que a liofilização e aquecimento das amostras de MRJP1 induzem oligomerização e agregação da amostra. Não liofilizar o monômero e mantê-lo em baixas temperaturas mantém a amostra nesta forma molecular. O tampão carbonato/bicarbonato, pH 10,0, contendo glicina 0,5 M foi o melhor para se obter menor quantidade de formas de MRJP1 em solução com grande quantidade de monômero. O processo de ultrafiltração impede a purificação de MRJP1 em cromatografia de troca-iônica.

Palavras-chave: MRJP1, geleia real, cromatografia de exclusão molecular, cromatografia de troca iônica, ultrafiltração, oligômero, monômero.

Abstract

Polyphenism is the ability of a genome to express multiple phenotypes with different morphologies and behaviors. In *Apis mellifera* bees, the polyphenism is essential, once it generates labor division in the hive, vital to its viability. The bee's phenotypic plasticity is nutritionally mediated by royal jelly (GR). The major royal jelly protein 1 (MRJP1) is the most abundant protein in GR, and it is described as the main active factor in differentiating *Apis mellifera* castes. The MRJP1 is a glycoprotein that binds strongly to a peptide named apsimin (5,5 kDa) and self-associates, forming complexes of various sizes, and may present itself in different molecular forms in one solution. The purpose of this study was to characterize MRJP1 associations under different conditions. MRJP1 was purified in a single step of ionic exchange chromatography. By size exclusion chromatography, it was possible to observe the MRJP1 oligomerization or even aggregation in acid buffers, in samples heated to 60°C or in buffers with high salt molarity (2 M of NaCl) or glycine (2 M). In PBS buffer at neutral pH and carbonate/bicarbonate pH 10,0 buffer, MRJP1 was present in three forms - pentamer (290 kDa), dimer (120 kDa) or monomer (55 kDa). By adding 0.5 M of glycine in carbonate/bicarbonate pH 10,0 buffer, MRJP1 dissociates, leading to monomer and dimer as the most abundant forms. The presence of the surfactants sodium dodecyl sulfate, Tween® 20 and Brij 35 induces a mass increase in the MRJP1 complex, probably caused by the binding of detergent molecules to the protein. Detergents may also induce oligomerization or aggregation. Therefore, it is concluded that lyophilization and heating the MRJP1 samples induce oligomerization and aggregation of the sample. To not lyophilize the monomer and keep it at low temperatures maintains the sample in this molecular form. The carbonate/bicarbonate buffer, pH 10.0, containing 0.5 M of glycine was the best for obtaining fewer MRJP1 forms in solution with high amounts of monomer. The ultrafiltration process prevents MRJP1 purification by ion exchange chromatography.

Key-words: MRJP1, royal jelly, size exclusion chromatography, ionic exchange chromatography, ultrafiltration, oligomer, monomer.

Sumário

<i>Agradecimentos</i>	iii
Resumo	v
Abstract	vi
Lista de símbolos, abreviaturas e siglas	1
Lista de Fluxogramas	3
Lista de Tabelas	3
Lista de Figuras	3
1 Introdução	6
1.1 Geleia Real	6
1.2 MRJP1	9
1.3 Cromatografia de exclusão molecular	12
2 Objetivos	15
3 Materiais e Métodos	16
3.1 Purificação de MRJP1 por cromatografia líquida de troca iônica.....	16
3.2 Ultrafiltração da GR	17
3.3 Ultrafiltração de MRJP1 na presença de diferentes surfactantes	18
3.4 Cromatografia de exclusão molecular	18
3.4.1 Caracterização das formas de MRJP1 por cromatografia de exclusão molecular	18
3.4.2 Análise do efeito da temperatura sobre a oligomerização de MRJP1	20
3.5 Eletroforese desnaturante em gel poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)	20
3.6 Digestão proteolítica in gel.....	21
3.7 Espectrometria de massa (MS) e identificação de proteínas por “Peptide Mass Fingerprinting” (PMF).....	21
4 Resultados e Discussão	23
4.1 Purificação de MRJP1	23
4.2 Ultrafiltração das amostras de GR em tampões contendo surfactantes.....	27
4.3 Cromatografia de exclusão molecular de MRJP1 em diferentes condições.....	28
4.4 Recromatografia de oligômeros e monômeros de MRJP1 liofilizados	43
4.5 Recromatografia de exclusão molecular de monômeros de MRJP1 não liofilizados	46
4.6 Cromatografia de exclusão molecular de MRJP1 em diferentes concentrações ..	47
4.7 Efeito da temperatura sobre MRJP1	49
4.8 Novo protocolo de cromatografia de troca aniônica de extrato de GR	50
5 Conclusões	58
6 Perspectivas	59
7 Referências Bibliográficas	60

Lista de símbolos, abreviaturas e siglas

10-2-HDA – ácido 10-hidroxi-2-decenóico
AFM – microscopia de força atômica
BN – blue native
BSA – albumina de soro bovino
CEM – cromatografia de exclusão molecular
CD – dicroísmo circular
CG – com glicina
CHCA – ácido α -ciano-4-hidróxi-cinâmico
CitC – citocromo C
CMC – concentração crítica micelar
DLS – espalhamento de luz dinâmico
EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético
EGFR – fator de crescimento epidérmico
FER – ferritina
FPLC – fast protein liquid chromatography
GR – geleia real
kDa – quilo Dalton
M – molar
MALDI – matrix-assisted laser desorption/ionization
MRJP1 – major royal jelly protein 1
MS – espectrometria de massa
NCBI – National Center for Biotechnology Information
OvalB – ovalbumina
PBS – tampão fosfato-salino
pI – ponto isoelétrico
PMF – peptide mass fingerprinting
PTM – modificações pós-traducionais
SDS – dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE – gel de poli(acrilamida) dodecil sulfato de sódio
SG – sem glicina
TFA – ácido trifluoracético

TOF – time of flight

TRG – tireoglobulina

Tris – Tris (hidroximetil) aminoetano

V_0 – volume vazio da coluna

V_c – volume geométrico da coluna

V_e – volume de retenção da proteína

v/v – relação volume/volume

w/v – relação peso/volume

Lista de Fluxogramas

Fluxograma 1. Estratégias de purificação de MRJP1.....	17
Fluxograma 2. Cromatografia de exclusão molecular das frações oligoméricas e monoméricas obtidas das separações de MRJP1 em tampão pH 10 com e sem glicina.	44

Lista de Tabelas

Tabela 1. Tampões testados em cromatografia de exclusão molecular.....	19
Tabela 2. Concentração de MRJP1 em presença de Brij 35, SDS e Tween® 20 .	28
Tabela 3. Identidade de proteínas associadas às frações 1-5 (Figura 8), separadas em cromatografias de exclusão molecular.	32

Lista de Figuras

Figura 1. Processo de gel filtração.....	13
Figura 2. Perfil cromatográfico de purificação de MRJP1 por cromatografia de troca aniônica.....	23
Figura 3. SDS-PAGE das frações de MRJP1 acumuladas em cromatografia de troca aniônica.....	24
Figura 4. Novo método de cromatografia de troca aniônica visando separar a apisimina.	25
Figura 5. Espectrometria de massa da fração coletada na Figura 4A. A) Espectro massas de MRJP1 não digerida..	26
Figura 6. Curva padrão de BSA obtida pelo método BCA.	27
Figura 7. Cromatografia de exclusão molecular de MRJP1 em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5	29
Figura 8. Cromatografia de exclusão molecular de MRJP1 em tampão salino.....	30
Figura 9. Cromatografia de exclusão molecular de MRJP1 em tampão Tris- HCl 0,05 M, pH 7,5 com Gly 0,5 M	31
Figura 10. Cromatografia de exclusão molecular de MRJP1 em Tris- HCl 0,05 M, pH 7,5 com Gly 1 M.....	32

Figura 11. Cromatografia de exclusão molecular de MRJP1 em tampão Tris- HCl 0,05 M, pH 7,5 com Gly 2 M	33
Figura 12. Cromatografia de exclusão molecular com tampão contendo Tween® 20 0,2% (v/v).....	34
Figura 13. Cromatografia de exclusão molecular em tampão contendo Tween® 20 0,5% (v/v), Gly 1 M.....	34
Figura 14. Cromatografia de exclusão molecular de MRJP1 em tampão básico.....	35
Figura 15. Cromatografia de exclusão molecular de MRJP1 aquecida em tampão básico.	36
Figura 16. Cromatografias de exclusão molecular de MRJP1 em tampão ácido com e sem GLY sobrepostos.....	37
Figura 17. Cromatografias de exclusão molecular de MRJP1 em tampão PBS pH 7,0 com e sem GLY sobrepostos.....	38
Figura 18. Cromatografias de exclusão molecular de MRJP1 em tampão PBS pH 11,5 com e sem GLY sobrepostos.....	39
Figura 19. Cromatografias de exclusão molecular de MRJP1 em tampão carbonato/bicarbonato 0,02 M, pH 10,0.....	40
Figura 20. Cromatografia de exclusão molecular de MRJP1 em tampão carbonato/bicarbonato 0,02 M, pH 10,0, COM Gly 0,5 M	41
Figura 21. Cromatografia de exclusão molecular de MRJP1 aquecida em tampão carbonato/bicarbonato 0,02 M, pH 10,0, Gly 0,5 M.	42
Figura 22. Cromatografias de exclusão molecular de MRJP1 em diferentes concentrações de SDS em tampão carbonato/bicarbonato 0,02 M, Gly 0,5 M.....	43
Figura 23. Cromatografias de exclusão molecular das frações monoméricas SG e CG e das frações oligoméricas SG e CG de MRJP1 em tampão carbonato/bicarbonato 0,02 M, Gly 0,5 M	45
Figura 24. Recromatografias de exclusão molecular dos monômeros de MRJP1 não liofilizados em tampão carbonato/bicarbonato 0,02 M, Gly 0,5 M, pH 10,0 e em água.....	46
Figura 25. Cromatografias de exclusão molecular em diferentes concentrações de MRJP1 eluída em tampão carbonato/bicarbonato 0,02 M.	48
Figura 26. Cromatografias de exclusão molecular do monômero de MRJP1 submetidas a 24 h em determinada temperatura e eluídas em tampão carbonato/bicarbonato 0,02 M	49
Figura 27. Cromatografia de troca aniônica da nova GR.....	51

Figura 28. Cromatografia de troca aniônica da nova GR ultrafiltrada (100 kDa) e concentrada (10 kDa).....	52
Figura 29. Cromatografia de troca aniônica da nova GR somente com tampão contendo EDTA.. ..	53
Figura 30. Cromatografia de troca aniônica de amostra solubilizada em tampão contendo ou não a presença de Tween® 20 1% (v/v).	54
Figura 31. Cromatografia de troca aniônica com amostra aquecida ou não em tampão contendo Tween® 20 1% (v/v).	55
Figura 32. Comparação entre 3 cromatogramas de troca aniônica.....	56

1 Introdução

1.1 Geleia Real

Polifenismo é a habilidade de um genoma expressar múltiplos fenótipos morfológica e comportamentalmente distintos (COLGAN *et al*, 2011). Tal plasticidade fenotípica descontínua na morfologia pode ser causada por fatores ambientais e é observada em diversas espécies, quando dois ou mais fenótipos distintos são produzidos pelo menos genótipo (HARTFELDER e EMLEN, 2005; SIMPSON, *et al*, 2011). Mudanças no comportamento e estados fisiológicos devido ao polifenismo são adaptativas ao ambiente natural ou à necessidade da sociedade, e tais mudanças são controladas por mecanismos neuro-hormonais. Em insetos eusociais, como abelhas *Apis mellifera*, o polifenismo é muito importante para colônia, uma vez que a divisão de tarefas na colméia, mais especificamente entre rainhas e operárias, torna-se vital para a viabilidade da colméia (SASAKI, 2012). É sabido que a plasticidade fenotípica em abelhas é mediada nutricionalmente, e Foret e colaboradores (2012) sugeriram que essa nutrição alteraria a dinâmica de metilação do genoma de uma larva em crescimento, levando a uma expressão diferenciada dos genes.

A geleia real (GR) então teria compostos ativos que juntos, além de provocar uma alteração na metilação do DNA, modificariam histonas e talvez outros metabólitos, causando a diferenciação em castas (FORET *et al*, 2012). Já descrito por muitos outros autores, a nutrição de larvas de abelha com geleia real tem função primordial nas diferenças fisiológicas e morfológicas entre abelhas rainhas e operárias.

A GR é uma secreção primária e funcional das glândulas hipofaríngeas e mandibulares de abelhas operárias, desempenhando um papel importante no desenvolvimento de abelhas rainhas. De acordo com a literatura, as larvas que se tornarão rainhas são alimentadas com GR durante toda a vida, enquanto que as abelhas que se tornarão operárias são alimentadas com GR por somente três dias (KNECHT e KAATZ, 1990; CHEN e CHEN, 1995; TAMURA e AMANO, 2009). Quando adulta, a abelha rainha, em comparação com as abelhas operárias, possui glândulas hipofaríngeas vestigiais ou ausentes, possui habilidade reprodutiva, tem um tamanho corporal maior e maior longevidade. A dieta diferenciada de larvas com GR é considerada a principal

causa para essa significativa diferença morfológica e funcional entre esses tipos de abelhas (CHEN e CHEN, 1995; KUCHARSKI *et al*, 2008).

Apresentando variações em sua composição em função da região geográfica e das condições climáticas (ALBERT *et al*, 1999), a GR é composta de 60-70% de água, 12-15% de proteínas, 10-16% de carboidratos, 3-6% de lipídeos, vitaminas, sais minerais e aminoácidos livres (TAKENAKA, 1982; SCHMITZOVA *et al*, 1998), possuindo um pH ácido, variando entre 3,6 e 4,2 (SCARSELLI *et al*, 2005). Dentre as proteínas, entre 46-89% são solúveis em água, sendo 80% dessas proteínas pertencentes a uma família denominada *major royal jelly proteins* (MRJP) (SCHMITZOVA *et al*, 1998; SIMUTH, 2001), com uma participação de 45% de MRJP1 entre as proteínas dessa família (FURUSAWA *et al*, 2008; NOZAKI *et al*, 2012). As MRJPs partilham uma origem evolutiva comum com as proteínas *yellow* de *Drosophila* spp., porém exercem uma importante função nutricional para as abelhas, enquanto as proteínas *yellow* desempenham um papel na pigmentação cuticular de *D. melanogaster* (ALBERT *et al*, 1999).

A família das MRJPs possui 9 membros, sendo que 8 deles (MRJP1-8) já foram caracterizados pela clonagem e sequência dos seus respectivos cDNAs (ALBERT e KLAUDINY, 2004; DRAPEAU *et al*, 2006; SCHONLEBEN *et al*, 2007). As MRJPs eram consideradas as principais proteínas na atividade fisiológica do desenvolvimento da larva de abelha em rainha, uma vez que possuem grandes quantidades de aminoácidos essenciais, similar à albumina sérica e caseína do leite. Isso fez com que uns autores identificassem as MRJPs como apalbuminas, visto a similaridade na composição de aminoácidos dessas proteínas (SCHMITZOVA *et al*, 1998).

As MRJP2, MRJP3, MRJP4 e MRJP5 são glicoproteínas com massas moleculares estimadas de 50-60; 80-87; 60; e 79-79,5 kDa e pIs 4,9-7,2; 7-8; 8,3; e 6,3-6,8; respectivamente (SCHMITZOVA *et al*, 1998; SANO *et al*, 2004; SANTOS *et al*, 2005). Tais massas são relativas às abelhas africanizadas. No trabalho de Sano e colaboradores (2004), observou-se diferenças entre as massas e pIs dessas mesmas proteínas comparando-se a GR de abelhas européias e africanizadas. O mesmo pode ser observado comparando-se os estudos de Schmitzova e colaboradores (1998) e Santos e colaboradores (2005) em que os primeiros trabalham com abelhas européias e os segundos, com africanizadas. Possíveis fatores para essas diferenças poderiam ser variações genéticas, polimorfismos, fosforilações ou o tipo e grau de glicosilação dessas

proteínas, uma vez que possuem muitos sítios passíveis de serem glicolisados (SCHMITZOVA *et al*, 1998; SANTOS *et al*, 2005; SCHONLEBEN *et al*, 2007).

Chen e Chen (1995) e Kamakura e colaboradores (2001a) avaliaram a condições de armazenamento da GR descobrindo que o tempo de exposição à determinada temperatura e o aumento gradativo da temperatura influenciam na taxa de degradação desse composto. Mesmo em baixa temperatura, 4°C, já ocorre degradação da GR, e quanto mais alta a temperatura, mais rápida a degradação. Contudo, não foi verificada influência da luminosidade na taxa de degradação da GR. Resultados obtidos por Hanes e Simuth (1992) e Kamakura e Fukushima (2002) indicaram que o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) aumentava a estabilidade de algumas proteínas da GR. Kamakura e colaboradores (2001a) sugeriram uma proteína de 57 kDa (posteriormente identificada como MRJP1) como um marcador de qualidade da GR refletindo as condições em que ela foi estocada. O EDTA aumenta a faixa de termoestabilidade dessa proteína de 57 kDa, reduzindo a degradação em altas temperaturas de forma dose-dependente (KAMAKURA e FUKUSHIMA, 2002).

Em seu uso terapêutico, a GR tem revelado possuir diversas atividades em animais, como vasodilatadoras e hipotensivas (SHINODA *et al*, 1978), ação desinfetante (FUJIWARA *et al*, 1990), efeito antitumoral (TOWNSEND *et al*, 1959; TOWNSEND *et al*, 1960; TOWNSEND *et al*, 1961; TAMURA *et al*, 1987), atividade antiinflamatória (FUJII *et al*, 1990), atividade anti-hipercolesterolêmica (NAKAJIN *et al*, 1982; KAMAKURA *et al*, 2006) entre outras. Também foram relatados efeitos de estimulação do crescimento de monócitos humanos (WATANAB *et al*, 1998) e de órgãos genitais masculinos de camundongos (KATO *et al*, 1998). Acrescenta-se também o fato dela possuir diversos componentes bioativos, como a royalisina e o ácido 10-hidroxi-2-decenóico (10-2-HDA). A royalisina, *in vitro*, provou ser um bom antibiótico contra bactérias tanto Gram-negativas quanto Gram-positivas (SHEN *et al*, 2010). Já o 10-2-HDA da GR foi identificado como agente antibiótico (BLUM *et al*, 1959; FUJIWARA *et al*, 1990), antitumoral (TOWNSEND *et al*, 1959; TOWNSEND *et al*, 1960; TOWNSEND *et al*, 1961; TAMURA *et al*, 1987), indutor de produção de colágeno por fibroblastos (KOYA-MIYATA *et al*, 2004) e estimulante da geração de neurônios e redução da quantidade de astrócitos (HATTORI *et al*, 2007). Oka e colaboradores (2001) observaram o efeito imunomodulatório da GR em camundongos em que, além de aumentar a resposta de células Th1 nesses roedores em idades mais avançadas, suprimiu a produção antígeno-específica de Ig E e a liberação de histamina

por mastócitos, aumentando a atuação de macrófagos e alterando a dominância na resposta imune, passando ser de células Th1 em vez de células Th2. Assim, o efeito imunomodulatório da GR poderia ser usado futuramente para prevenir alergias ou mitigar os efeitos advindos de uma alergia. Por essas ações, a GR tem sido amplamente usada em cosméticos, como alimento de alta qualidade nutricional e como medicamentos em diversos países (KAMAKURA *et al*, 2001b).

1.2 MRJP1

A proteína *major royal jelly protein 1* (MRJP1) é a mais abundante proteína da GR, representando cerca de 48% das proteínas solúveis dessa secreção. Por eletroforese em gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), a MRJP1 foi identificada por Hanes e Simúth (1992) com uma massa de 55 kDa. O grupo identificou também, por isoeletrofocalização, pelo menos 8 variantes isoeletroforéticas dessa proteína, variando o *pI* entre 4,5 e 5, possivelmente resultantes de diferentes modificações pós-traducionais (PTM) ou de alelos polimórficos causando diferentes substituições de aminoácidos (SCHIMITZOVÁ *et al*, 1998). Contudo, Cruz e colaboradores (2011) obtiveram por eletroforese bidimensional 9 isoformas de MRJP1. Além das PTM, outra explicação sugerida é a variabilidade genética entre as colméias. A partir do cDNA, Ohasi e colaboradores (1997) previram que o gene descrito para MRJP1 transcreveria numa proteína com massa de 48,8 kDa (em uma sequência de 432 aminoácidos) ou então 47,1 kDa sem o peptídeo sinal. Essa diferença entre a massa prevista e a obtida (55 kDa) provavelmente deve-se à ligação de cadeias oligossacarídicas, uma vez que a proteína nativa tratada com N-glicosidase F apresentou uma banda em 47 kDa em um gel SDS-PAGE, massa molecular muito próxima da obtida para MRJP1 sem o peptídeo sinal (47,1 kDa) (OHASHI *et al*, 1997). De fato, a MRJP1 é uma glicoproteína ligada por estrutura de N-glicano (Man₉GLcNAc₂) (KIMURA *et al*, 2000).

Em estudos de caracterização, Simúth (2001) pôde observar que a MRJP1 interagia com o ácido 10-2-HDA, sugerindo que essa interação formava a maior parte da fração não solúvel em água da GR. A MRJP1 também se encontra na GR na forma monomérica e em diferentes formas oligoméricas. Sua estrutura secundária foi descrita

com 20% de α -hélices e 17,6% de folhas β do total de resíduos de aminoácidos (SIMÚTH, 2001).

Determinadas sequências individuais de peptídeos induzem, por forças não covalentes, mudanças conformacionais na estrutura da MRJP1, gerando espontaneamente interações intra- e intermoleculares, formando grandes e diferentes estruturas quaternárias (SIMÚTH, 2001).

Bilikova e colaboradores (2002) sugeriram que um peptídeo de 5,5 kDa, a apisimina, se liga fortemente a MRJP1, tal que o complexo MRJP1:apisimina tende a formar complexos oligoméricos. A apisimina é eluída conjuntamente com a MRJP1 na purificação de GR em cromatografia de troca iônica. Bilikova e colaboradores (2002) também evidenciaram a presença de MRJP1 em uma forma oligomérica de 420 kDa. Tamura e colaboradores (2009) relataram a existência de outras duas formas oligoméricas de 280 e 350 kDa. Por “Blue Native” (BN)/SDS-PAGE, identificaram que um complexo protéico de 290 kDa era composto por MRJP1:apisimina ligadas não covalentemente, sugerindo uma proporção de 5 MRJPs para 1 apisima. Além disso, determinaram que o oligômero era resistente a altas temperaturas, visto que a estrutura oligomérica era preservada em temperaturas de até 56°C.

A maioria das ligações não covalentes, até mesmo interações antígeno:anticorpo, são rompidas a essa temperatura. Por meio de testes de estabilidade, Simúth (2001) verificou que oligômeros de MRJP1 são menos susceptíveis a degradação, quando incubados a 37°C, comparados aos monômeros, sugerindo que a formação de oligômeros poderia aumentar a estabilidade relativa dos monômeros, evitando a degradação destes e um possível aumento na pressão osmótica produzida pelos aminoácidos, produtos da degradação.

Por meio de testes de termo-estabilidade avaliados por meio de dicroísmo celular, Cruz e colaboradores (2011) verificaram uma alta estabilidade da MRJP1, indicando que é uma proteína muito bem enovelada por muitas ligações não covalentes. Em tampão pH 7,0, a proteína mais abundante da GR não desnaturou quando aquecida de 20 até 95°C, nem mesmo quando adicionado cloreto de sódio para modificar a força iônica da solução ou hidrocloreto de guanidina para perturbar o ambiente da proteína, causando unicamente mudanças na estrutura secundária. Verificou-se somente a desnaturação da proteína quando adicionado 2 mM de cloreto de cálcio em soluções com temperatura igual ou maior que 82,8°C e com pH 4,0, 5,0, 6,0 ou 7,0.

Cruz e colaboradores (2011) também evidenciaram por espalhamento de luz dinâmico (DLS) a auto-associação e também a agregação de MRJP1 em solução. Quando em pH entre 6,0 e 7,0, há uma formação predominante de pentâmeros (~290 kDa), enquanto em pH entre 8,0 e 9,0, a proteína tende a formar hexâmeros (~340 kDa), indicando uma dependência de pH na formação de complexos. Em pH ácido (4,0-5,0), a proteína tende a se agregar. Essas massas moleculares aproximadas de complexos de MRJP1 já foram relatadas em outros trabalhos, corroborando os resultados (KIMURA *et al*, 2003; TAMURA *et al*, 2009).

A proteína MRJP1 é sintetizada por abelhas nutridoras (subcasta mais jovem da operária) na glândula hipofaríngea (HANES e SIMÚTH, 1992; KUBO *et al*, 1996), enquanto nas abelhas campeiras (ou forrageadoras, subcasta com idade mais avançada), a síntese continua no cérebro (KLAUDINY *et al*, 1994; OHASHI *et al*, 1997). Contudo, Kucharski e Maleszka (1998) evidenciaram a expressão do mRNA de MRJP1 no corpos cogumelares do cérebro de abelhas desde a emergência da larva até 22 dias após o nascimento, sendo que Garcia e colaboradores (2009) evidenciaram que a MRJP1 é mais expressa em cérebro de nutridoras. Quando comparadas por espectrometria de massa, as MRJP1 da GR e a do cérebro de abelha possuem identidade de sequência, apresentando apenas poucas diferenças por conta de modificações químicas como oxidações em certos resíduos de aminoácidos (CRUZ *et al*, 2011).

A MRJP1 pode manter alta viabilidade de culturas primárias de células de fígado de ratos. (KIMURA *et al*, 2000). Kamakura e colaboradores (2001b) verificaram que a MRJP1 aumenta a síntese de DNA em hepatócitos de ratos, sugerindo uma natureza mitogênica dessa proteína. Também prolongava a proliferação celular em culturas primárias desses hepatócitos. Além disso, eram capazes de acrescer a produção de albumina pelas células desses roedores quando comparadas com o grupo controle. Kimura e colaboradores (1995) também verificaram que o complexo de 350 kDa de MRJP1 estimulava a produção de monócitos humanos.

Recentemente foi evidenciado que o monômero de MRJP1 ou *royalactin* (*royal jelly-derived, hepatocyte-activating protein*, definido em KAMAKURA *et al*, 2001b) não possuía somente um efeito nutricional, sendo na verdade o principal fator ativo na diferenciação de castas da GR, induzindo a diminuição do tempo de desenvolvimento e aumento no tamanho da massa na fase adulta e tamanho do ovário (KAMAKURA, 2011). Curiosamente, o monômero de MRJP1 também induziu mudanças fisiológicas e

morfológicas em *Drosophila* fêmeas, lembrando o fenótipo de abelhas rainhas, também por um mecanismo semelhante ao destes insetos (KAMAKURA, 2011).

Usando a técnica de RNA de interferência, Kamakura (2011) nocauteou o gene responsável pela expressão do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) em *Apis mellifera*, e notou o tamanho do corpo e do ovário menor que o grupo controle, além de maior tempo de desenvolvimento até a fase adulta, sugerindo o EGFR como mediador da *royalactin* na diferenciação de castas. Também evidenciou que uma dieta contendo basicamente o oligômero de 450 kDa de MRJP1 não induziu ao desenvolvimento das larvas para abelhas rainhas. E, além disso, ainda descobriu que a *royalactin* induz uma longevidade prolongada em *Drosophila* via EGFR, indicando que essa proteína deve ser também responsável por longevidade prolongada em abelhas rainhas.

Não há qualquer informação sobre a estrutura terciária de MRJP1 na literatura. Nosso grupo tentou cristalizar MRJP1 a fim de se determinar sua estrutura terciária por difração de raios X. Entretanto, a tentativa de cristalização não produziu cristais de qualidade e tamanho suficientes para experimentos de cristalografia de raios X. A provável causa da falta de êxito foi a presença de formas oligoméricas diversas de MRJP1. Talvez, a presença de MRJP1 pura em solução e em sua forma monomérica, ou em uma única forma oligomérica, poderia levar a cabo o processo de cristalização.

Futuramente, com um maior domínio sobre as condições de oligomerização da proteína, talvez seja possível obtê-la em uma forma passível de cristalização e em quantidades suficientes para tal estudo.

1.3 Cromatografia de exclusão molecular

No presente trabalho, utilizamos técnicas cromatográficas, especialmente a cromatografia de exclusão molecular, para avançar no acúmulo adicional de conhecimentos sobre as características de estruturas quaternárias de MRJP1.

A cromatografia de separação de moléculas por tamanho pode ser encontrada na literatura com as denominações de cromatografia de permeação em gel, cromatografia por peneira molecular, cromatografia de difusão restrita, cromatografia de gel filtração, cromatográfica de exclusão molecular, entre outras. Está última, contudo, tem melhor denotação da técnica, uma vez que as matrizes utilizadas em colunas para esse fim não são necessariamente “géis”, além da técnica não filtrar a

amostra, e sim separá-la pelos seus tamanhos, ou como exemplificado, separar pelos seus volumes hidrodinâmicos (FUNASAKI, 1993; IRVINE, 1997; WINZOR, 2003).

Além de possuir diversos nomes para identificá-la, a cromatografia de exclusão molecular (CEM) também possui diversos usos. Alguns deles são separação de proteínas, ácidos nucleicos, polissacarídeos e outras macromoléculas biológicas diferentes em tamanho; determinação da massa molecular média; substituição de tampão da amostra; estudos de interação; dessalinização, entre outras separações de moléculas pequenas (IRVINE, 1997; RÖGNER, 1999; YU *et al*, 2006).

Na CEM, para haver a separação da amostra, a matriz precisa ser composta por uma fase porosa estática, e os diâmetros dos poros definidos, variando para cada tipo de matriz. Diz-se que uma separação é concluída quando a menor molécula é eluída. Nesse tipo de cromatografia, as maiores moléculas percorrem o caminho de eluição mais rapidamente que moléculas menores, uma vez que, por possuir maior tamanho, tais moléculas não conseguem penetrar nos poros da matriz, enquanto as moléculas menores vão percorrendo caminhos maiores (Figura 1). Em uma situação ideal, o tempo de retenção da molécula é proporcional à capacidade do volume do meio cromatográfico (GOTO e McCOY, 2000; KOSTANSKI *et al*, 2004; YU *et al*, 2006; FARNAN *et al*, 2009).

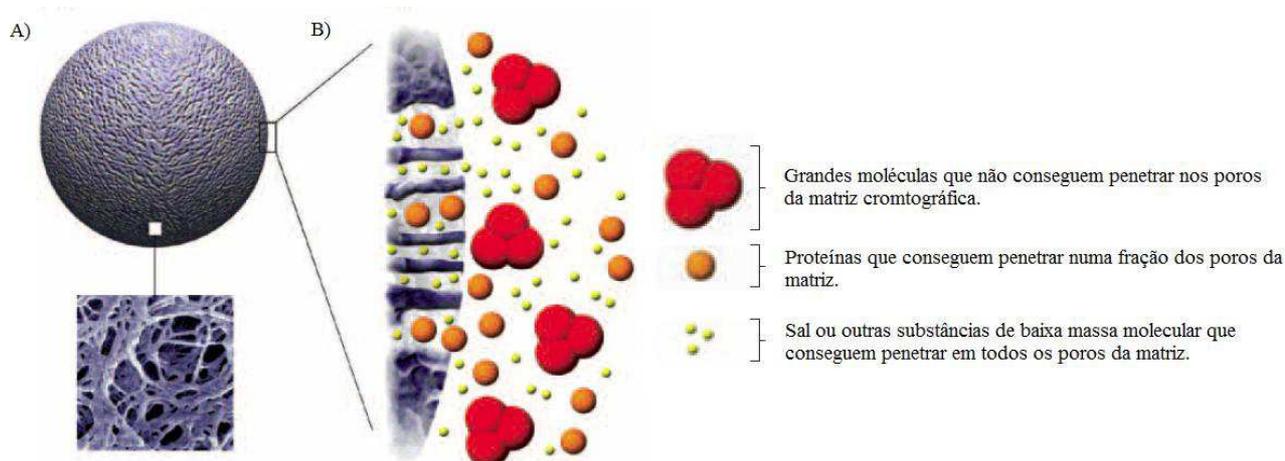


Figura 1. Processo de gel filtração. A) Figura esquemática de uma matriz com aumento de microscopia eletrônica. B) Exemplo esquemático de moléculas de diferentes tamanhos penetrando pelos poros da matriz. Figura retirada do manual de instruções da GE Healthcare “Gel Filtration: Principles and Methods”, disponível em <http://www.gelifesciences.com/superdex> (acesso: setembro/2012).

Mesmo sendo uma técnica muito utilizada, a CEM também possui suas desvantagens. No geral, possui uma baixa resolução, sendo que as proteínas precisam ter massas moleculares com de 1,5-2 vezes de diferença para uma melhor separação. As

colunas também possuem certo limite de separação, uma vez que proteínas com volumes hidrodinâmicos maiores que o maior poro da matriz e proteínas/peptídeos com volumes hidrodinâmicos menores que o menor poro são eluídas conjuntamente. As proteínas que interagem com a matriz da coluna têm o seu tempo de eluição alterado, super ou subestimando a sua massa molecular (RÖGNER, 1999; WINZOR, 2003; YU *et al*, 2006). CEM é mais utilizada que outras técnicas, como eletroforese, para se verificar o peso molecular das proteínas em suas formas nativas, além de ser útil para a troca de tampão ou para a purificação final de uma proteína, retirando impurezas e produtos de degradação, sendo muito útil para uma purificação final visando futuro processo de cristalização de uma proteína (RÖGNER, 1999).

2 Objetivos

Caracterizar a diversidade, distribuição e interconversão de monômeros e oligômeros da proteína MRJP1 de geleia real de *Apis mellifera* por cromatografia de exclusão molecular em diferentes condições, a fim de se aumentar o conhecimento sobre estrutura dessa proteína.

A caracterização de MRJP1 será conduzida:

- Na presença de surfactantes;
- Em pHs ácidos, neutro e básicos;
- Por recromatografia de frações oligoméricas e monoméricas;
- Sob diferentes temperaturas.

Serão realizadas purificações tentativas do monômero de MRJP1 em um único passo de cromatografia de troca iônica com auxílio do processo de ultrafiltração.

3 Materiais e Métodos

3.1 Purificação de MRJP1 por cromatografia líquida de troca iônica

O protocolo de purificação de MRJP1 foi desenvolvido por Cruz (2010). Alíquotas de 0,25 g de GR (Apivita, SP, Lote 0711) foram solubilizados em 1,1 mL de tampão A (Tris-HCl 0,5 M, pH 7,5), 60 µL de EDTA 0,2 M e inibidores de protease cOmplete Mini (Roche, Mannheim, Alemanha), agitada por 2 min e centrifugada a 16000 g em temperatura ambiente (~25°C).

Cerca de 500 µL do sobrenadante (~10 mg/mL) foram aplicados em uma coluna de troca aniônica Mono-Q (Pharmacia, Suécia) HR 10/10 previamente equilibrada com tampão A e acoplada em sistema ÄKTA Explorer (Amersham Biosciences, Reino Unido). A eluição foi realizada com fluxo de 1,5 mL/min, em um gradiente de NaCl de 0 até 1 M. O gradiente consistiu em: 0 min até 5 min com 0% de NaCl; 5 min até 6 min com aumento do gradiente de NaCl até 5%; 6 min até 15 min com NaCl isocrático; 15 min até 40 min com aumento de gradiente de NaCl até 30%; 40 min até 45 min com aumento de gradiente de NaCl até 100%; 45 min até 50 min com NaCl 1 M isocrático. O processo de eluição foi monitorado por absorção ótica a $\lambda = 280$ nm. Todos os tampões foram filtrados em membrana GSWP com poro de 0,22 µm (Millipore, EUA) e deaerados antes do uso.

As frações correspondentes a MRJP1 de diversas corridas foram reunidas. O “pool” foi então dialisado contra água destilada a 4°C e liofilizado (Liofilizador Liotop L101, Liobras, Brasil). A proteína foi analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) (seção 3.5 de Material e Métodos) para se verificar o grau de pureza.

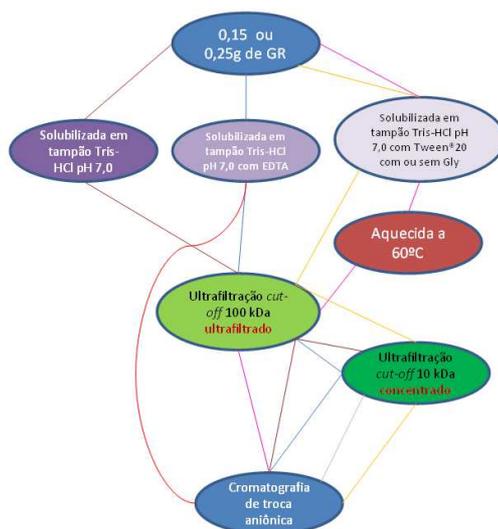
Algumas modificações no protocolo de purificação de MRJP1 por cromatografia líquida em ÄKTA Explorer ocorreram na tentativa de se obter um procedimento mais eficaz na obtenção de MRJP1 pura. As diferenças entre os protocolos e seus resultados são identificados ao longo do trabalho.

3.2 Ultrafiltração da GR

Como Kamukura e colaboradores (2001a) utilizaram o processo de ultrafiltração da GR para obter uma fração com menor quantidade de formas oligoméricas diferentes de MRJP1 em cromatografia de troca iônica, esta técnica foi testada neste trabalho.

Neste caso (Fluxograma 1), 0,15 ou 0,5 g de GR foram solubilizados em 2 mL de tampão de trabalho, com ou sem ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e inibidor de protease (também especificado nos resultados), podendo ser aquecida a 60°C. A solução foi agitada por 2 min e centrifugada a 16000 g. O sobrenadante foi centrifugado por 40 min a 5000 g em tubos de filtração Amicon® Ultra-4, *cut-off* 100 kDa (Millipore) obtendo-se aproximadamente 50 µL de concentrado.

Fluxograma 1. Estratégias de purificação de MRJP1



O ultrafiltrado seguia então por dois caminhos: (1) era centrifugado a 16000 g por 10 min e 500 µL do sobrenadante aplicados em cromatografia de troca aniônica (sistema FLPC e coluna Mono-Q), ou (2) era concentrado até 500 µL centrifugando-o a 5000 g em Amicon® Ultra-4, *cut-off* 10 kDa. O concentrado era então centrifugado a 16000 g por 10 min e então utilizado em cromatografia de troca aniônica em sistema FPLC e coluna Mono-Q (Pharmacia, Suécia).

3.3 Ultrafiltração de MRJP1 na presença de diferentes surfactantes

Sete amostras de 0,1 mg de MRJP1 foram solubilizadas em 1 mL de tampão carbonato/bicarbonato 20 mM, pH 10,0. Brij 35, Tween® 20 ou dodecil sulfato de sódio (SDS) (Thermo Scientific, EUA) foram adicionados separadamente a cada amostra na concentração final de 0,1 ou 1%, 0,2 ou 2% e 0,1 ou 1% respectivamente, restando uma amostra sem adição de detergente para controle. As amostras foram agitadas em vórtex por 2 min.

Todas as amostras e o grupo controle foram centrifugados por 40 min a 5000 g em Amicon® Ultra-4, *cut-off* 100 kDa, temperatura ambiente, restando aproximadamente 50 µL de concentrado. O ultrafiltrado foi então centrifugado a 5000 g em Amicon® Ultra-4, *cut-off* 10 kDa, também em temperatura ambiente, obtendo-se 500 µL de concentrado. A concentração das proteínas foi determinada por *BCA Protein Assay Kit* (Thermo Scientific), utilizando como padrão a diluição seriada de 0,625, 1,25, 2,5, 5, 10, 20 e 40 µg/mL de albumina de soro bovino (BSA) em tampão carbonato/bicarbonato 20 mM, pH 10,0.

3.4 Cromatografia de exclusão molecular

3.4.1 Caracterização das formas de MRJP1 por cromatografia de exclusão molecular

Amostras de MRJP1 foram solubilizadas em soluções tampões com diferenças de pH e força iônica, em presença ou ausência de glicina e detergentes e eluídas por cromatografia de exclusão molecular a fim de observar o comportamento de monomerização/oligomerização das amostras de MRJP1. Os diferentes tampões estão descritos na Tabela 1.

Todas as cromatografias, contudo, seguiram um mesmo protocolo: 2 ou 5 mg da proteína solubilizada em 500 µL de tampão, aquecida ou não por 10 min, a 60°C (especificado nos resultados) eram aplicados em coluna de resina Superdex® 200 (GE Healthcare, Suécia), 10 x 300 mm, de 24 mL acoplada em sistema ÄKTA Explorer (Amersham Biosciences, Reino Unido) ou em sistema FPLC (Pharmacia, Suécia). A coluna já havia sido previamente equilibrada com tampão de acordo com o protocolo

sugerido pela própria empresa (dois volumes de coluna). A eluição foi realizada em fluxo constante de 0,5 mL/min, sendo o processo de cromatografia conduzido em temperatura ambiente e acompanhado por absorção óptica a 280 nm. Todos os tampões foram filtrados em membrana 0,22 µm e deaerados antes do uso.

Foram utilizados para calibração blue dextran 2000 (2000 kDa), tireoglobulina (669 kDa), ferritina (450 kDa), albumina de soro bovino (BSA) (67 kDa), ovalbumina (45 kDa), citocromo C (12 kDa). A cromatografia das proteínas calibrantes foi realizada nas mesmas condições que as cromatografias da proteína (mesmo fluxo, absorção ótica, tampão e coluna). Obteve-se uma curva de calibração entre o coeficiente de partição K_{av} contra o log da massa molecular dos calibrantes, sendo que:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_c - V_o}$$

V_e = volume de retenção da proteína

V_o = volume vazio da coluna

V_c = volume geométrico da coluna

Tabela 1. Tampões testados em cromatografia de exclusão molecular

Tampão	Amostra aquecida 60°C, 10min	
	Não	Sim
Ácido Cítrico/Citrado de Sódio 0,05 M, Gly 0,5 M, pH 3,5	X	
Ácido Cítrico/Citrado de Sódio 0,05 M, pH 3,5	X	
Carbonato/Bicarbonato de Sódio 0,02 M, pH 10,0	X	
Carbonato/Bicarbonato de Sódio 0,02 M, Gly 0,5 M, pH 10,0	X	X
Carbonato/Bicarbonato de Sódio 0,02 M, SDS 0,1% (v/v), pH 10,0	X	
Carbonato/Bicarbonato de Sódio 0,02 M, SDS 0,5% (v/v), pH 10,0	X	
Carbonato/Bicarbonato de Sódio 0,02 M, SDS CMC*, pH 10,0	X	
PBS** 0,02 M, pH 7,0	X	
PBS 0,02 M, Gly 0,5 M, pH 7,0	X	
PBS 0,02 M, pH 11,5	X	
PBS 0,02 M, Gly 0,5 M, pH 11,5	X	
Tris-HCl 0,05 M, NaCl 1 M, pH 7,5	X	
Tris-HCl 0,05 M, Gly 0,5 M, pH 7,5	X	
Tris-HCl 0,05 M, Gly 1 M, pH 7,5	X	
Tris-HCl 0,05 M, Gly 2 M, pH 7,5	X	
Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5	X	
Tris-HCl 0,05 M, Tween® 20 0,2% (v/v), pH 7,5	X	
Tris-HCl 0,05 M, Tween® 20 0,5% (v/v), Gly 1 M, pH 7,5	X	X
Tris-NaOH 0,05 M, Gly 1 M, pH 10,0	X	X

* Concentração Crítica Micelar = 6 a 8 mM

** Tampão fosfato de sódio salino

3.4.2 Análise do efeito da temperatura sobre a oligomerização de MRJP1

Amostras de 5 mg de MRJP1 foram solubilizadas em 500 μ L de tampão carbonato/bicarbonato de sódio 20 mM, pH 10,0 e eluída com o mesmo tampão em cromatografia de exclusão molecular e de acordo com o protocolo descrito na sessão 3.4.1 de Materiais e Métodos sem aquecimento das amostras.

A fração do monômero de MRJP1 foi coletado e dividido em quatro alíquotas iguais com volume aproximado de 500 μ L. Cada alíquota passou 24 h a -22°C , 4°C , temperatura ambiente ($\sim 25^{\circ}\text{C}$) ou 65°C . Ao final das 24 h, as amostras foram reinjetadas separadamente em cromatografia de exclusão molecular com tampão de eluição carbonato/bicarbonato 20 mM, pH 10,0 e seguindo o protocolo descrito na sessão 3.4.1 de Materiais e Métodos sem mais quaisquer tratamentos nas amostras.

3.5 Eletroforese desnaturante em gel poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

O perfil de proteínas das frações foi analisado em SDS-PAGE utilizando o sistema descontínuo de Laemmli (1970), em equipamento Hoefer (San Francisco, CA, EUA). Os géis foram preparados em concentração fixa de 10% de mistura acrilamida/bis-acrilamida (28,5:1,5) com espessura de 0,75 mm. Para a separação em gel, as amostras foram dissolvidas em tampão de amostra Laemmli (1970) [Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, SDS 2% (w/v), glicerol 10% (v/v), DTT 100 mM e bromofenol 0,01% (w/v)].

A separação eletroforética dos polipeptídeos foi conduzida em tampão Tris 25 mM pH 8,5; glicina 0,192 M; SDS 0,1% (w/v), sob corrente constante de 25 mA. A temperatura foi mantida com circulação de água a $19-20^{\circ}\text{C}$, por banho termostatizado. Os géis foram corados com nitrato de prata (BLUM *et al.*, 1987).

Como marcadores de massa molecular, foram utilizados: fosforilase b (97,0 kDa), soroalbumina bovina (66,0 kDa), ovoalbumina (45,0 kDa), anidrase carbônica (30,0 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactalbumina (14,4 kDa).

3.6 Digestão proteolítica *in gel*

Frações específicas obtidas da purificação com tampão de interesse foram dializadas contra água bi-destilada (temperatura ambiente) e secas em concentrador de amostras Speed Vac (Savant, Farmingdale, NY, EUA) sob pressão de vácuo.

Cada fração foi então ressuspensa em 50 µL de bicarbonato de amônio 50 mM, DTT 20 mM. As soluções foram incubadas a 37°C por 45 min. Após a incubação, foi adicionada acrilamida na concentração final de 60 mM. As soluções foram mais uma vez incubadas a 37°C por 45 min. Ao final, tripsina de grau de sequenciamento (Promega, Madison, WI, EUA) foi adicionada numa proporção de 1:50, incubada por 10 h a 37°C. A reação foi interrompida com a adição de TFA numa concentração final de 0,5%.

Dez microlitros de cada solução foram separados, os peptídeos digeridos foram dessalinizados e concentrados em ponteiros ZipTips® C₁₈ (Millipore), 1 µL da amostra foi aplicado no halo de placa do tipo AnchorChip (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) para espectrometria de massa e deixados secar ao ar. Então, 1 µL de solução de matriz recém-preparada (ácido α-ciano-4-hidróxi-cinâmico -CHCA- 0,5 µg/µL em acetonitrila 90% (v/v) e TFA 0,1% (v/v)) foi aplicado ao mesmo halo e deixado secar ao ar.

3.7 Espectrometria de massa (MS) e identificação de proteínas por “Peptide Mass Fingerprinting” (PMF)

As amostras foram analisadas em um espectrômetro de massa Autoflex II MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics). A calibração externa foi realizada utilizando um “kit” de peptídeos padrão fornecido por Bruker Daltonics (Peptide calibration standard (1000–3200 Da): angiotensina II, angiotensina I, substância P, bombesina, ACTH clip 1-17, ACTH clip 18-39, somatostatina 28).

Espectros de massas foram obtidos em modo refletido positivo para os peptídeos, utilizando o programa FlexControl v. 2.4 (Bruker Daltonics). O programa FlexAnalysis v. 2.4 (Bruker Daltonics) foi utilizado para adquirir e editar as listas de picos. Tais listas foram utilizadas para buscas contra o banco de dados de proteínas do

NCBI (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, EUA) usando BioTools v. 2.0 (Bruker Daltonics) acoplado ao programa Mascot v. 2.1 ou 2.2 (<http://www.matrixscience.com/>) (PERKINS *et al.*, 1999). As massas monoisotópicas dos peptídeos trípticos foram utilizadas para identificar as proteínas por “Peptide Mass Fingerprinting” (PMF) apenas em modo MS.

A tolerância de erro de massa molecular estabelecida para os peptídeos foi menor que 100 ppm e nenhuma restrição foi imposta para massa molecular de proteína ou para qualquer linhagem filogenética. Estabeleceu-se oxidação de metionina como modificação variável e propionamidação de cisteína (alquilação com acrilamida) como modificação fixa. Os possíveis sítios de clivagem perdidos foram estabelecidos como zero ou, no máximo, um. Identidades foram consideradas significativas se o escore de identificação de proteína ultrapassasse o limiar variável calculado pelo programa Mascot, assumindo valor de $p < 0,05$

4 Resultados e Discussão

4.1 Purificação de MRJP1

A fim de se obter MRJP1 para os experimentos de caracterização, utilizou-se um método anteriormente desenvolvido no laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas da Universidade de Brasília durante o doutorado de Gabriel Cruz (CRUZ, 2010; CRUZ *et al*, 2011). O sobrenadante de GR solubilizada foi aplicado e fracionado em cromatografia de troca iônica (Figura 2). O gradiente de NaCl foi o descrito na sessão 3.1 de Materiais e Métodos, com a fração de MRJP1 sendo eluída na concentração de 0,3-0,4 M de NaCl. Duas frações de interesse foram coletadas. Anteriormente, tais frações já haviam sido identificadas por meio de espectrometria de massa, sendo a primeira MRJP2 e a segunda MRJP1 (CRUZ *et al*, 2011). Para se verificar o grau de pureza de MRJP1, a proteína foi submetida a SDS-PAGE (Figura 3).

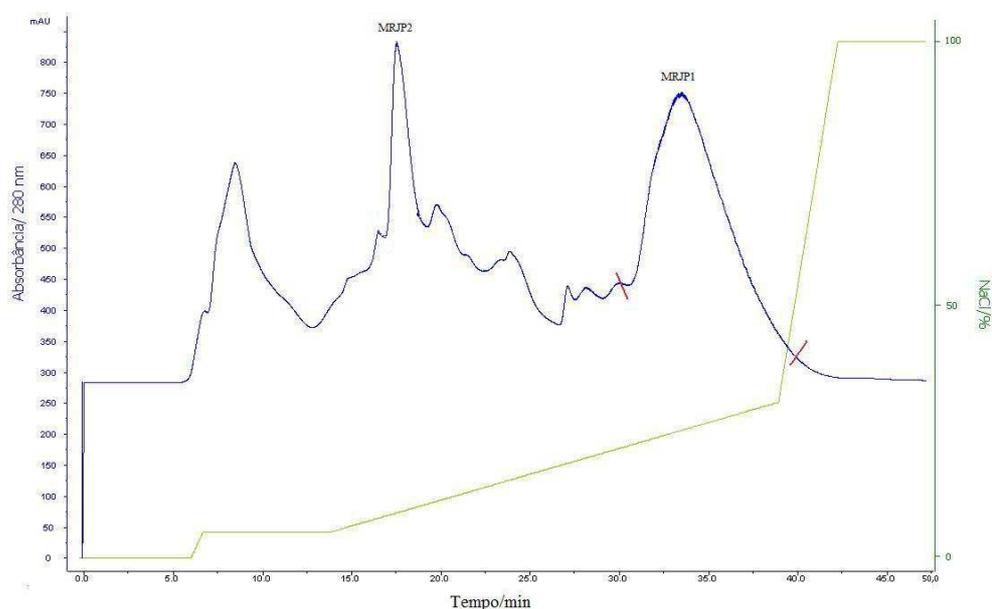


Figura 2. Perfil cromatográfico de purificação de MRJP1 por cromatografia de troca aniônica. Cromatografia da fração solubilizada de geléia real em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5. A linha verde indica a concentração de NaCl (0 - 1 M) ao longo da corrida. Os traços vermelhos limitam as frações coletadas de MRJP1 ao longo da eluição acompanhada por absorção ótica a $\lambda = 280$ nm.

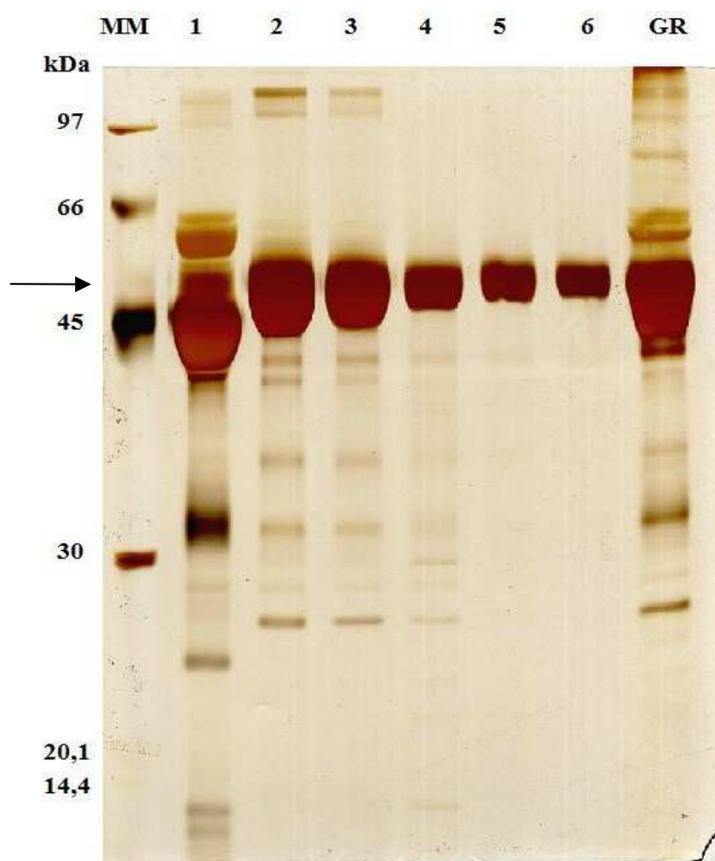


Figura 3. SDS-PAGE das frações de MRJP1 acumuladas em cromatografia de troca aniônica. Gel de poliacrilamida 10%. MM, marcador molecular; 1, fração não ligada na cromatografia; poços de 2-6: respectivamente 15, 10, 7, 5 e 3 µg de MRJP1, respectivamente; GR, 15 µg de extrato de geléia real. As bandas abaixo da MRJP1 bem visíveis em 2, 3 e 4 são fragmentos de MRJP1 degradada. A seta indica a localização da MRJP1 (55 kDa). Coloração com nitrato de prata.

Na literatura (BILIKOVA *et al*, 2002; TAMURA *et al*, 2009), já havia sido sugerido que MRJP1 se ligava não covalentemente à proteína de 5,5 kDa apisimina, sendo que essa proteína de alguma forma influenciava na oligomerização de MRJP1. Bilikova e colaboradores (2002) utilizaram 0,1 M de glicina no tampão de eluição em cromatografia de troca aniônica, conseguindo uma fração pura de apisimina, provavelmente dissociada dos oligômeros de MRJP1. Tendo essas informações, 0,1 M de glicina foram adicionados em todos os tampões utilizados para a preparação do extrato de GR e para a cromatografia de troca aniônica (Figura 4A), visando uma dissociação entre MRJP1 e apisimina com intuito de tentar favorecer a obtenção do monômero de MRJP1.

Aparentemente, nenhuma grande alteração ocorreu na fração correspondente a MRJP1, apesar de frações minoritárias (não identificadas por espectrometria de massa) aparecerem (circulados na Figura 4A) ao final da cromatografia. O protocolo adotado com tampão de eluição contendo glicina 0,1 M não visivelmente separou apisimina da

MRJP1, não sendo esse método adequado para obtenção de MRJP1 em uma única forma nativa.

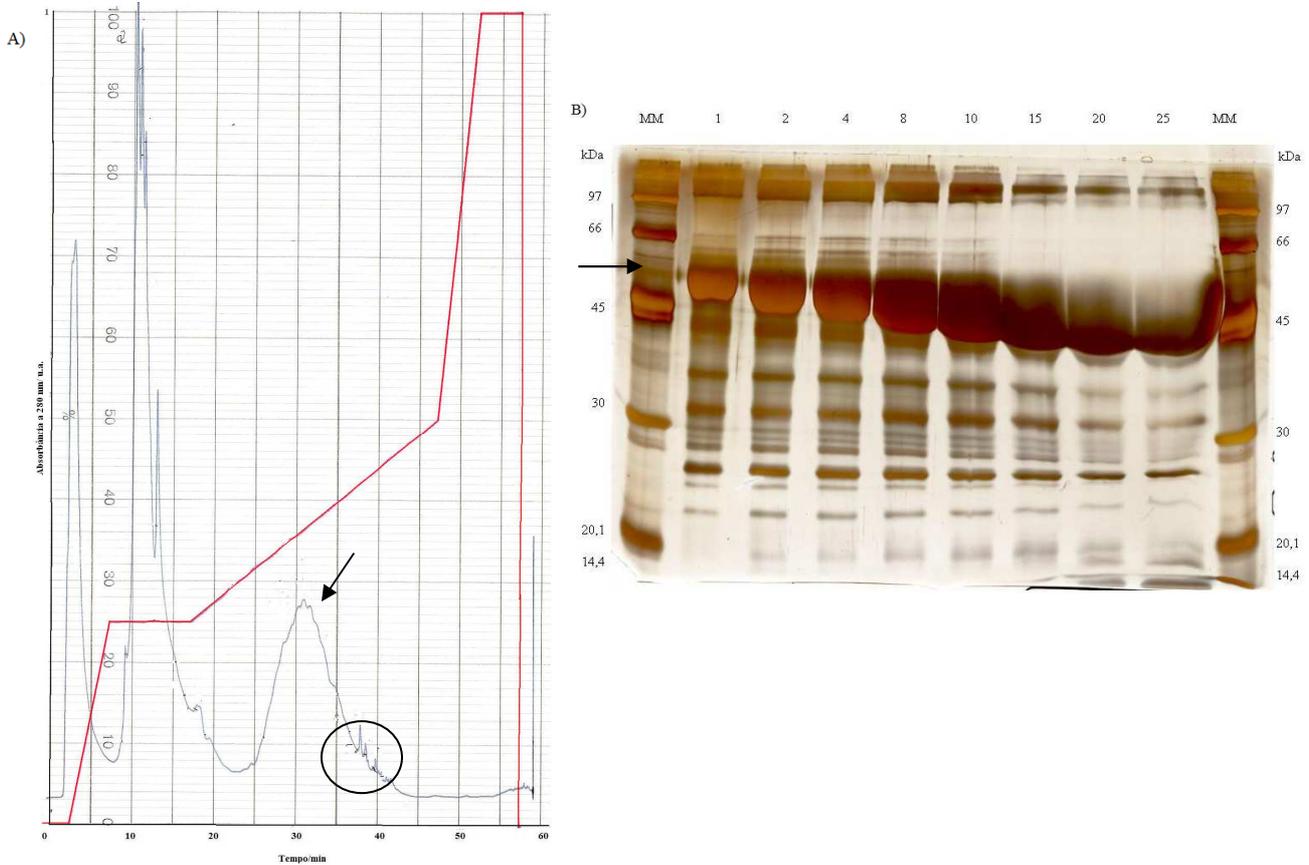


Figura 4. Novo método de cromatografia de troca aniônica visando separar a apisimina. Tampão de eluição: Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5, Gly 0,1 M. Seta indica a fração de MRJP1. O círculo identifica frações minoritárias submetidas, mas não identificados por espectrometria de massa. Linha vermelha indica padrão de concentração de NaCl 0-1 M em tampão A (0-5 min, ausência de NaCl; 5-10 min, NaCl 25%; 10-20 min, NaCl isocrático; 20-50 min, NaCl 50%; 50-55 min, NaCl 100%; 55-60 min, NaCl isocrático). Linha azul representa eluição acompanhada por absorção ótica a $\lambda = 280$ nm. B) Gel de poliacrilamida 10%. MM = marcador molecular. 1, 2, 4, 8, 10, 15, 20 e 25 = concentração em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de MRJP1 aplicada em cada respectivo poço do gel. Seta indica as bandas de MRJP1. Coloração com nitrato de prata.

A Figura 4B apresenta um gel de poliacrilamida de fração de MRJP1 coletada na cromatografia apresentada na Figura 4A. É possível se verificar a purificação de MRJP1 conjuntamente com outras proteínas presentes em pequenas quantidades. As bandas que aparecem nos mesmos poços de MRJP1, como visto na Figura 3, provavelmente são fragmentos ou associações de MRJP1

A fração cromatográfica indicada na Figura 4A foi coletada e submetida à espectrometria de massa (Figura 5). Na Figura 5A, é possível notar a presença de uma fração de aproximadamente 5,5 kDa, o que indica que não houve a separação de

apisimina da MRJP1. A Figura 5B apresenta o espectro de massas de MRJP1 digerida e sua identificação pelo programa Mascot.

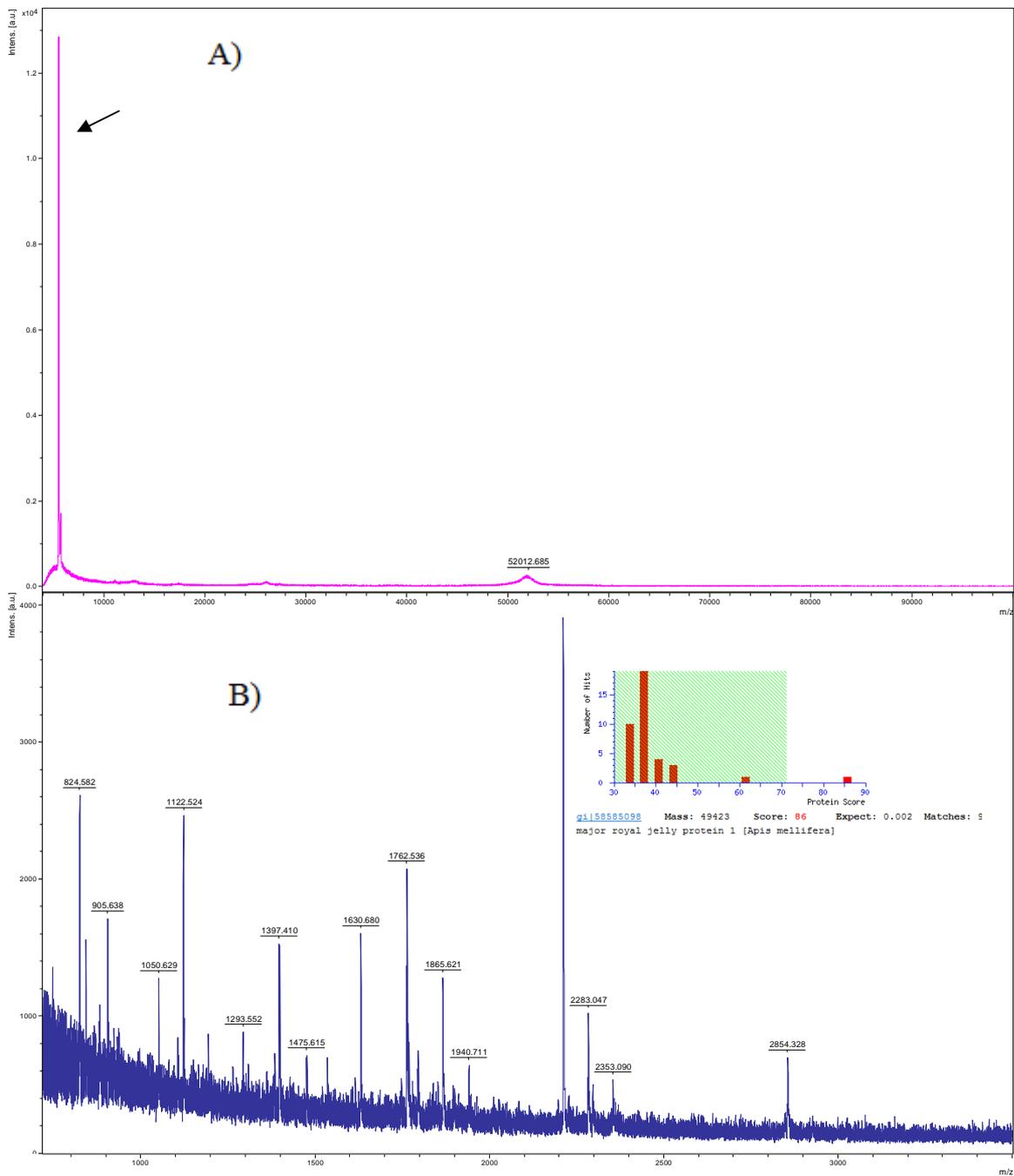


Figura 5. Espectrometria de massa da fração coletada na Figura 4A. A) Espectro massas de MRJP1 não digerida. Seta indica uma fração de aproximadamente 5,5 kDa. B) Espectro de massas da fração digerida de MRJP1 e sua identificação.

4.2 Ultrafiltração das amostras de GR em tampões contendo surfactantes

Surfactantes podem alterar as características de interação entre proteínas (UGWU e APTE, 2004). Sabendo que a MRJP1 forma oligômeros, surfactantes foram adicionados à solução contendo 100 µg/mL de MRJP1 em tampão pH 10,0, visando à possível dissociação dos oligômeros até monômeros na forma nativa de MRJP1, uma vez que os detergentes poderiam dissociar proteínas por alteração da conformação e desnaturação da proteína.

Os surfactantes selecionados foram Brij 35 e Tween® 20 (detergentes não iônicos), além de SDS (detergente iônico), foram adicionados em concentrações diferentes para se verificar a possível influência desses tensoativos sobre a proteína MRJP1. As absorvâncias de BSA diluída em série (Figura 6) foram utilizadas para se definir a curva padrão para comparação com as absorvâncias a 562 nm das amostras com surfactantes de MRJP1 (Tabela 2).

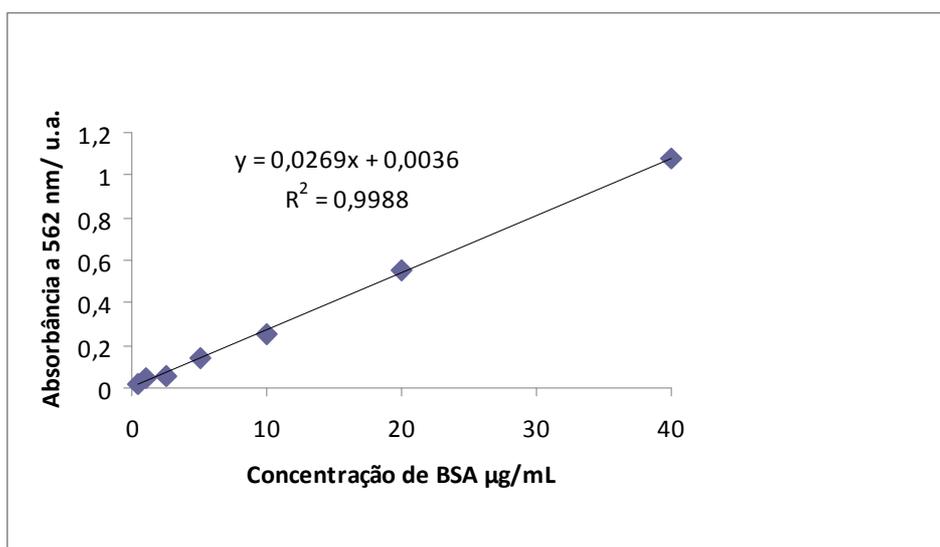


Figura 6. Curva padrão de BSA obtida pelo método BCA. Diluição seriada de 0,625, 1,25, 2,5, 5, 10, 20 e 40 µg/mL de BSA em tampão carbonato/bicarbonato 0,02 M, pH 10,0. Absorção ótica a $\lambda = 562$ nm.

Tabela 2. Concentração de MRJP1 em presença de Brij 35, SDS e Tween® 20 .

Surfactante	Concentração do Surfactante (%)	Concentração Final da Proteína (µg/mL)
Brij 35	0,1	21,46
Brij 35	1	16,63
SDS	0,1	14,39
SDS	1	9,8
Tween® 20	0,2	22,32
Tween® 20	2	18,65
Controle	0	10,09

Contudo, as concentrações de todas as amostras de MRJP1 em contato com os surfactantes foram baixas em comparação ao grupo controle. Quanto maior a concentração de surfactante, menor a concentração final de MRJP1. Provavelmente o número de interações entre moléculas de surfactante e moléculas de proteína tenha aumentado, causando um incremento na massa total do complexo. Uma vez que o complexo ultrapassasse 100 kDa, não passaria pela primeira ultrafiltração com *cut-off* de 100 kDa, diminuindo o número de moléculas protéicas no ultrafiltrado e, conseqüentemente, a concentração medida da proteína. Outras hipóteses para se explicar a baixa concentração final de MRJP1 poderia ser o efeito desnaturante do detergente, impedindo o processo de ultrafiltração da proteína, ou então uma possível interferência causada pelo detergente na leitura, subestimando a concentração final de MRJP1.

O processo de ultrafiltração com membranas de *cut-off* de 100 e 10 kDa selecionaria proteínas com massa entre 10 e 100 kDa, o que inclui o monômero de MRJP1. Os resultados não foram positivos, uma vez que, mesmo havendo um aumento na concentração final de MRJP1 em quase todas as amostras, esse aumento foi relativamente pequeno se comparado a quantidade inicial de MRJP1 (100 µg/mL).

4.3 Cromatografia de exclusão molecular de MRJP1 em diferentes condições

Sabendo das diversas formas oligoméricas já descritas de MRJP1, uma possível solução para separá-las seria o uso da técnica de cromatografia de exclusão molecular, visando a separar as proteínas pela sua massa molecular.

Sabendo que o ponto isoelétrico (pI) da MRJP1 varia entre 4,5-5, uma acidificação ou basificação no pH do tampão poderia modificar a carga elétrica total da proteína, tornando-a incapaz de interagir com outras proteínas até mesmo com outras MRJP1 em função de repulsão ou até mesmo modificação na sua estrutura terciária. A adição de sais, tensoativos ou o aquecimento da amostra modificaria o ambiente da MRJP1, podendo alterar o comportamento de auto-associação desta proteína. Dessa forma, diversas condições de preparação de amostra e de cromatografia de exclusão molecular foram testadas.

Com o objetivo de se obter um perfil cromatográfico padrão de MRJP1, a primeira separação cromatográfica foi eluída com tampão A (Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5) sem glicina (Figura 7A), tampão comumente utilizado na etapa de purificação. Nessas condições, a fração contendo um componente molecular com cerca de 120 kDa foi separado de outro com aproximadamente 300 kDa. Devido à massa aproximada, o componente molecular de 120 kDa poderia ser o dímero de MRJP1 (monômero com 55 kDa) enquanto o de 300 kDa poderia ser o oligômero já descrito na literatura com 290 kDa (TAMURA *et al*, 2009). A Figura 7B apresenta a curva de calibração da coluna de exclusão molecular, sendo os calibrantes eluídos em mesmo tampão e condições que na Figura 7A. O tempo de retenção e Kav das proteínas eluídas estão indicados na caixa interna da Figura 7B.

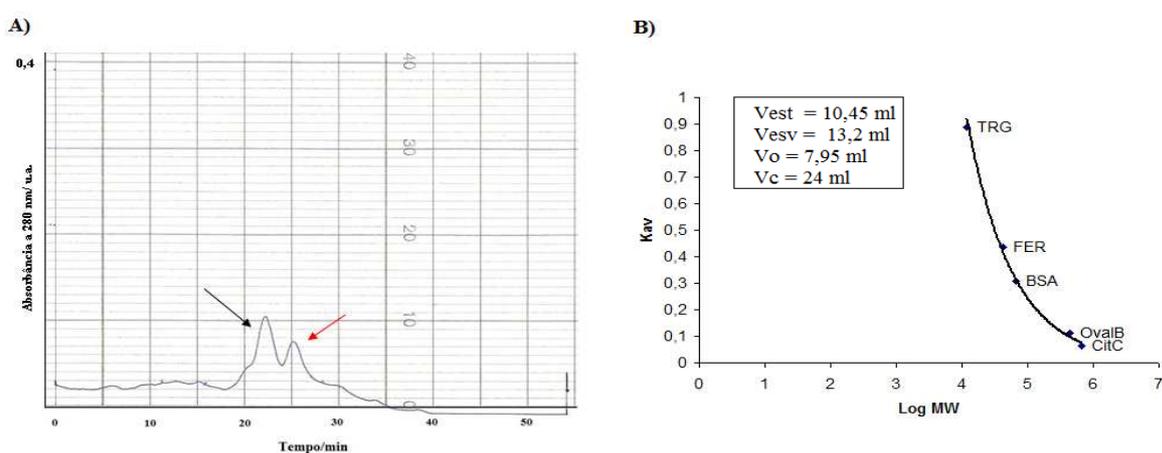


Figura 7. Cromatografia de exclusão molecular de MRJP1 em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5. A) Dois miligramas de MRJP1 diluídos em 500 μ L foram injetados em coluna Superdex 200 (GE Helathcare) para separação de massa molecular. A seta preta indica uma massa de \sim 300 kDa e a seta vermelha indica \sim 120 kDa. Tampão de eluição Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5. Eluição acompanhada por absorção ótica a $\lambda = 280$ nm. B) Curva de calibração, com calibrantes eluídos nas mesmas condições que em (A). Vest = volume de retenção da proteína indicada pela seta preta. Vesv = volume de retenção da proteína indicada pela seta vermelha. Vo = volume vazio da coluna, medido com Blue Dextran 2000 (2000 kDa). Vc = volume geométrico da coluna. TRG = tireoglobulina (669 kDa), FER = ferritina (450 kDa), BSA = albumina do soro bovino (67 k Da), OvalB = ovalbumina (45 kDa) e CitC = citocromo C (12 kDa).

Em resumo, a Tabela 1 apresenta todos os tampões utilizados para se caracterizar estruturalmente a MRJP1 em diversas condições. O tampão ideal para o presente objetivo seria o que mantivesse a proteína em uma única forma monomérica ou oligomérica e não desnaturada.

As Figuras 8-22 reproduzem os cromatogramas de exclusão molecular de MRJP1 em diferentes condições.

A Figura 8 representa o cromatograma de MRJP1 em tampão salino. A adição de 1 M de cloreto de sódio (NaCl) em tampão pH 7,5 fez com que a proteína se oligomerizasse ou agregasse. A massa molecular do complexo da maior fração não pôde ser calculada, uma vez que o oligômero ou agregado tinha massa maior que a massa molecular do maior calibrante (tireoglobulina, 669 kDa), ultrapassando a curva de calibração nessas condições.

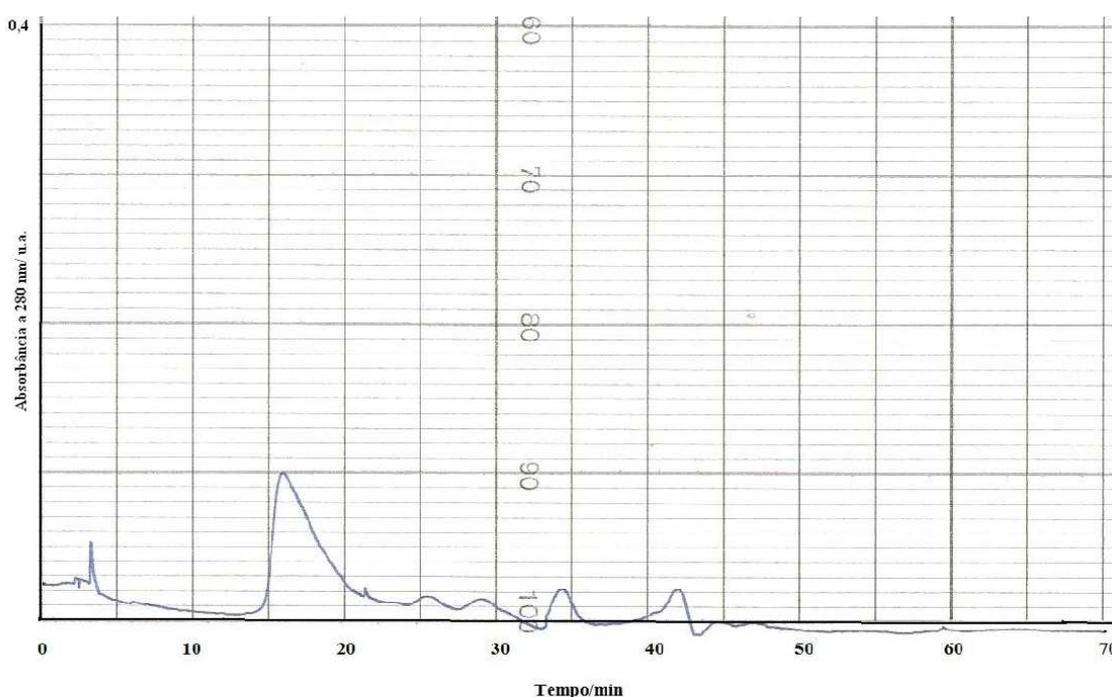


Figura 8. Cromatografia de exclusão molecular de MRJP1 em tampão salino. Dois miligramas de proteína foram injetados em coluna Superdex 200 (GE Healthcare). O maior pico representa uma forma agregada de MRJP1. O tampão de eluição foi Tris-HCl 0,05 M, NaCl 1 M, pH 7,5. Eluição acompanhada por absorção ótica a $\lambda = 280$ nm.

As Figuras 9, 10 e 11 apresentam o perfil cromatográfico de MRJP1 eluída em tampões com concentrações crescentes de glicina (0,5, 1 e 2 M, respectivamente). De acordo com Bilikova e colaboradores (2002), a presença de glicina no tampão de

eluição em cromatografia de troca iônica consegue dissociar apisimina de MRJP1. Tamura e colaboradores (2009) sugeriram a apisimina como fator que favorece a associação de monômeros de MRJP1 a formar oligômeros de diferentes massas moleculares. Devido a essa informação da literatura, a glicina foi adicionada aos tampões, uma vez que a dissociação da apisimina de oligômero de MRJP1 poderia levar a dissociação dos oligômeros inteiros até monômero.

Provavelmente por erro de quantificação, de dissolução ou de fixação da sensibilidade do detector, o perfil cromatográfico de MRJP1 na Figura 9 ficou atenuado em comparação ao da Figura 10. Contudo, é possível observar que há frações coincidentes nas duas cromatografias nos tempos aproximados de 15,5 min, 22,5 min e 26 min (frações 1, 3 e 4 da Figura 10), revelando que não há diferenças marcantes no uso de 0,5 ou 1 M de glicina em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5. As massas moleculares calculadas para as frações identificadas pelos números de 1 a 5 na Figura 10, incluindo confirmações da identidade de MRJP1 por espectrometria de massa, estão apresentadas na Tabela 3.

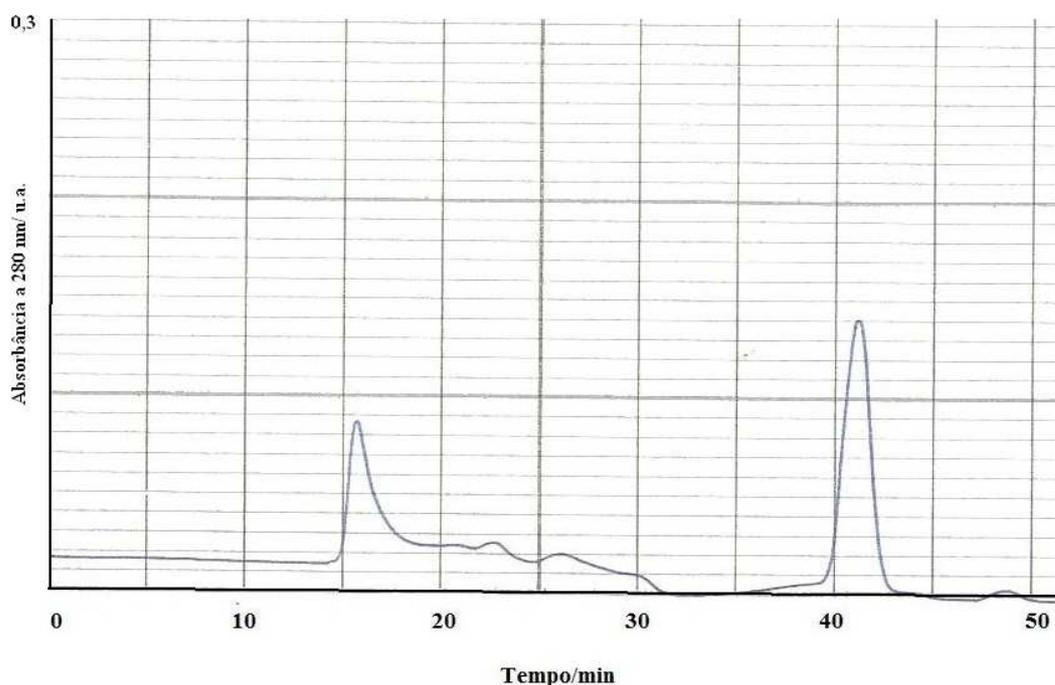


Figura 9. Cromatografia de exclusão molecular de MRJP1 em tampão Tris- HCl 0,05 M, pH 7,5 com Gly 0,5 M. Dois miligramas de MRJP1 foram injetados na coluna Superdex 200 (GE Healthcare). Tampão de eluição Tris-HCl 0,05 M, Gly 0,5 M, pH 7,5. Eluição acompanhada por absorção ótica a $\lambda = 280$ nm.

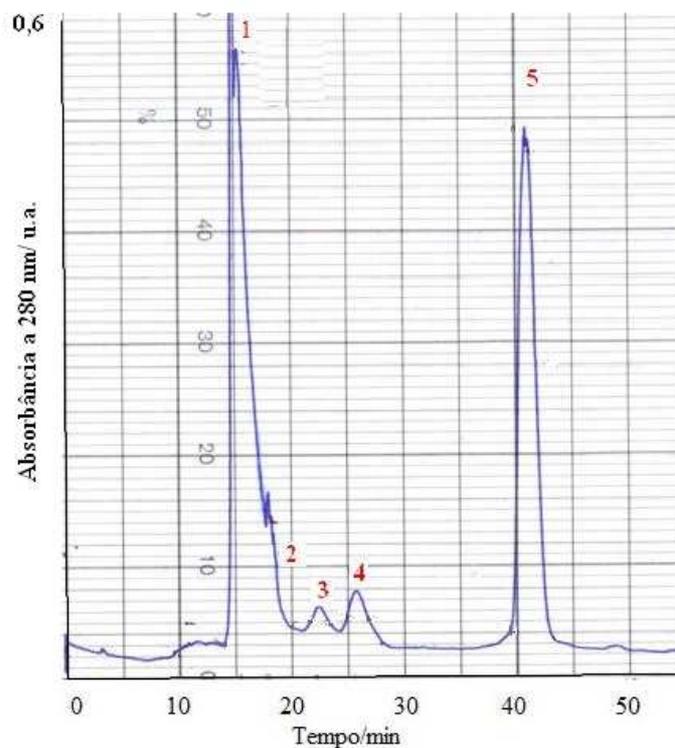


Figura 10. Cromatografia de exclusão molecular de MRJP1 em Tris- HCl 0,05 M, pH 7,5 com Gly 1 M. Dois miligramas de MRJP1 foram injetados na coluna Superdex 200 (GE Healthcare). Os números em vermelho indicam as frações coletadas e analisadas por espectrometria de massa (Tabela 3). Tampão de eluição Tris-HCl 0,05 M, Gly 1 M, pH 7,5. Eluição acompanhada por absorção ótica a $\lambda = 280$ nm.

Tabela 3. Identidade de proteínas associadas às frações 1-5 (Figura 8), separadas em cromatografias de exclusão molecular. Frações de proteínas analisadas por MALDI-TOF/TOF e identificadas por buscas no banco de dados de proteínas não-redundante NCBI usando Mascot.

Fração	Massa (Obs.) kDa	Proteína identificada	Organismo / ID da proteína	Mr (Teor.) kDa
1	> 669	major royal jelly protein 1	<i>Apis mellifera</i> / gi 58585098	49,423
2	600	major royal jelly protein 1	<i>Apis mellifera</i> / gi 58585098	49,423
3	300	major royal jelly protein 1	<i>Apis mellifera</i> / gi 58585098	49,423
4	120	major royal jelly protein 1	<i>Apis mellifera</i> / gi 58585098	49,423
5	< 12	(não identificada)*	-	-

*Provavelmente apisimina.

A concentração de 2 M de glicina (Figura 11) aparentemente forçou uma oligomerização ou agregação de MRJP1, formando complexos eluídos praticamente no volume vazio da coluna. O uso de concentrações altas de glicina em outros experimentos foi descartado.

Nas três Figuras (9, 10 e 11), o perfil cromatográfico é visivelmente diferente do perfil da Figura 7. A fração próxima aos 40 min em todas essas três Figuras poderia ser apsimina (5,5 kDa). Contudo a massa destas frações não pôde ser estimada, visto que a massa molecular das moléculas desta fração era menor que o menor calibrante (citocromo C, 12,5 kDa). Devido à provável dissociação de apsimina da MRJP1, a glicina nas concentrações 0,5 ou 1 M foi utilizada em outros experimentos.

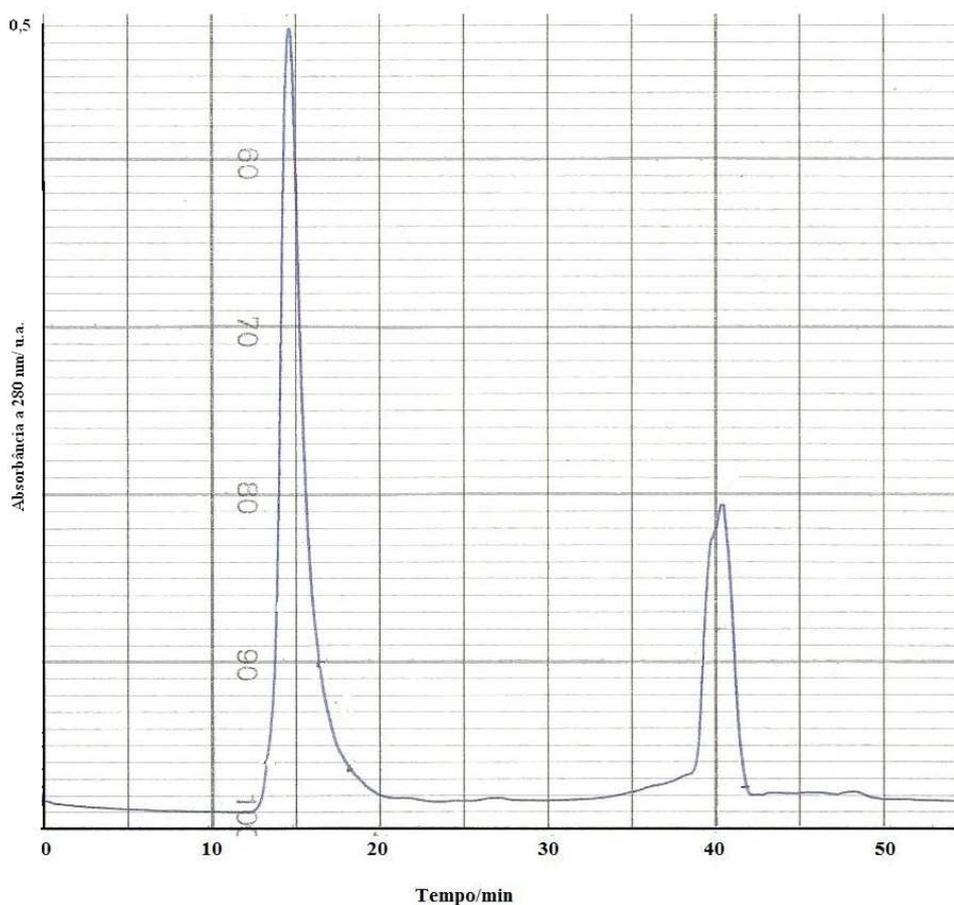


Figura 11. Cromatografia de exclusão molecular de MRJP1 em tampão Tris- HCl 0,05 M, pH 7,5 com Gly 2 M. Dois miligramas de MRJP1 foram injetados na coluna Superdex 200 (GE Healthcare). Tampão de eluição Tris-HCl 0,05 M, Gly 2 M, pH 7,5. Eluição acompanhada por absorção ótica a $\lambda = 280$ nm.

As Figuras 12 e 13 apresentam perfis cromatográficos de MRJP1 na presença do detergente Tween® 20. A presença de 0,2 % (v/v) de Tween® 20 (Figura 12) no tampão de eluição Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5 leva as moléculas de MRJP1 a apresentar diversos graus de associação, enquanto que a presença de 0,5% Tween® 20 (v/v) e Gly 1 M (Figura 13) diminui a quantidade dispersa de MRJP1. Na Figura 13 é possível observar a eluição de monômeros de MRJP1 (indicados pela seta). Contudo, durante a

calibração, o Tween® 20 pode ter afetado a estrutura globular dos calibrantes, alterando assim a o tempo de retenção de cada um deles. Logo os cálculos para se identificar os monômeros podem estar equivocados.

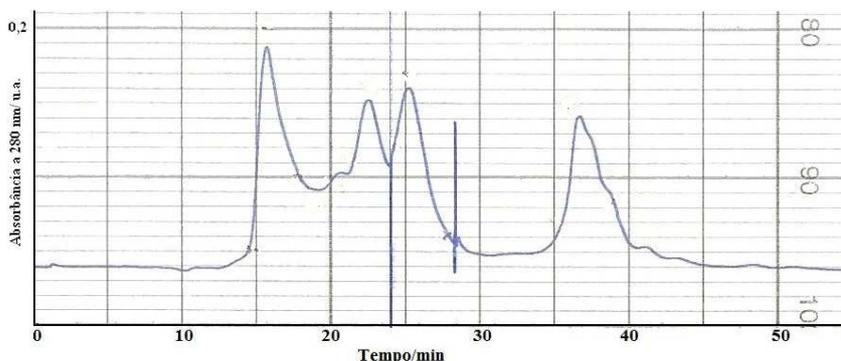


Figura 12. Cromatografia de exclusão molecular com tampão contendo Tween® 20 0,2% (v/v). Dois miligramas de proteínas foram aplicados em coluna Superdex 200 (GE Healthcare). Tampão Tris-HCl 0,05 M, Tween® 20 0,2% (v/v), pH 7,5. Eluição acompanhada por absorção ótica a $\lambda = 280$ nm.

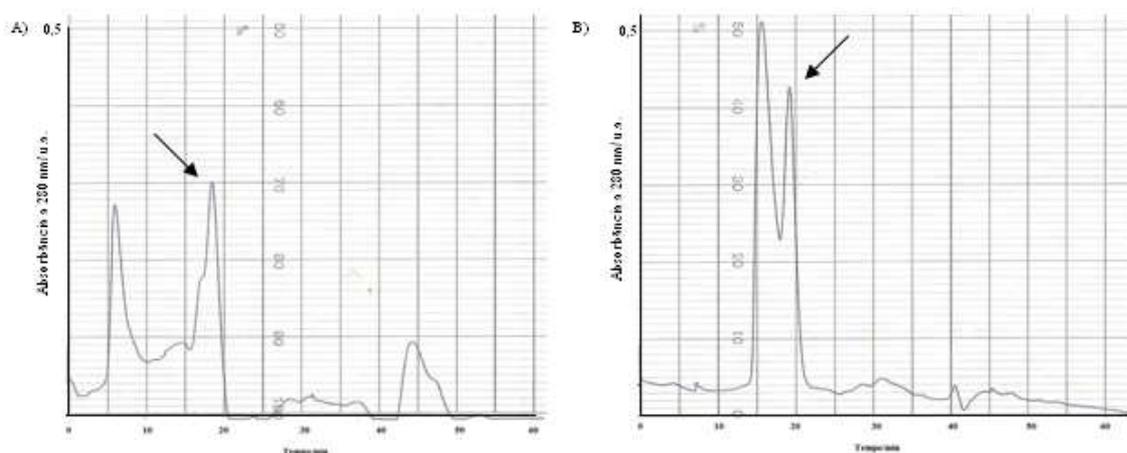


Figura 13. Cromatografia de exclusão molecular em tampão contendo Tween® 20 0,5% (v/v), Gly 1 M. Dois miligramas de proteínas foram aplicados em coluna Superdex 200 (GE Healthcare). A) MRJP1 aquecida por 10 min a 60° C logo após ser solubilizada. B) MRJP1 não aquecida. Setas indicam o monômero de MRJP1. Tampão Tris-HCl 0,05 M, Tween® 20 0,5% (v/v), Gly 1 M, pH 7,5. Eluição acompanhada por absorção ótica a $\lambda = 280$ nm.

Mudanças no pH dos tampões pode levar a alterações na carga elétrica líquida de MRPJ1. Sendo o *pI* desta molécula descrito na literatura entre 4,5 e 5, um tampão ácido com pH abaixo de 4,5 tornaria a molécula carregada positivamente, enquanto acima do pH 5,0 a tornaria carregada negativamente. As Figura 14-21 apresentam perfis cromatográficos de eluição de MRJP1 em diferentes tampões com variações no pH, havendo ou não a presença de glicina.

Na Figura 14 é pode-se observar a eluição de MRJP1 em tampão Tris-NaOH 0,05 M, Gly 0,5 M, pH 10,0. Não há nenhuma forma predominante de MRJP1, contudo há a dissociação de MRJP1 até monômero representado pela fração próxima a 30 min. Esse resultado sugere que pode haver uma dissociação de MRJP1 em pH mais alcalino. A fração com grande intensidade próximo a 40 minutos pode ser de apisimina (5,5 kDa), contudo a fração foi submetido mas não foi identificado por espectrometria de massa.

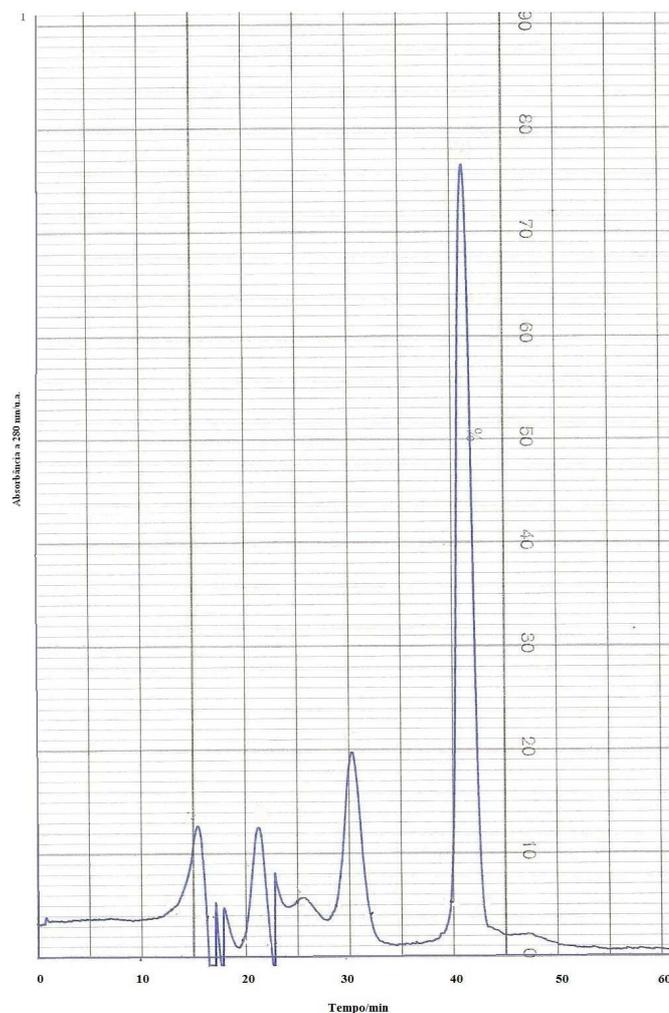


Figura 14. Cromatografia de exclusão molecular de MRJP1 em tampão básico. Dois miligramas de proteína foram injetados em coluna Superdex 200 (GE Healthcare). Nenhuma forma predominante de MRJP1 pôde ser observada, porém houve a presença de uma grande fração, provavelmente de apisimina. O tampão de eluição foi Tris-NaOH 0,05 M, Gly 1 M, pH 10,0. Eluição acompanhada por absorção ótica a $\lambda = 280$ nm.

Cruz e colaboradores (2011) realizaram ensaios de espalhamento de luz dinâmico (DLS) para verificar a autoassociação da MRJP1. Curiosamente, verificaram que em pH 6,0 quando aquecido até 60°C, a MRJP1 encontra-se em seu estado monomérico, mas que, ao ser resfriada para 25°C, a proteína voltava a se oligomerizar em uma massa de 290 kDa. Cruz e colaboradores (2011) também realizaram um ensaio

de desnaturação térmica com a MRJP1 por dicroísmo circular (CD). Verificaram que, comparando-se a estrutura secundária da proteína em 25°C e 95°C, praticamente não havia diferença estrutural, indicando que a MRJP1 é estável mesmo em altas temperaturas.

Uma vez que em pH alcalino, a proteína se dissociava em diversas formas oligoméricas e monômero, uma elevação da temperatura poderia dissociar todos os oligômeros até monômeros, e, estando em pH alcalino, os monômeros poderiam permanecer nessa forma, mesmo a amostra sendo resfriada até temperatura ambiente. A Figura 15, entretanto, demonstra o inverso. A amostra ao ser aquecida por 10 min a 60°C em tampão Tris-NaOH 0,05 M, Gly 1 M, pH 10,0 se agregou, sendo retida no mesmo volume que o volume vazio da coluna. Aos 40 min, há a provável eluição de apisimina dissociada do complexo com MRJP1.

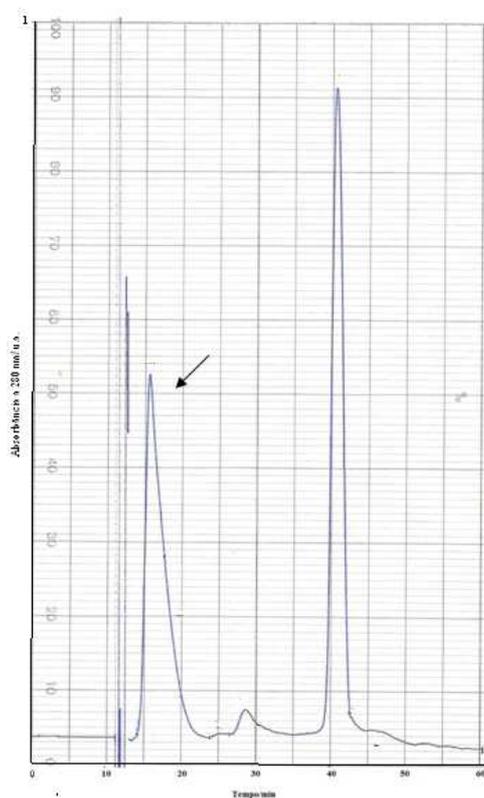


Figura 15. Cromatografia de exclusão molecular de MRJP1 aquecida em tampão básico. Dois miligramas da proteína aquecida em solução tampão pH 10,0 por 10 min a 60° C foram injetados em coluna Superdex 200 (GE Healthcare). A seta indica a proteína agregada. O tampão de eluição foi Tris-NaOH 0,05 M , Gly 1 M, pH 10,0. Eluição acompanhada por absorção ótica a $\lambda = 280$ nm.

A MRJP1 eluída em tampão ácido cítrico/citrato de sódio pH 3,5 com e sem glicina não apresenta perfis cromatográficos muito diferentes entre si (Figura 16). O cromatograma com tampão contendo Gly apresenta uma pequena redução na leitura da

fração eluída aos 16 min (massa molecular maior que 669 kDa) e um aumento nas frações eluídas aos 26 min (massa molecular aproximada de 120 kDa) e aos 32,5 min (massa molecular aproximada de 60 kDa), sugerindo uma possível dissociação de oligômeros de MRJP1 em dímeros e monômeros causada pela presença de glicina.

Os perfis cromatográficos de MRJP1 em tampão PBS 20 mM, pH 7,0 com e sem glicina também não apresentam grandes diferenças entre si (Figura 17). A diferença de absorvância entre as duas cromatografias provavelmente ocorreu por desvio experimental. Contudo, em tampão PBS pH 7,0 também há uma dissociação de oligômeros (tempo e massa molecular aproximadas de 22 min e 280 kDa, respectivamente) para formação de dímeros (tempo e massa molecular aproximadas de 25 min e 140 kDa, respectivamente) e monômeros (tempo e massa molecular aproximadas de 30 min e 51 kDa, respectivamente). Diferente do tampão ácido, o tampão PBS não oligomeriza ou agrega MRJP1 em complexos de alta massa molecular (maiores que 669 kDa).

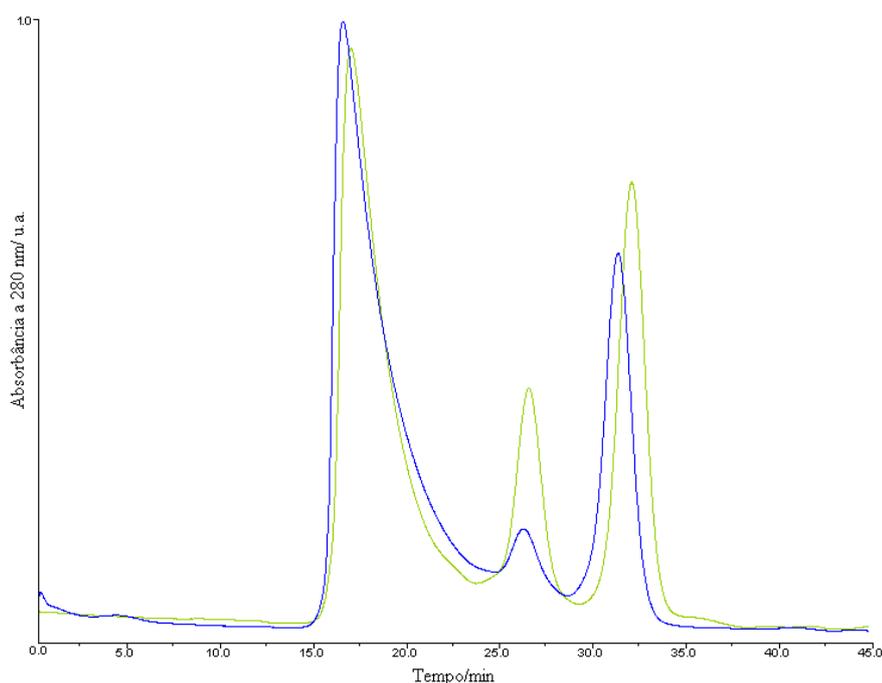


Figura 16. Cromatografias de exclusão molecular de MRJP1 em tampão ácido com e sem GLY sobrepostos. Linha azul correspondente a 2 mg de MRJP1 eluídos em tampão ácido cítrico/citrato de sódio 0,02 M, pH 3,5. Linha verde correspondente a 2 mg de MRJP1 eluídos em tampão ácido cítrico/citrato de sódio 0,02 M, Gly 0,5 M, pH 3,5. Coluna Superdex 200 (GE Healthcare) utilizadas nos dois cromatogramas. Eluições acompanhadas por absorção óptica a $\lambda = 280$ nm.

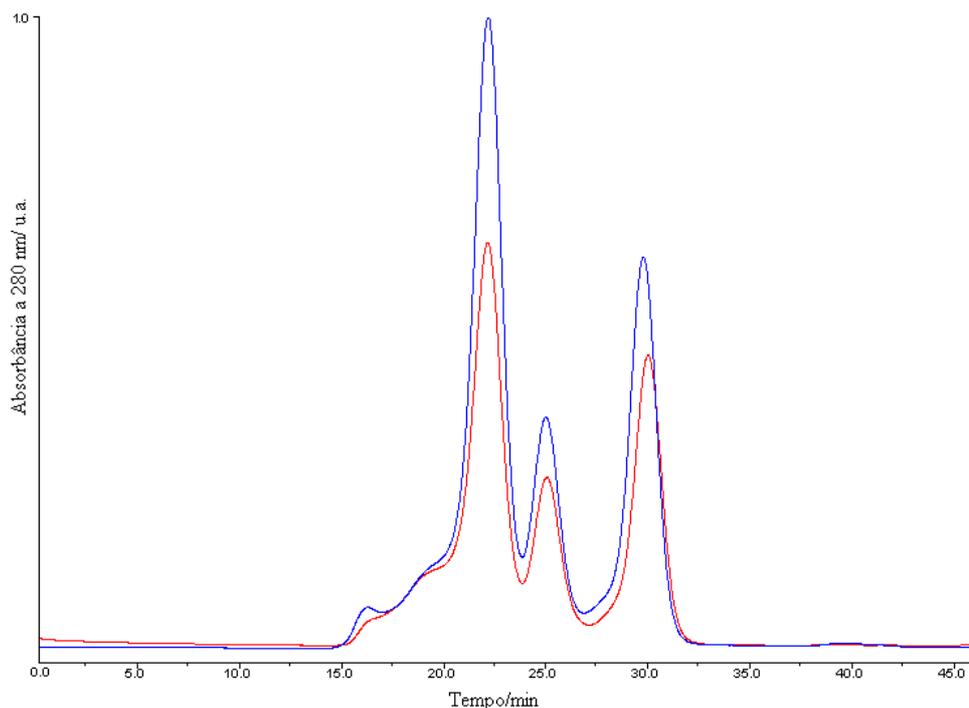


Figura 17. Cromatografias de exclusão molecular de MRJP1 em tampão PBS pH 7,0 com e sem GLY sobrepostos. Linha azul correspondente a 2 mg de MRJP1 eluídos em tampão PBS 0,02 M, pH 7,0. Linha vermelha correspondente a 2 mg de MRJP1 eluídos em tampão PBS 0,02 M, Gly 0,5 M, pH 7,0. Coluna Superdex 200 (GE Healthcare) utilizadas nos dois cromatogramas. Eluições acompanhadas por absorção ótica a $\lambda = 280$ nm.

Na Figura 18 é possível notar a diferença entre a eluição de MRJP1 em tampão PBS 20 mM, pH 11,5 (linha azul) e em tampão PBS 20 mM, Gly 0,5 M, pH 11,5 (linha rosa). As frações eluídas próximas dos 18 min e 22,5 min da cromatografia em tampão sem glicina têm supostamente massas moleculares aproximadas de 320 kDa e 140 kDa, respectivamente, enquanto as frações eluídas próximas dos 22,5 min, 28 min e 32,5 min da cromatografia em tampão com glicina têm supostamente massas moleculares aproximadas de 135 kDa, 40 kDa e 14 kDa. Essas massas identificadas podem ter sido super ou subestimadas. Em pH tão alcalino, os calibrantes podem ter mudado sua estrutura para uma que não globular, o que não seria compatível com o atual processo de calibração. As massas identificadas sugeririam algum erro no processo, visto que não há motivo para existir proteínas com tais massas, mesmo aproximadas, nesse experimento. As possibilidades sugeridas caso o processo de calibração estivesse certo, seriam a degradação de MRJP1 ou a formação de oligômeros de apisimina, o que não foi descrito na literatura. Outros experimentos seriam necessários para se verificar o comportamento de MRJP1 em pH tão alcalino.

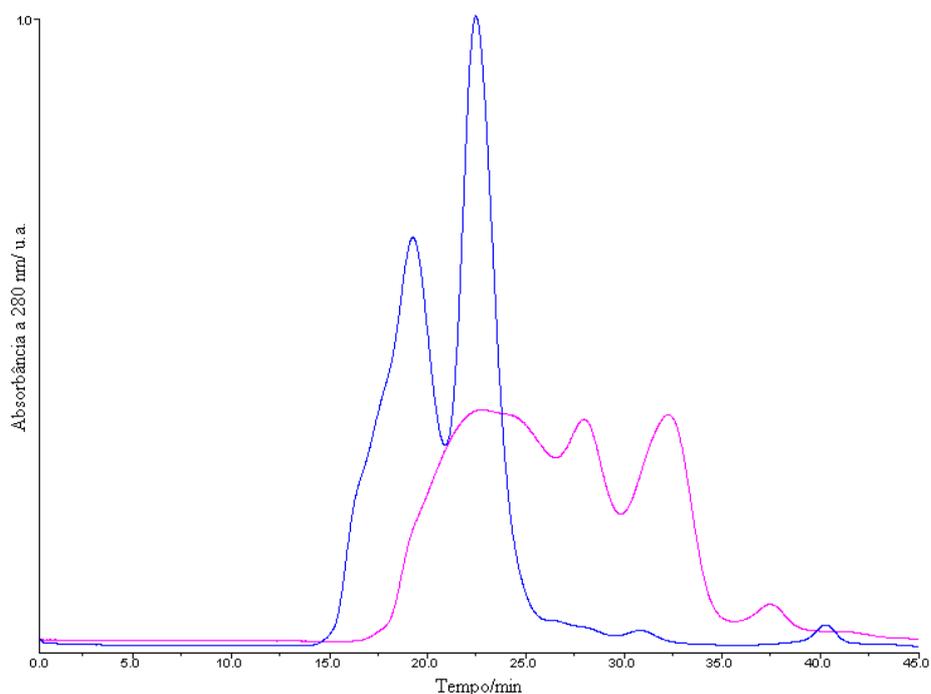


Figura 18. Cromatografias de exclusão molecular de MRJP1 em tampão PBS pH 11,5 com e sem GLY sobrepostos. Linha azul correspondente a 2 mg de MRJP1 eluídos em tampão PBS 0,02 M, pH 11,5. Linha rosa correspondente a 2 mg de MRJP1 eluídos em tampão PBS 0,02 M, Gly 0,5 M, pH 11,5. Coluna Superdex 200 (GE Healthcare) utilizadas nos dois cromatogramas. Eluições acompanhadas por absorção ótica a $\lambda = 280$ nm.

As Figuras 19 e 20 representam perfis cromatográficos de MRJP1 em tampão carbonato/bicarbonato 20 mM, pH 10,0 sem e com glicina 0,5 M, respectivamente. O cromatograma da Figura 19 se assemelha a qualquer um dos cromatogramas da Figura 17 (tampão de eluição PBS, pH 7,0 com ou sem Gly 0,5M). O tempo de retenção das moléculas e a massa molecular aproximada também são bastante próximos (tempo de retenção e massa molecular: 22 min, 301 kDa; 25,1 min, 147 kDa; 29 min, 60 kDa), sugerindo um efeito semelhante dos tampões na MRJP1.

A Figura 20 representa o cromatograma em que pela primeira vez a eluição da MRJP1 apresenta uma diversidade menor de formas desta proteína. Neste caso, as formas predominantes são o dímero e o monômero. De alguma forma, o tampão carbonato/bicarbonato alcalino, associado à glicina, praticamente dissociou todas as formas oligoméricas, com exceção do dímero, de MRJP1.

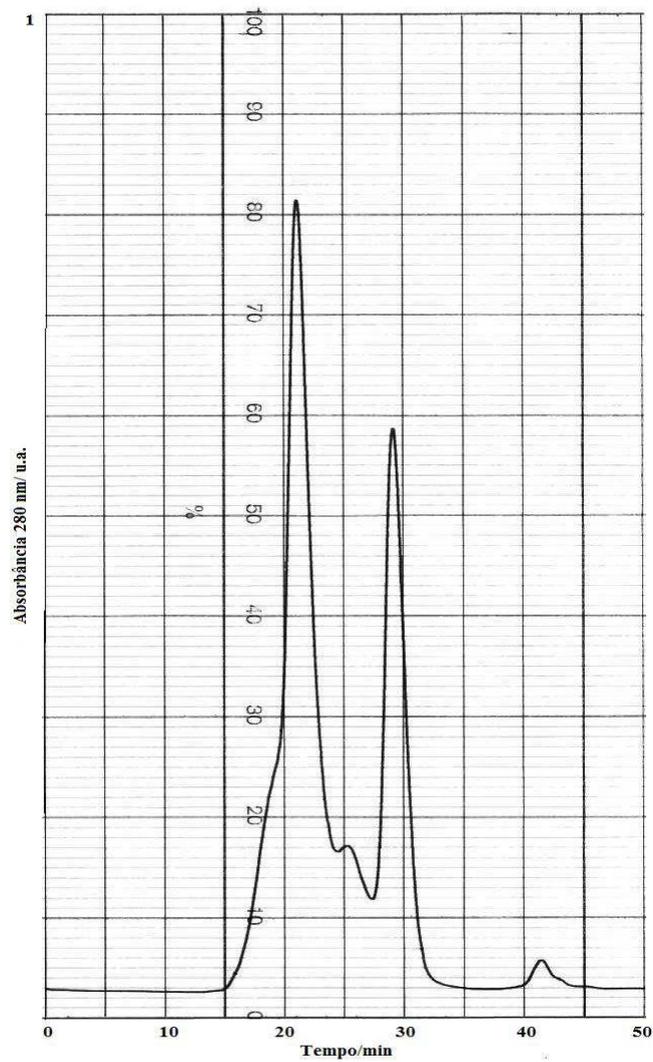


Figura 19. Cromatografias de exclusão molecular de MRJP1 em tampão carbonato/bicarbonato 0,02 M, pH 10,0. Dois miligramas de proteína foram injetados em coluna Superdex 200 (GE Healthcare). O tampão de eluição foi carbonato/bicarbonato 0,02 M, pH 10,0. Eluição acompanhada por absorção ótica a $\lambda = 280$ nm.

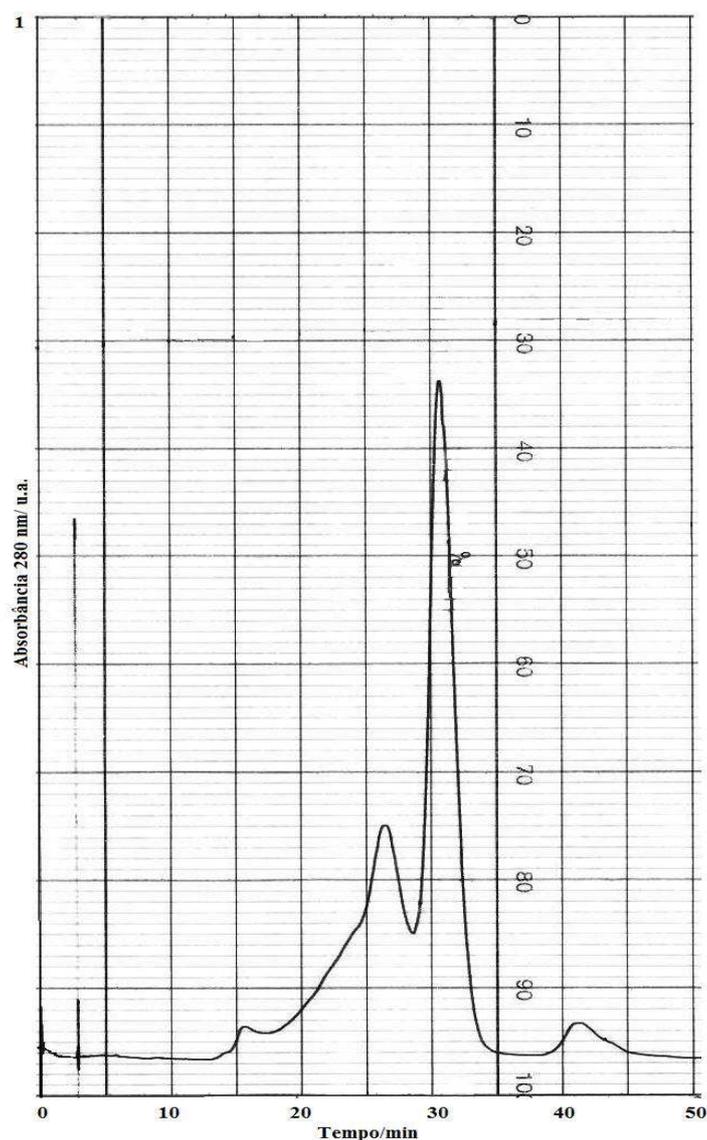


Figura 20. Cromatografia de exclusão molecular de MRJP1 em tampão carbonato/bicarbonato 0,02 M, pH 10,0, COM Gly 0,5 M. Dois miligramas de proteína foram injetados em coluna Superdex 200 (GE Healthcare). O tampão de eluição foi carbonato/bicarbonato 0,02 M, Gly 0,5 M, pH 10,0. Eluição acompanhada por absorção ótica a $\lambda = 280$ nm.

A Figura 21 representa o perfil cromatográfico com tampão de eluição igual ao indicado na Figura 19 (carbonato/bicarbonato 20 mM, pH 10,0, sem glicina), porém a amostra de MRJP1 foi aquecida por 10 min a 60°C logo após ser solubilizada no mesmo tampão de eluição. Como apresentado na Figura 15, em que o tampão no qual a amostra foi solubilizada e aquecida era também alcalino, houve uma agregação de MRJP1. Os complexos formados superaram 669 kDa.

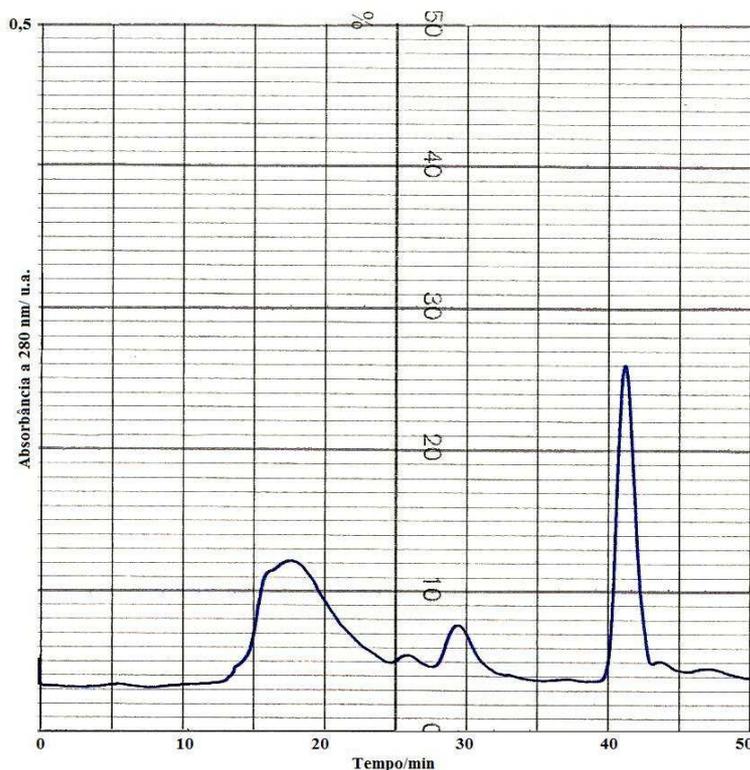


Figura 21. Cromatografia de exclusão molecular de MRJP1 aquecida em tampão carbonato/bicarbonato 0,02 M, pH 10,0, Gly 0,5 M. Dois miligramas de proteína aquecida a 60°C por 10 min foram injetados em coluna Superdex 200 (GE Healthcare). O tampão de eluição foi carbonato/bicarbonato 0,02 M, Gly 0,5 M, pH 10,0. Eluição acompanhada por absorção ótica a $\lambda = 280$ nm.

No intuito de se obter somente uma forma de MRJP1, preferencialmente monomérica, concentrações diferentes de surfactante SDS foram adicionados ao tampão carbonato/bicarbonato 20 mM, Gly 0,5 M, pH 10,0 (Figura 22), uma vez que esse tampão praticamente induzia a MRJP1 a se dimerizar ou permanecer em uma forma monomérica. A adição do detergente poderia favorecer a dissociação das poucas formas oligoméricas existentes.

Contudo, outro efeito foi observado. Na Figura 22, as massas moleculares aproximadas representantes das maiores frações em cada uma das linhas - rosa, cinza, azul clara e azul escura - foram, respectivamente, 168 kDa, 100 kDa, 47 kDa e 60 kDa, de acordo com as calibrações com os respectivos tampões. Essas massas moleculares, assim como em tampão PBS pH 11,5, podem na realidade não indicar a verdadeira massa molecular dos complexos, visto que o SDS provavelmente induz uma formação não globular das proteínas. Estudos de Reynolds e Tanford (1970) indicaram que SDS induz mudança conformacional em proteínas, interagindo com suas regiões

hidrofóbicas. Também verificaram que o complexo proteína-SDS não era globular, mas sim alongado.

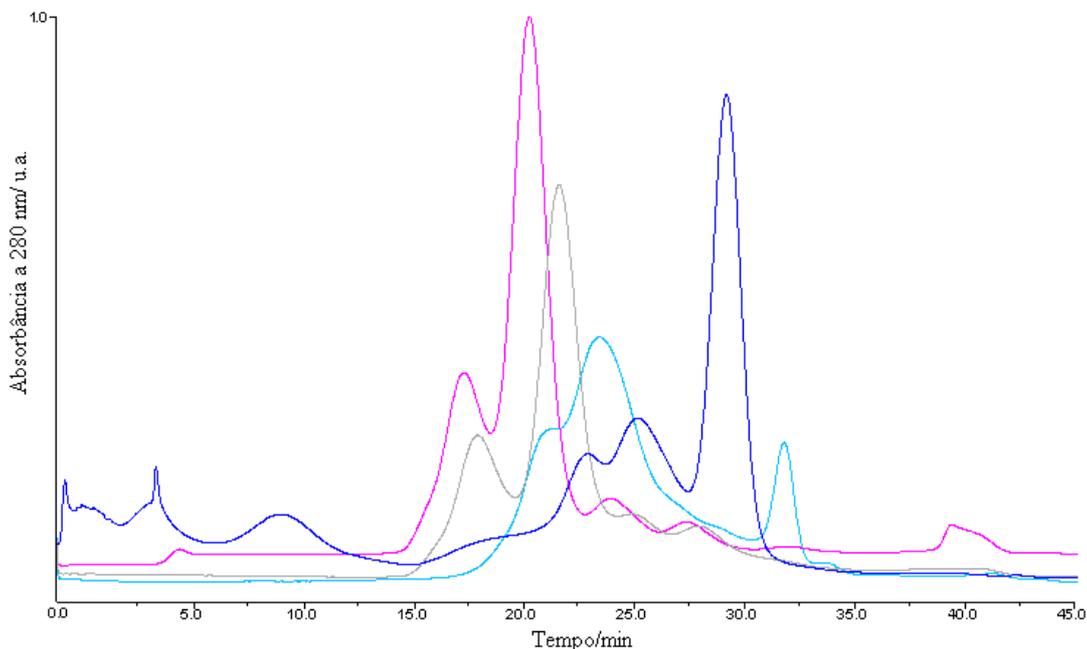


Figura 22. Cromatografias de exclusão molecular de MRJP1 em diferentes concentrações de SDS em tampão carbonato/bicarbonato 0,02 M, Gly 0,5 M. Linha azul clara, cinza e rosa correspondentes a 2 mg de MRJP1 eluídos em tampão carbonato/bicarbonato, Gly 0,5 M, pH 10,0 com CMC, 0,1% (v/v) e 0,5% (v/v) de SDS respectivamente. Coluna Superdex 200 (GE Healthcare) utilizadas nos todos cromatogramas. Linha azul corresponde ao controle, mesmas condições de corrida sem adição de SDS. Eluições acompanhadas por absorção ótica a $\lambda = 280$ nm.

Em despeito a essas considerações acima, uma atenta comparação entre os quatro cromatogramas poderia ser especulada. Ao se observar as frações correspondentes a aproximadamente 290 kDa (22,3 min) e 120 kDa (25,1 min) do cromatograma controle (linha azul), parece que tais frações vão ganhando massa a medida que se aumenta a concentração de SDS no tampão (massa das frações: controle < CMC < 0,1% < 0,5%). Como se, à medida que aumentasse a concentração de SDS, aumentasse a quantidade de moléculas do detergente que se ligam à proteína, aumentando assim a massa molecular total da proteína

4.4 Recromatografia de oligômeros e monômeros de MRJP1 liofilizados

As cromatografias de exclusão molecular de MRJP1 eluída em tampão carbonato/bicarbonato 20 mM pH 10,0 com e sem glicina resultam em um cromatograma com uma fração monomérica e frações oligoméricas. A fração

monomérica e as frações oligoméricas obtidas por eluição em tampão com Gly 0,5 M foram denominadas, respectivamente, de fração monomérica CG e de fração oligomérica CG, enquanto as frações monomérica e oligoméricas obtidas por eluição em tampão sem glicina foram denominadas de fração monomérica SG e de fração oligomérica SG, respectivamente.

As frações foram coletadas após duas cromatografias de exclusão molecular com injeção de 2 mg de MRJP1 (em cada cromatografia) eluída uma em tampão carbonato/bicarbonato de sódio 20 mM, pH 10,0 sem glicina e a outra em tampão com glicina.

As frações monoméricas CG e SG e as frações oligoméricas CG e SG foram coletadas, dialisadas a 4°C e liofilizadas.

Cada fração separadamente passou por nova etapa de cromatografia de exclusão molecular eluída em tampão carbonato/bicarbonato de sódio 20 mM, Gly 0,5, pH 10,0 seguindo o protocolo descrito na sessão 3.4.1 de Materiais e Métodos. Nenhuma amostra foi aquecida (Figura 23) (Fluxograma 2).

Esse ensaio foi realizado para se verificar a auto-associação somente de frações oligoméricas SG e CG e monoméricas SG e CG de MRJP1. Essas frações foram eluídas em cromatografia de exclusão molecular em tampão carbonato/bicarbonato de sódio 20 mM, Gly, 0,5 M, pH 10,0.

As frações monoméricas e oligoméricas CG foram obtidas do cromatograma (A), enquanto as frações monoméricas e oligoméricas SG foram obtidas do cromatograma (B).

Comparando-se as frações monoméricas CG (C) e SG (D), é possível notar que o monômero SG é mais estável que o monômero CG, este que se associou em diversas formas oligoméricas mesmo eluído em presença de 0,5 M de glicina. O monômero SG manteve a predominância de suas moléculas no estado monomérico.

Entre os oligômeros SG e CG, ambos se dissociaram parcialmente até monômero, indicando que, neste tampão, existe um equilíbrio da MRJP1 a apresentar suas diversas formas. Esse equilíbrio de formas de MRJP1 presentes num mesmo espaço físico pode ser a razão da dificuldade de ser obter uma única forma desta proteína. Este equilíbrio existe não somente em tampão carbonato/bicarbonato pH 10,0, e sim em todos os tampões utilizados neste projeto.

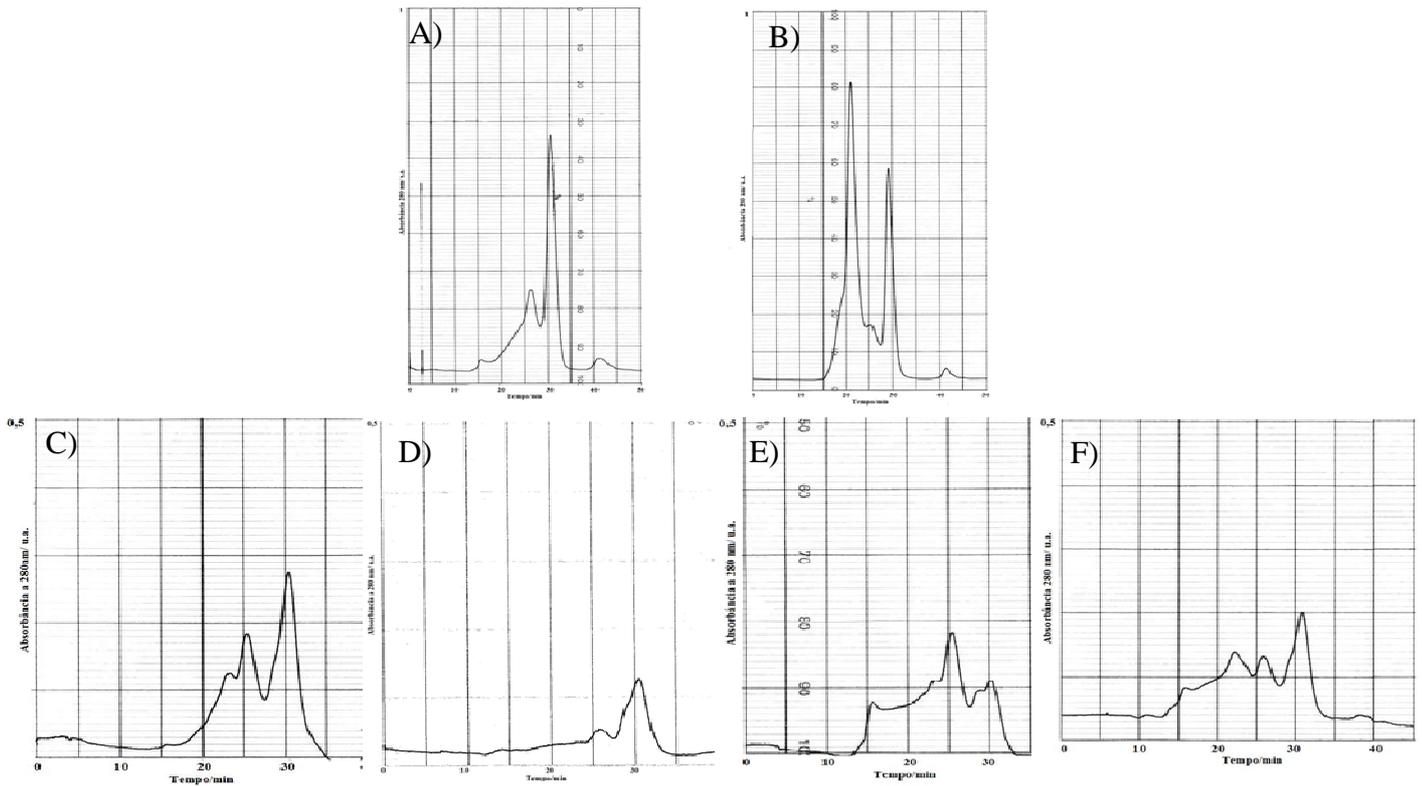
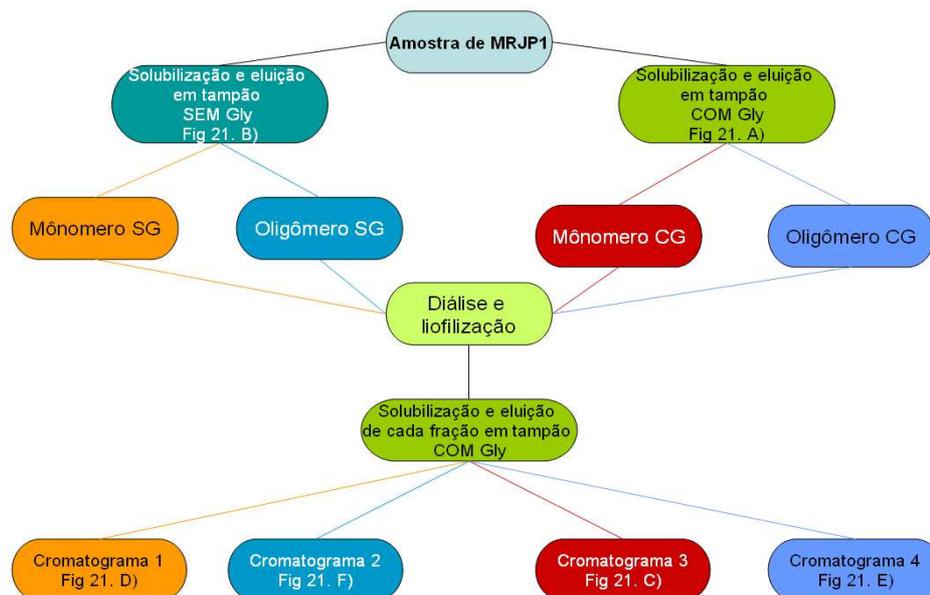


Figura 23. Cromatografias de exclusão molecular das frações monoméricas SG e CG e das frações oligoméricas SG e CG de MRJP1 em tampão carbonato/bicarbonato 0,02 M, Gly 0,5 M. (A) e (B), injeção de 2 mg de MRJP1 em cromatografia de exclusão molecular em tampão carbonato/bicarbonato de sódio 0,02 M, pH 10,0 com Gly 0,5 M (A) e sem Gly (B). C) cromatograma da fração monomérica CG. D) cromatograma da fração monomérica SG. E) cromatograma da fração oligomérica CG. F) cromatograma da fração oligomérica SG. Coluna Superdex 200 (GE Healthcare) utilizadas nos todos cromatogramas. Eluições acompanhadas por absorção óptica a $\lambda = 280$ nm.

Fluxograma 2. Cromatografia de exclusão molecular das frações oligoméricas e monoméricas obtidas da separação de MRJP1 em tampão pH 10 com e sem glicina.



4.5 Recromatografia de exclusão molecular de monômeros de MRJP1 não liofilizados

Em todos os processos em que a MRJP1 é dialisada e liofilizada, este último processo concentra as amostras até desidratá-las. A concentração dessas amostras pelo processo de liofilização poderia estar influenciando na oligomerização das frações de monômeros de MRJP1.

A Figura 24 apresenta o ensaio em que (A) 5 mg de MRJP1 foram eluídas em cromatografia de exclusão molecular em tampão carbonato/bicarbonato 20 mM, Gly 0,5 M, pH 10,0. A fração do monômero de MRJP1 está sinalizada pelas barras vermelhas. Essa fração foi coletada e dividida.

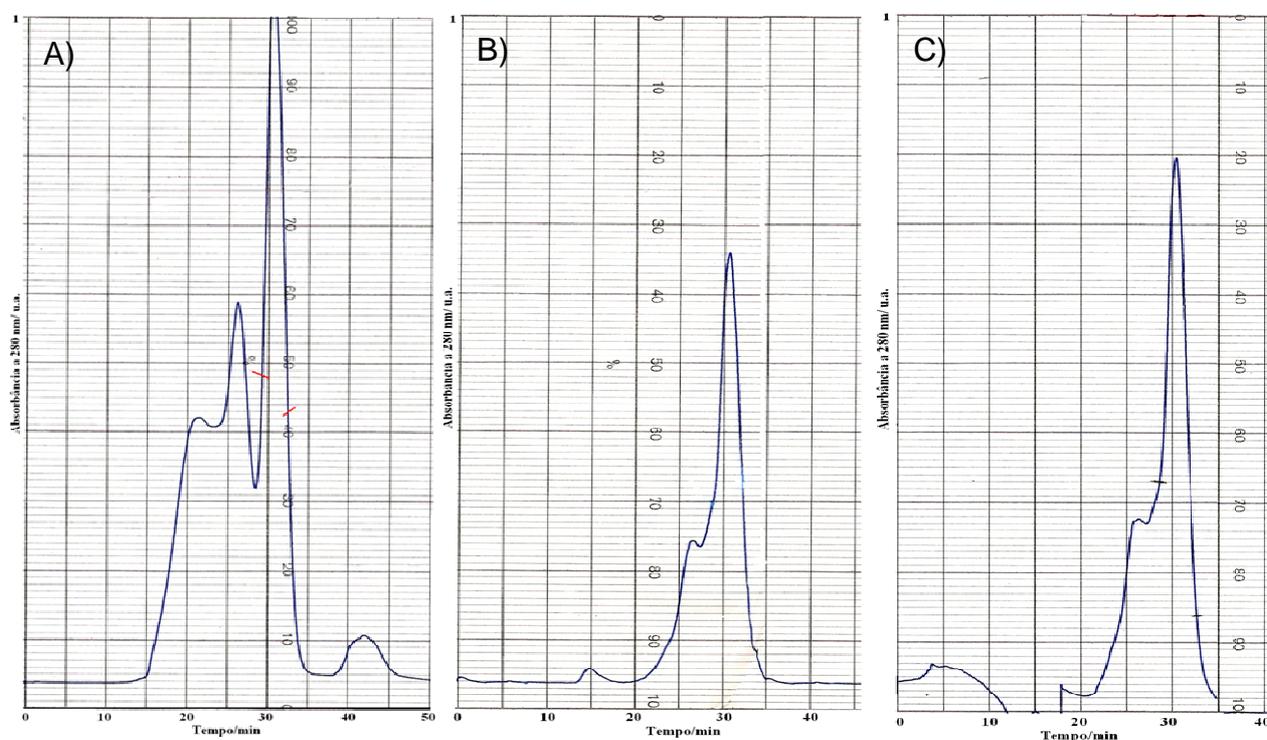


Figura 24. Recromatografias de exclusão molecular dos monômeros de MRJP1 não liofilizados em tampão carbonato/bicarbonato 0,02 M, Gly 0,5 M, pH 10,0 e em água. A) cromatograma de 5 mg de MRJP1 diluídos em 500 μ L e injetados em cromatografia de exclusão molecular eluída no tampão descrito acima. Barras vermelhas indicam a fração monomérica coletada. B) Metade da fração monomérica coletada em (A) e imediatamente injetada em cromatografia de exclusão molecular eluída no tampão descrito acima. C) Outra metade da fração monomérica coletada em (A), dialisada contra água destilada e não liofilizada, injetada em cromatografia de exclusão molecular eluída no tampão descrito acima. Coluna Superdex 200 (GE Healthcare) utilizadas nos todos cromatogramas. Eluições acompanhadas por absorção ótica a $\lambda = 280$ nm.

A primeira metade foi (B) novamente injetada em cromatografia de exclusão molecular e eluída no mesmo tampão em que o monômero foi coletado. É possível ver

que não há a formação de grandes complexos oligoméricos, predominando a forma monomérica da MRJP1 (fração eluída aos 30 min).

A outra metade da amostra (C) foi dialisada contra água destilada a 4°C, e então seguiu para cromatografia de exclusão molecular nas mesmas condições que (A) e (B). Assim como em (B), há uma predominância de monômero (fração aos 30 min) e não é visível uma formação de oligômeros. As frações anteriores a 30 min provavelmente são resquícios de oligômeros que podem ter sido coletados conjuntamente com a fração monomérica.

Assim, o processo de liofilização é muito provável que seja o responsável pela oligomerização dos monômeros de MRJP1. Comparando-se essas cromatografias (Figura 24, B e C) com a cromatografia do monômero CG (Figura 23, C), em que a única diferença entre essas cromatografias é o fato do monômero CG passar pelo processo de liofilização, tudo indica que o ato de liofilizar a amostra seja a responsável pela indução da oligomerização. Durante o processo de liofilização, as amostras tornam-se cada vez mais concentradas, o que poderia estar fortemente induzindo a oligomerização dos monômeros de MRJP1.

Foi visto também que se é possível trocar o tampão carbonato/bicarbonato pH 10,0 em que o monômero de MRJP1 foi eluído por água sem necessariamente induzir uma oligomerização. Pode-se, a partir daí, realizar outros experimentos com o monômero de MRJP1 não estando obrigatoriamente em solução pH 10,0.

4.6 Cromatografia de exclusão molecular de MRJP1 em diferentes concentrações

Oligômeros de proteínas em soluções muito diluídas tendem a se dissociar, assim como proteínas em soluções muito concentradas podem tender a se associar. Amostras de 0,5 mg, 1 mg ou 2 mg de MRJP1 foram solubilizados em 500 µL de tampão carbonato/bicarbonato de sódio 20 mM, pH 10,0. As amostras foram eluídas separadamente em cromatografia de exclusão molecular e o tampão de eluição foi o mesmo em que foram solubilizadas e de acordo com o protocolo descrito na sessão 3.4.1 de Materiais e Métodos sem aquecimento das amostras.

A Figura 25 apresenta três cromatogramas com concentrações crescentes de MRJP1 que foram injetadas em coluna de cromatografia de exclusão molecular. Em A), a concentração injetada de MRJP1 foi de 1 mg/mL, B) 2 mg/mL e C) 4 mg/mL. Era de

se esperar que houvesse um aumento significativo de oligômeros (frações eluídas antes de 29 min) e redução proporcional de monômeros (fração aos 29 min). Contudo, visualmente só é possível se observar o já esperado aumento na leitura da eluição de MRJP1 à medida que se aumenta a concentração de proteína inicialmente injetada.

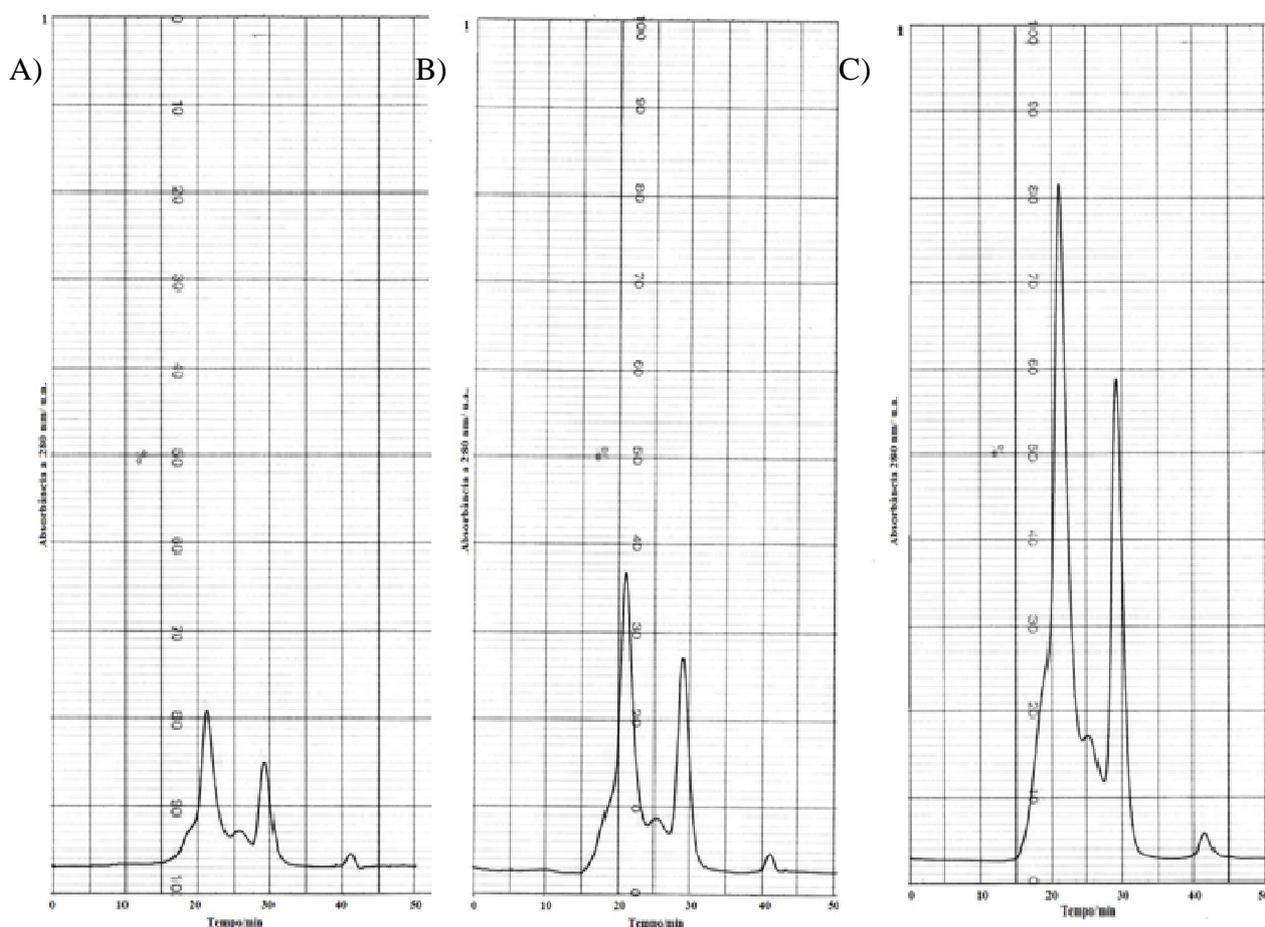


Figura 25. Cromatografias de exclusão molecular em diferentes concentrações de MRJP1 eluída em tampão carbonato/bicarbonato 0,02 M. (A), (B) e (C) com concentrações respectivas de 1, 2 e 4 mg/mL de MRJP1 em tampão carbonato/bicarbonato de sódio 0,02 M, pH 10,0. Coluna Superdex 200 (GE Healthcare) utilizadas nos todos cromatogramas. Eluições acompanhadas por absorção ótica a $\lambda = 280$ nm.

Logrado em sua dissertação de mestrado (2009) realizou diversos testes de concentração de MRJP1, afim de se verificar a melhor para se dimensionar essa proteína pela técnica de Microscopia de Força Atômica (AFM). Uma amostra de MRJP1 na concentração inicial de $3,7 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ foi analisada. A primeira imagem obtida foi marcada pela presença de agregados. Até conseguir visualizar o monômero de MRJP1, o pesquisador teve que diluir a amostra 1000 vezes. Isso demonstra a facilidade com que a MRJP1 tende a se oligomerizar.

4.7 Efeito da temperatura sobre MRJP1

A fim de se verificar o comportamento do monômero de MRJP1 submetido por 24 h a diferentes temperaturas, foi realizada um cromatografia de exclusão molecular em que 5 mg de MRJP1 foram solubilizados (em 500 μ L) e eluídos em de tampão carbonato/bicarbonato de sódio 20 mM, pH 10,0. A fração monomérica foi dividida em 4 partes: uma parte ficou a 65°C/ 24 h, outra a temperatura ambiente/ 24 h, outra a 4°C/ 24 h e a última a -22°C/ 24 h. Após o período de 24 h, as frações foram reinjetadas na coluna de cromatografia de exclusão molecular e eluídas com o tampão descrito acima (Figura 26).

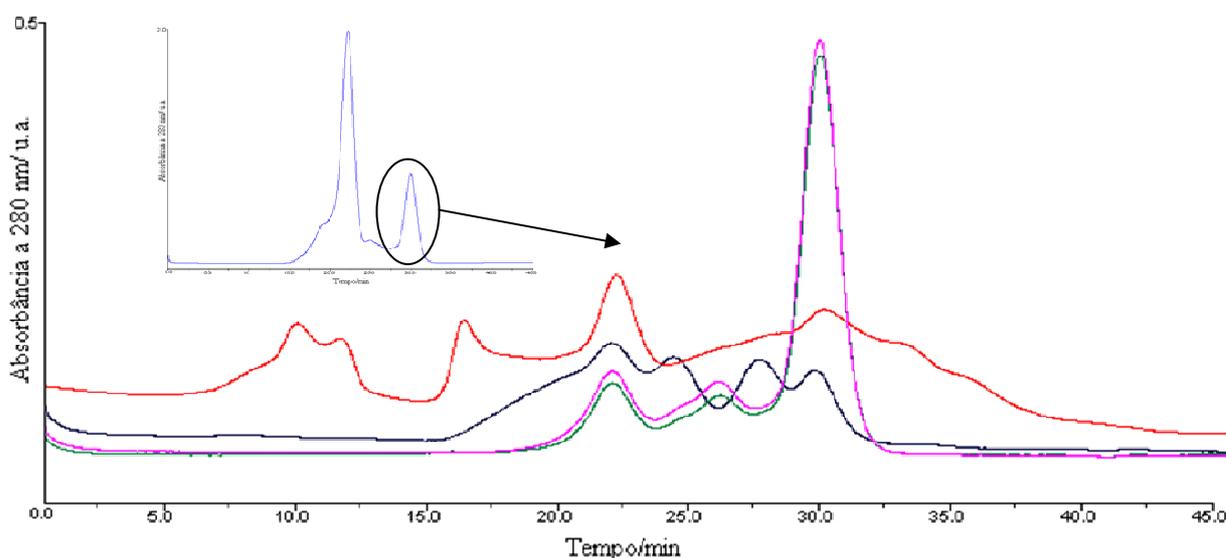


Figura 26. Cromatografias de exclusão molecular do monômero de MRJP1 submetidas a 24 h em determinada temperatura e eluídas em tampão carbonato/bicarbonato 0,02 M. Linha vermelha: monômero 24h a 60°C. Linha preta: monômero 24h a temperatura ambiente. Linha verde: monômero 24h a 4°C. Linha rosa: monômero 24h a -22°C. Inserção: cromatograma de 5mg de MRJP1 do qual o monômero (circulado) foi fracionado em 4 partes iguais para se fazer o teste de termoestabilidade com mesmo tampão de eluição. Coluna Superdex 200 (GE Healthcare) utilizadas nos todos cromatogramas. Eluições acompanhadas por absorção ótica a $\lambda = 280$ nm.

É notável a manutenção da forma monomérica (fração aos 30 min) de MRJP1 nas temperaturas de -22°C (linha rosa) e 4°C (linha verde), enquanto em temperatura ambiente (linha preta) e a 65°C (linha vermelha) as moléculas tenderam a se oligomerizar. No caso da temperatura de 65°C, houve até mesmo agregação (fração aos 10 e 11,5 min) e degradação de MRJP1, uma vez que há a presença de proteínas com menos de 55 kDa.

Kamakura e colaboradores (2001a) verificaram, por experimento semelhante de termoestabilidade, que o monômero de MRJP1 é mais suscetível a fragmentação por enzimas quanto maior for a temperatura, enquanto os oligômeros são menos susceptíveis a essa degradação. Tamura e colaboradores (2009) verificaram que o oligômero de 290 kDa de MRJP1 é resistente a temperaturas de até 56°C. Segundo Walden e colaboradores (2001), proteínas maiores são mais resistentes a degradação e a desnaturação. Além disso, esses resultados indicam melhores condições de armazenamento da proteína.

4.8 Novo protocolo de cromatografia de troca aniônica de extrato de GR

Kamakura e colaboradores (2001a) supostamente conseguiram purificar o monômero de MRJP1 em um único passo de cromatografia de troca iônica. Para isso, eles se valeram do processo de ultrafiltração do extrato de GR antes de injetá-la em coluna de troca iônica. Retiravam com uma membrana de *cut-off* de 100 kDa todas as proteínas com massa molecular superior a 100 kDa. Contudo, o artigo não cita se o monômero puro de MRJP1 era posteriormente dialisado e/ou liofilizado e, caso fosse, se voltava a se oligomerizar/agregar.

Kamakura e Fukushima (2002) notaram que EDTA aumentava a faixa de termoestabilidade da MRJP1. Introduzimos esse ácido na preparação de alguns tampões, a fim de evitar degradação do monômero e até mesmo induzir a proteína monomérica a permanecer nesse estado conformacional.

Com uma nova amostra de geleia real, contudo do mesmo fornecedor (Apivita, Rio Claro, SP), foi realizado um ensaio para verificar se a nova GR possuía um cromatograma semelhante ao das primeiras purificações (Figura 27). O método foi praticamente o mesmo, havendo algumas diferenças no tampão. O tampão utilizado foi Tris-HCl 20 mM, pH 7. Essas mudanças se basearam nos métodos de Kamakura e colaboradores (2001a).

Não houve nenhuma grande variação de padrão de eluição, com a MRJP1 se desligando da coluna entre concentrações de 0,3-0,4 M de cloreto de sódio. A nova GR possuía características muito semelhantes à GR antiga, sendo considerada adequada para se dar continuidade aos experimentos.

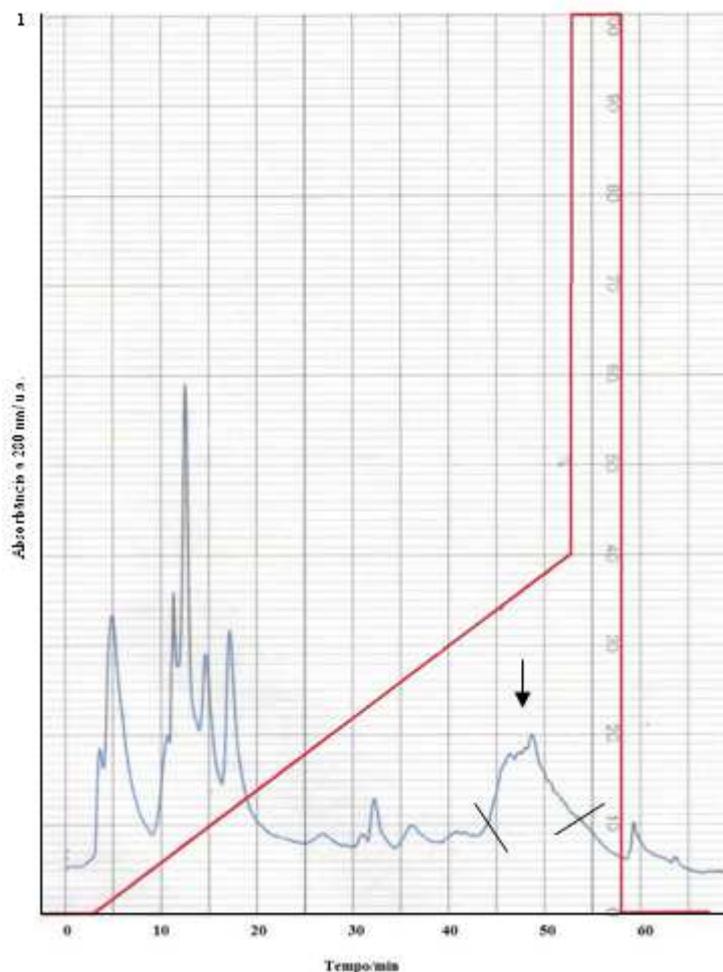


Figura 27. Cromatografia de troca aniônica da nova GR. A diferença consistiu no tampão (Tris-HCl 0,02 M, pH 7,0) e no padrão de de concentrações NaCl, linha vermelha (0-5 min, ausência de NaCl; 5-55 min, NaCl 40%; 55 min, NaCl 100%; 55-60 min, NaCl isocrático; 60 min ausência de NaCl; 60-70 min, ausência de NaCl). Linha azul representa eluição acompanhada por absorção ótica a $\lambda = 280$ nm. Seta indica fração de MRJP1 delimitada pelas barras pretas.

Tendo em mente o método baseado em ultrafiltração, 0,15 g de amostra da nova GR foi solubilizada em 2 ml de tampão com inibidor de protease Tris-HCl 20 mM (pH 7,0), EDTA 20 mM, agitada por 2 min e centrifugada a 16000 g por 10 min. O sobrenadante foi ultrafiltrado (*cut-off* 100 kDa) e concentrado (*cut-off* 10 kDa), como descrito em sessão 3.2 de Materiais e Métodos (Figura 28). Um novo padrão de gradiente de NaCl foi utilizado, visando obter uma amostra mais pura de MRJP1. .

Contudo, esse método não apresentou a fração correspondente à MRJP1, além de diminuir consideravelmente a presença de outras proteínas. Investigando o resultado, uma nova cromatografia foi realizada, seguindo os mesmos procedimentos da cromatografia descrita anteriormente, porém o passo de ultrafiltração e concentração foram eliminados (Figura 29).

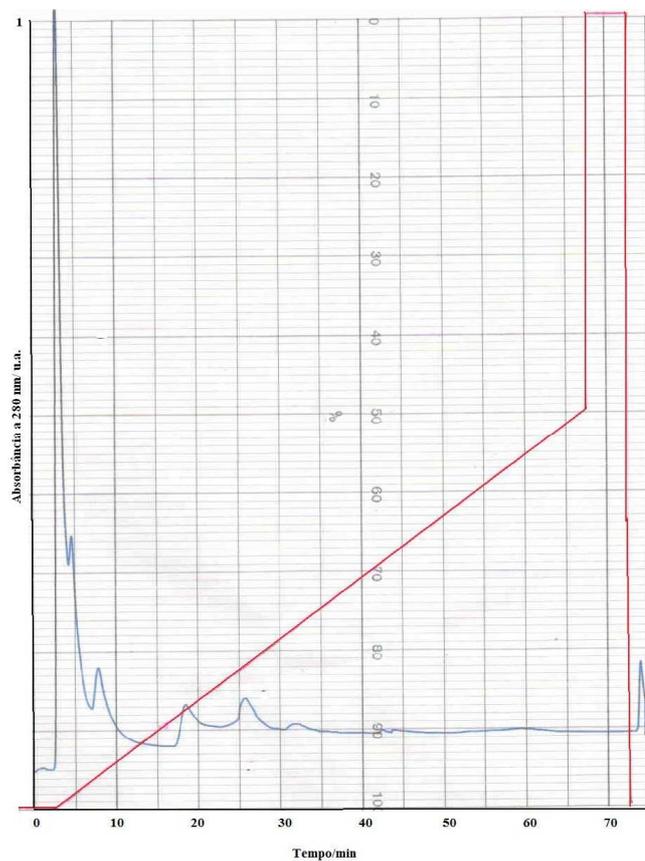


Figura 28. Cromatografia de troca aniônica da nova GR ultrafiltrada (100 kDa) e concentrada (10 kDa). No tampão utilizado (Tris-HCl 0,02 M, EDTA 0,02 M, inibidor de protease, pH 7,0) e com o processo de ultrafiltração, a fração correspondente à MRJP1 não é eluída. Padrão de concentração de NaCl (linha vermelha) diferente, contudo, o método foi descartado. Linha azul representa eluição acompanhada por absorção ótica a $\lambda = 280$ nm.

Mesmo excluindo-se os procedimentos de ultrafiltração e concentração, a fração corresponde à MRJP1 não foi eluída. Tais resultados podem indicar que (1) altas concentrações de EDTA alterem a carga total da MRJP1, alterando o seu padrão cromatográfico, ou (2) há uma modificação estrutural da proteína. Com esses resultados, o tampão contendo EDTA foi descartado.

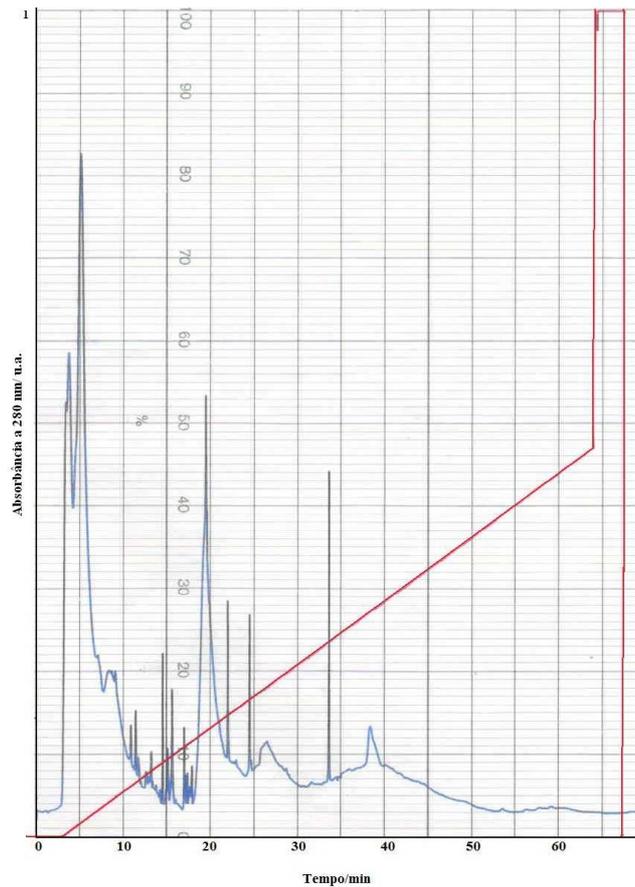


Figura 29. Cromatografia de troca aniônica da nova GR somente com tampão contendo EDTA. No tampão utilizado (Tris-HCl 0,02 M, EDTA 0,02 M, inibidor de protease, pH 7,0) e sem processo de ultrafiltração e concentração, a fração correspondente à MRJP1 também não foi eluída. Padrão de concentração de NaCl (linha vermelha) diferente dos demais sem prejuízo ao trabalho. Contudo, o método foi descartado. Linha azul representa eluição acompanhada por absorção ótica a $\lambda = 280$ nm.

Em resultados anteriores, a MRJP1 foi dissociada até monômero em tampão contendo Tween® 20 em cromatografia de exclusão molecular. Adicionando Tween® 20 ao se preparar a amostra, era possível que grandes quantidades de monômero de MRJP1 fossem purificadas pelos processos de ultrafiltração e cromatografia de troca aniônica. Então, 0,15 g de GR foram solubilizadas em 2 ml de tampão contendo Tris-HCl 20 mM, Tween® 20 1% (v/v), pH 7,0. O processo seguiu de acordo com o descrito em na sessão 3.2 de Materiais e Métodos, sendo a solução ultrafiltrada (*cut-off* 100 kDa) e concentrada (*cut-off* 10 kDa) (Figura 30A). Para comparação, uma amostra de GR seguiu o mesmo protocolo de preparação, não havendo Tween® 20 ao se preparar a amostra (Figura 30B).

Em ambas as cromatografias é possível notar a ausência da fração de MRJP1. De qualquer forma, o processo de dissociação realizado pelo Tween® 20 não foi

descartado, uma vez que a cromatografia sem Tween® 20 deu um resultado muito semelhante. O problema era em algum processo da ultrafiltração.

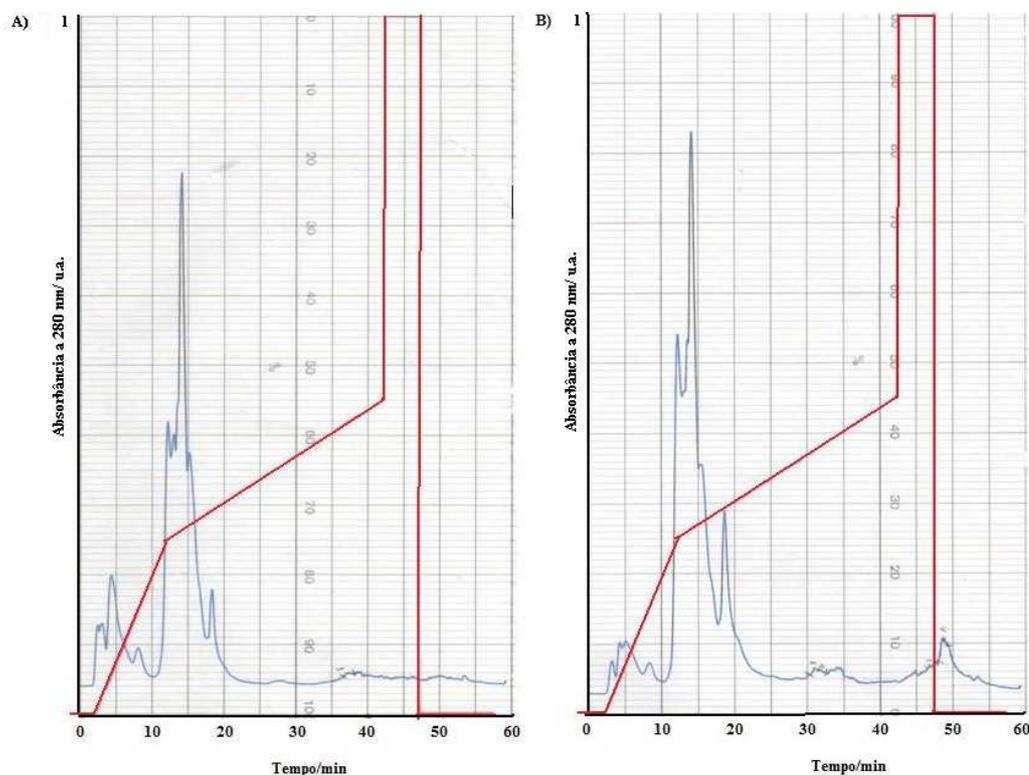


Figura 30. Cromatografia de troca aniônica de amostra solubilizada em tampão contendo ou não a presença de Tween® 20 1% (v/v). A) Amostra de GR solubilizada em tampão Tris-HCl 0,02 M, Tween® 20 1% (v/v) pH 7,0. B) Amostra de GR solubilizada somente em tampão Tris-HCl 0,02 M, pH 7,0. Tampão de eluição para as duas cromatografias foi Tris-HCl 0,02 M, pH 7,0, com gradiente de NaCl 0-1 M (0-5 min, ausência de NaCl; 5-15 min, NaCl 25%; 15-45 min, NaCl 45%; 45 min, NaCl 100%; 45-50 min, NaCl isocrático; 50-60 min, ausência de NaCl). Linha azul representa eluição acompanhada por absorção ótica a $\lambda = 280$ nm. Linha vermelha indica o padrão de concentração de NaCl.

Durante o processo de cromatografia de exclusão molecular, a amostra de MRJP1 preparada com Tween® 20 aquecida por 10 min a 60°C apresentou ser uma condição melhor que a amostra não aquecida. Poderia ser melhor o resultado aquecendo a amostra de GR antes de ser ultrafiltrada. O processo de concentração da amostra (*cut-off* 10 kDa) poderia ter criado uma situação desfavorável para a purificação de MRJP1, visto que a concentração poderia ter forçado a interação entre proteínas da GR. Então as amostras não foram mais concentradas.

Assim, uma concentração de extrato de GR semelhante às utilizadas nas primeiras purificações de MRJP1 (0,25 g de GR para 1,1 mL de tampão) foi utilizada, sendo 0,5 g de GR solubilizadas em 2 ml de tampão Tris-HCl 20 mM, Tween® 20 1% (v/v) pH 7,0. A amostra foi agitada por 2 min, aquecida a 60°C por 10 min e então centrifugada a 16000 g. O sobrenadante era ultrafiltrado (*cut-off* 100 kDa) de acordo

como descrito na sessão 3.2 de Materiais e Métodos. Quinhentos microlitros do ultrafiltrado foram injetados na coluna de troca aniônica (Figura 31A). O cromatograma foi comparado ao de uma amostra preparada com os mesmos procedimentos, contudo, eliminando a etapa de aquecimento a 60°C (Figura 31B).

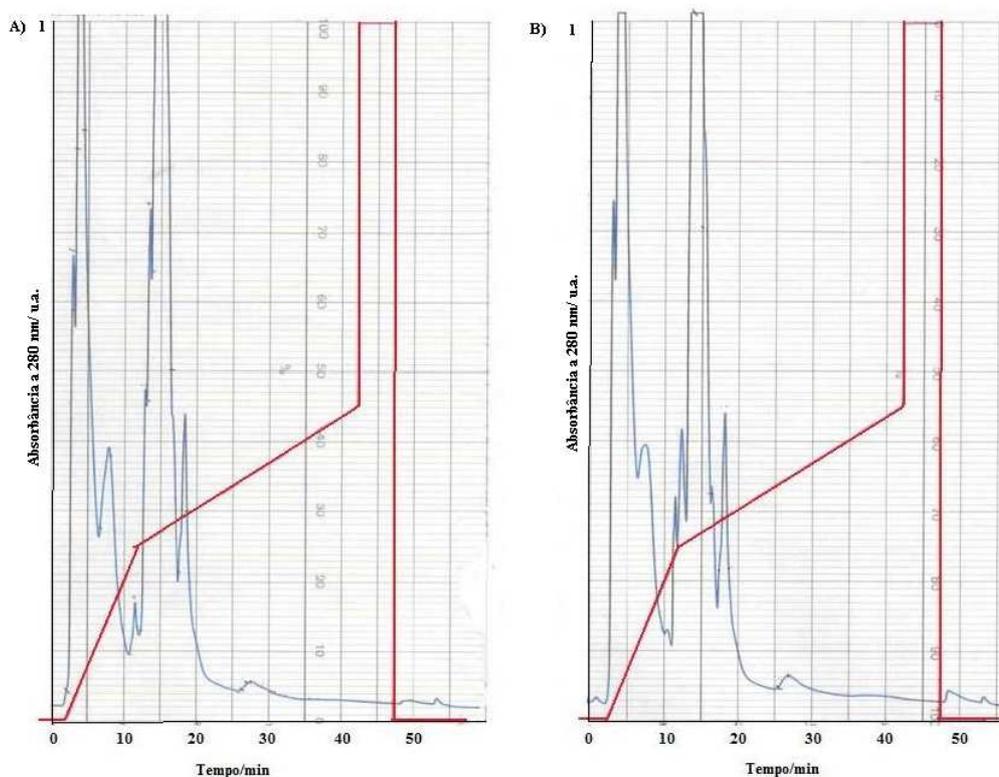


Figura 31. Cromatografia de troca aniônica com amostra aquecida ou não em tampão contendo Tween® 20 1% (v/v). A) Amostra de GR solubilizada em tampão Tris-HCl 0,02 M + Tween® 20 1% (v/v) pH 7,0 e aquecida por 10 min a 60°C. B) Amostra de GR solubilizada em mesmo tampão, sem ser aquecida. Tampão de eluição Tris-HCl 0,02 M, pH 7,0, com gradiente de NaCl 0-1 M (mesmo que na Figura 28). Linha azul representa eluição acompanhada por absorção ótica a $\lambda = 280$ nm. Linha vermelha indica o padrão de concentração de NaCl.

O aquecimento da amostra preparada com tampão contendo Tween® 20 seguida de ultrafiltração (*cut-off* 100 kDa) ainda não foi o suficiente para a purificação de MRJP1.

Em virtude de sucessivos resultados negativos, somente mais um ensaio de purificação utilizando o processo de ultrafiltração iria ser realizado. Este último ensaio se baseia na possibilidade do monômero de MRJP1 eluir com alguma outra fração ou em posições diferentes da estipulada e saber se a glicina junto com Tween® 20 faz algum efeito na purificação de MRJP1 no processo de ultrafiltração.

Para isso, foram realizadas três cromatografias com mesmo tampão de eluição e gradiente de NaCl, vindo a variação entre eles no preparo da amostra. Na primeira

cromatografia 0,15 mg de GR foram solubilizadas em 2 mL de tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,0, a solução foi agitada por 2 min, centrifugada a 16000 g e 500 μ L do sobrenadante foram injetados na coluna de troca aniônica (Figura 32A). Na segunda cromatografia, 0,15 g de GR passaram pelo mesmo tratamento que na cromatografia anterior, acrescido do processo de ultrafiltração (*cut-off* 100 kDa) após ser agitada e centrifugada a 16000 g (Figura 32B). Na última cromatografia, 0,15 g de GR foram solubilizadas em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,0, Tween® 20 1% (v/v) , Gly 1 M. A solução foi agitada por 2 min, aquecida por 10 min a 60°C e centrifugada a 16000 g. Então a solução seguiu como descrito na sessão 3.2 de Materiais e Métodos até o processo de ultrafiltração (*cut-off* 100 kDa), sendo 500 μ L do ultrafiltrado injetados na coluna de troca aniônica (Figura 32C).

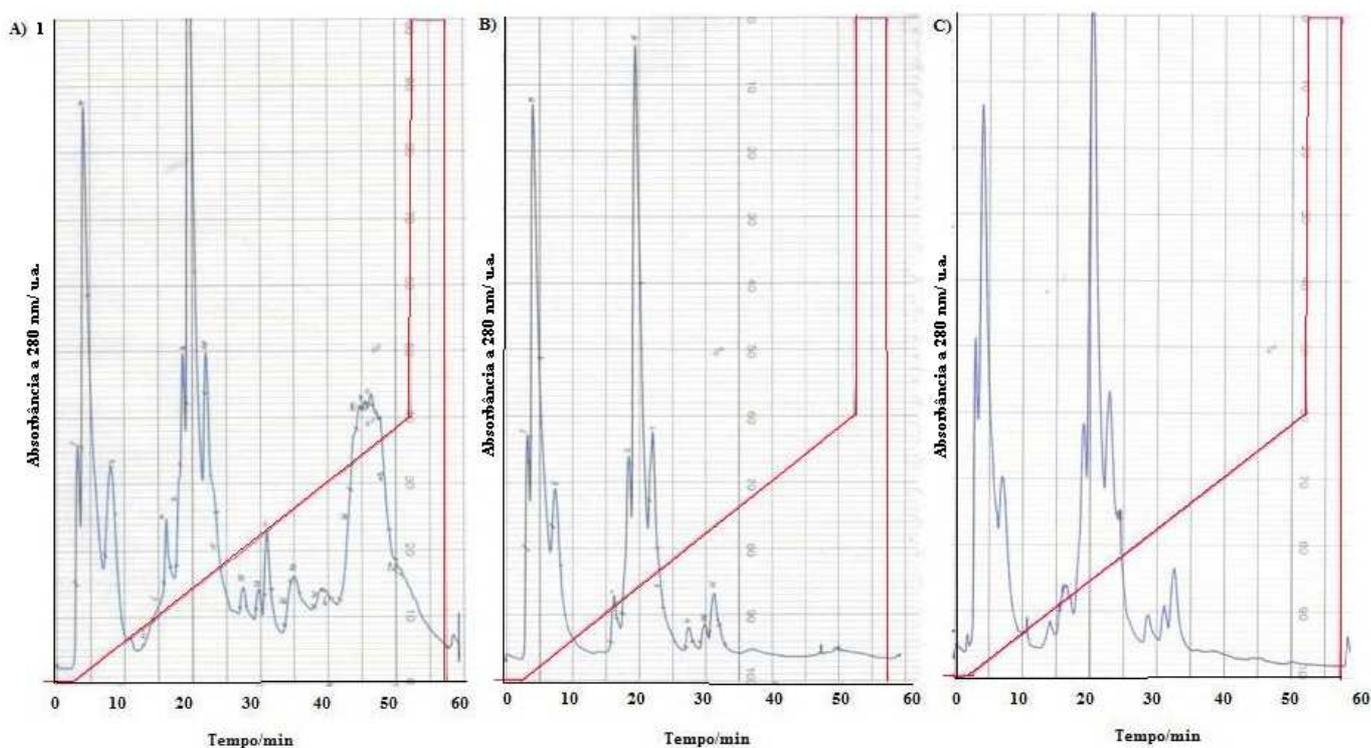


Figura 32. Comparação entre 3 cromatogramas de troca aniônica. A) Amostra de GR solubilizada em tampão Tris-HCl 0,02 M, pH 7,0. B) Amostra de GR solubilizada em tampão Tris-HCl 0,02 M, pH 7,0 e ultrafiltrada com membrana de *cut-off* 100 kDa. C) Amostra de GR solubilizada em tampão Tris-HCl 0,02 M, pH 7,0, Tween® 20 1% (v/v), Gly 1 M, aquecida por 10 min a 60°C e ultrafiltrada (*cut-off* 100 kDa). É possível notar a diferença basicamente na fração de MRJP1 presente em A e ausente nas outras ultrafiltradas. Tampão de eluição Tris-HCl 0,02 M, pH 7,0 com gradiente de NaCl 0-1 M (0-5 min, ausência de NaCl; 5-55 min, NaCl 40%; 55 min, NaCl 100%; 55-60 min, NaCl 100%). Linha azul representa eluição acompanhada por absorção ótica a $\lambda = 280$ nm. Linha vermelha indica o padrão de concentração de NaCl.

É claramente visível que a fração de MRJP1 está presente na primeira cromatografia e ausente nas outras. Nenhuma alteração de outra fração foi visível o suficiente para se afirmar com certeza que MRJP1 está sendo eluída em outra concentração de cloreto de sódio.

Assim, com esses resultados obtidos, o processo de ultrafiltração demonstrou ser totalmente ineficiente para purificação de MRJP1 em cromatografia de troca iônica, uma vez que não se foi observada a eluição da fração de MRJP1 em nenhum cromatograma.

Desta forma, foi possível observar que a MRJP1 purificada somente com um passo de cromatografia de troca aniônica apresenta diversas formas oligoméricas, o que dificulta o processo de cristalização de proteína. Além disso, ela é co-purificada com a apisimina, uma proteína de 5,5 kDa que se liga fortemente a MRJP1, provavelmente proporcionando uma oligomerização de monômeros de MRJP1.

A obtenção do monômero de MRJP1 é possível com dois passos de cromatografia, um de troca iônica e outro de exclusão molecular. Contudo, é pouco o rendimento desses processos na obtenção de frações puras do monômero de MRJP1, além de ser muito laboriosa.

A obtenção de grande quantidade de MRJP1 em um único passo de cromatografia de troca aniônica não foi possível devido a algum problema ainda não identificado no processo de ultrafiltração da amostra. Os procedimentos aplicados por Kamakura e colaboradores (2001) variam pouco com os procedimentos aplicados neste trabalho. Uma das diferenças é a coluna de troca aniônica, sendo a utilizada nesse trabalho Mono-Q (Pharmacia) e a do artigo citado DEAE-Toyopearl 650M (Tosoh, Tóquio, Japão) sendo a primeira forte trocadora de ânions, enquanto a segunda é fraca. Além disso, outra particular diferença é a GR, uma vez que utilizamos uma geleia produzida no Brasil e eles uma geleia produzida no Japão, notando que há diferenças na composição entre geleias real produzidas em diferentes localidades.

Novos procedimentos serão tomados para acúmulo do monômero de MRJP1, além de seguir em um trabalho paralelo para desenvolver um protocolo mais eficiente de purificação do monômero de MRJP1.

5 Conclusões

➤ A MRJP1 purificada por troca iônica, dialisada e liofilizada, tende, quando em solução, a se oligomerizar, podendo estar presente ao mesmo tempo nas formas moleculares de monômeros, dímeros e pentâmeros.

➤ Não foi possível obter uma única forma molecular de MRJP1 na presença de soluções contendo os surfactantes Brij 35, SDS e Tween® 20. A determinação das massas moleculares das proteínas eluídas em cromatografia de exclusão molecular foi dificultada, uma vez que os surfactantes também interagem com as proteínas calibrantes, alterando seus tempos de retenção, impossibilitando uma previsão correta das massas das proteínas eluídas nos tampões contendo detergentes.

➤ A MRJP1 adotou comportamento semelhante quando em solução PBS 20 mM, pH 7,0 e carbonato/bicarbonato 20 mM, pH 10,0. Com tais tampões, três massas moleculares predominantes de complexos de MRJP1 foram obtidas: 290 kDa, 120 kDa e 55 kDa, aproximadamente. Provavelmente, tais massas se referem a pentâmero, dímero e monômero de MRJP1, respectivamente.

➤ A adição de 0,5 M ao tampão carbonato/bicarbonato 20 mM, pH final 10,0, aumenta a proporção de monômeros de MRJP1 e reduz drasticamente a proporção de complexos de 290 kDa.

➤ MRJP1 tendeu a se agregar ou oligomerizar quando aquecida a 60°C por 10 min, em tampões ácidos com e sem glicina ou em tampão neutro com 2 M de glicina.

➤ Os monômeros de MRJP1 coletados de cromatografia de exclusão molecular com eluição em tampão carbonato/bicarbonato 20 mM, pH 10,0 com ou sem glicina tenderam a se oligomerizar quando dialisados e liofilizados. Já o monômero não liofilizado, mesmo sendo dialisado contra água destilada, não tendeu a se oligomerizar novamente.

➤ Armazenar o monômero de MRJP1 em temperaturas de – 22°C e 4°C por curtos períodos evita degradação e oligomerização.

➤ O processo de ultrafiltração ou tampão contendo EDTA prejudicam a purificação de MRJP1 por cromatografia de troca iônica. Nem mesmo com a adição de Tween® 20 durante as etapas de ultrafiltração é possível se verificar a fração de MRJP1 em cromatografia de troca iônica.

6 Perspectivas

- Desenvolver condições físico-químicas para obtenção de MRJP1 pura, em seu estado nativo e em uma única forma oligomérica ou monomérica,.
- Manter a MRJP1 em uma única forma estrutural, evitando associações ou dissociações.
- Cristalizar e resolver a estrutura tridimensional da MRJP1.
- Determinar relações entre estrutura e função de MRJP1 em função de suas interações com proteínas cerebrais de abelha e à luz de seu papel na diferenciação larval entre abelhas rainhas e operárias.

7 Referências Bibliográficas

ALBERT, S.; BHATTACHARYA, D.; KLAUDINY, J.; SCHMITZOVA, J.; SIMUTH, J. The family of major royal jelly proteins and its evolution. **J Mol Evol**, v. 49, n. 2, p. 290-7, Aug 1999.

ALBERT, S.; KLAUDINY, J. The MRJP/YELLOW protein family of *Apis mellifera*: Identification of new members in the EST library. **J Insect Physiol**, v. 50, n. 1, p. 51-59, 2004.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, n. 2, p. 93-99, 1987.

BLUM, M. S.; NOVAK, A. F.; TABER, S., 3RD. 10-Hydroxy-delta 2-decenoic acid, an antibiotic found in royal jelly. **Science**, v. 130, n. 3373, p. 452-3, Aug 1959.

CHEN, C.; CHEN, S.-Y. Changes in protein components and storage stability of Royal Jelly under various conditions. **Food Chem.**, v. 54, n. 2, p. 195-200, 1995.

COLGAN, T. J.; CAROLAN, J. C.; BRIDGETT, S. J.; SUMMER, S.; BLAXTER, M. L.; BROWN, M. J. F. Polyphenism in social insects: insights from a transcriptome-wide analysis of gene expression in the life stages of the key pollinator, *Bombus terrestris*. **BMC Genomics**, v 12, n. 623, 2011.

CRUZ, G. C. N. Neuroproteômica de abelhas: estrutura e estabilidade da proteína MRJP1 e suas interações com proteínas cerebrais. 2010. 178 f. Tese (Doutorado em Patologia Molecular) – Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília.

CRUZ, G. C. N.; GARCIA, L.; SILVA, A. J.; BARBOSA, J. A. R. G.; RICART, C. A. O.; FREITAS, S. M.; SOUSA, M. V. Calcium effect and pH-dependence on self-association and structural stability of the *Apis mellifera* major royal jelly protein 1. **Apidologie**, v. 42, n. 3, p. 252-269, 2011.

DRAPEAU, M. D. *et al.* A cis-regulatory sequence within the yellow locus of *Drosophila melanogaster* required for normal male mating success. **Genetics**, v. 172, n. 2, p. 1009-30, Feb 2006.

FARNAN, D. *et al.* Interlaced size exclusion liquid chromatography of monoclonal antibodies. **J Chromatogr A**, v. 1216, n. 51, p. 8904-9, Dec 18 2009.

FORET, S. *et al.* DNA methylation dynamics, metabolic fluxes, gene splicing, and alternative phenotypes in honey bees. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 13, p. 4968-73, Mar 27 2012.

FUJII, A.; KOBAYASHI, S.; KUBOYAMA, N.; FURUKAWA, Y.; KANEKO, Y.; ISHIHAMA, S.; YAMAMOTO, H.; TAMURA, T. Augmentation of wound healing by royal jelly (RJ) in streptozotocin-diabetic rats. **Jpn. J. Pharmacol.**, v. 53, n. 3, p. 331-7, Jul 1990.

FUJIWARA, S.; IMAI, J.; FUJIWARA, M.; YAESHIMA, T.; KAWASHIMA, T.; KOBAYASHI, K. A potent antibacterial protein in royal jelly. Purification and determination of the primary structure of royalisin. **J Biol Chem**, v. 265, n. 19, p. 11333-7, Jul 5 1990.

FUNASAKI, N. Gel filtration chromatographic study on the self-association of surfactants and related compounds. **Adv Colloid Interface Sci**, v. 43, n. 1, p. 87-136, Jan 25 1993

GARCIA, L.; GARCIA, C. H. S.; CALABRIA, L. K.; CRUZ, G. C. N.; PUENTES, A. S.; BAO, S. N.; FONTES, W.; RICART, C. A.; ESPINDOLA, F. S.; SOUSA, M. V. Proteomic analysis of honey bee brain upon ontogenetic and behavioral development. **J. Proteome Res.**, v. 8, n. 3, p. 1464-1473, Feb 9 2009.

GOTO, M.; MCCOY, B. J. Inverse size-exclusion chromatography for distributed pore and solute sizes. **Chemical Engineering Science**, v. 55, n. 4, p. 723-732, 2000.

HANES, J.; SIMUTH, J. Identification and partial characterization of the major royal jelly protein of the honey bee (*Apis mellifera* L.). **J. Apic. Res.**, v. 31, n. 1, p. 22-26, 1992.

HATTORI, N.; NOMOTO, H.; FUKUMITSU, H.; MISHIMA, S.; FURUKAWA, S. Royal jelly and its unique fatty acid, 10-hydroxy-trans-2-decenoic acid, promote neurogenesis by neural stem/progenitor cells in vitro. **Biomed. Res.**, v. 28, n. 5, p. 261-6, Oct 2007.

IRVINE, G. B. Size-exclusion high-performance liquid chromatography of peptides: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 352, n. 1, p. 387-397, 1997.

KAMAKURA, M.; FUKUDA, T.; FUKUSHIMA, M.; YONEKURA, M. Storage-dependent degradation of 57-kDa protein in royal jelly: a possible marker for freshness. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 65, n. 2, p. 277-84, Feb 2001a.

KAMAKURA, M.; FUKUSHIMA, M. Inhibition of specific degradation of 57-kDa protein in royal jelly during storage by ethylenediaminetetraacetic acid. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 66, n. 1, p. 175-8, Jan 2002.

KAMAKURA, M.; SUENOBU, N.; FUKUSHIMA, M. Fifty-seven-kDa protein in royal jelly enhances proliferation of primary cultured rat hepatocytes and increases albumin production in the absence of serum. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 282, n. 4, p. 865-874, Apr 2001b.

KAMAKURA, M.; MORIYAMA, T.; SAKAKI, T. Changes in hepatic gene expression associated with the hypocholesterolaemic activity of royal jelly. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 58, n. 12, p. 1683-1689, Dec 2006.

KAMAKURA, M. Royalactin induces queen differentiation in honeybees. **Nature**, v. 473, p. 478-483, Mai 26 2011.

KATO, A.; ONODERA, M.; ISHIJIMA, Y. Effect of royal jelly on development of genital organs in male mice. **J. Tokyo Vet. Anim. Sci.**, v. 35, p. 1–4, Mar 1998.

KIMURA, M. *et al.* 350-kDa royal jelly glycoprotein (apisin), which stimulates proliferation of human monocytes, bears the beta1-3galactosylated N-glycan: analysis of the N-glycosylation site. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 67, n. 9, p. 2055-8, Sep 2003.

KIMURA, Y.; MIYAGI, C.; KIMURA, M.; NITODA, T.; KAWAI, N.; SUGIMOTO, H. Structural features of N-glycans linked to royal jelly glycoproteins: structures of high-mannose type, hybrid type, and biantennary type glycans. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 64, n. 10, p. 2109-20, Oct 2000.

KIMURA, Y.; WASHINO, N.; YONEKURA, M. N-linked sugar chains of 350-kDa royal jelly glycoprotein. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 59, n. 3, p. 507-9, Mar 1995.

KLAUDINY, J.; KULIFAJOVÁ, J.; CRAILSHEIM, K.; SIMÚTH, J. New approach to the study of division of labour in honeybee colony (*Apis mellifera* L.), **Apidologie**, v. 25, p. 596–600, Mar 1994.

KNECHT, D.; KAATZ, H. H. Patterns of larval food production by hypopharyngeal glands in adult worker honey bees. **Apidologie**, v. 21, n. 5, p. 457-468, 1990.

KOSTANSKI, L. K.; KELLER, D. M.; HAMIELEC, A. E. Size-exclusion chromatography-a review of calibration methodologies. **J Biochem Biophys Methods**, v. 58, n. 2, p. 159-86, Feb 27 2004.

KOYA-MIYATA, S.; OKAMOTO, I.; USHIO, S.; IWAKI, K.; IKEDA, M.; KURIMOTO, M. Identification of a collagen production-promoting factor from an extract of royal jelly and its possible mechanism. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 68, n. 4, p. 767-73, Apr 2004.

KUBO, T.; SASAKI, M.; NAKAMURA, J.; SASAGAWA, H.; OHASHI, K.; TAKEUCHI, H.; NATORI, S. Change in the expression of hypopharyngeal-gland proteins of the worker honeybees (*Apis mellifera* L.) with age and/or role. **J Biochem**, v. 119, n. 2, p. 291-5, Feb 1996.

KUCHARSKI, R. *et al.* Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation. **Science**, v. 319, n. 5871, p. 1827-30, Mar 28 2008.

KUCHARSKI, R.; MALESZKA, R. Arginine kinase is highly expressed in the compound eye of the honey bee, *Apis mellifera*. **Gene**, v. 211, n. 2, p. 343-9, May 12 1998.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-5, Aug 15 1970.

NAKAJIN, S.; OKIYAMA, K.; YAMASHITA, S.; AKIYAMA, Y.; SHINODA, M. Effect of royal jelly on experimental hypercholesterolemia in rabbits. **Yakugaku Zasshi**, v. 36, p. 65-69, Mar 1982.

NOZAKI, R. *et al.* A rapid method to isolate soluble royal jelly proteins. **Food Chemistry**, v. 134, n. 4, p. 2332-2337, 2012.

OHASHI, K.; NATORI, S.; KUBO, T. Change in the mode of gene expression of the hypopharyngeal gland cells with an age-dependent role change of the worker honeybee *Apis mellifera* L. **Eur. J. Biochem.**, v. 249, n. 3, p. 797-802, Nov 1 1997.

OKA, H. *et al.* Suppression of allergic reactions by royal jelly in association with the restoration of macrophage function and the improvement of Th1/Th2 cell responses. **Int Immunopharmacol**, v. 1, n. 3, p. 521-32, Mar 2001.

PERKINS, D. N.; PAPPIN, D. J.; CREASY, D. M.; COTTRELL, J. S. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. **Electrophoresis**, v. 20, n. 18, p. 3551-67, Dec 1999.

REYNOLDS, J. A.; TANFORD, C. Binding of dodecyl sulfate to proteins at high binding ratios. Possible implications for the state of proteins in biological membranes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 66, n. 3, p. 1002-7, Jul 1970.

RÖGNER, M. Chapter 2 Size Exclusion Chromatography. In: MICHAEL, K. (Ed.). **Journal of Chromatography Library**: Elsevier, v. Volume 61, 1999. p.89-145.

SANO, O. *et al.* Characterization of royal jelly proteins in both Africanized and European honeybees (*Apis mellifera*) by two-dimensional gel electrophoresis. **J Agric Food Chem**, v. 52, n. 1, p. 15-20, Jan 14 2004.

SASAKI, K. *et al.* Caste differences in dopamine-related substances and dopamine supply in the brains of honeybees (*Apis mellifera* L.). **Gen Comp Endocrinol**, v. 178, n. 1, p. 46-53, Aug 1 2012.

SCARSELLI, R. *et al.* Towards royal jelly proteome. **PROTEOMICS**, v. 5, n. 3, p. 769-76, Feb 2005.

SCHMITZOVA, J.; KLAUDINY, J.; ALBERT, S.; SCHRODER, W.; SCHRECKENGOST, W.; HANES, J.; JUDOVA, J.; SIMUTH, J. A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 54, n. 9, p. 1020-30, Sep 1998.

SCHONLEBEN, S. *et al.* Proteome analysis of *Apis mellifera* royal jelly. **Anal Bioanal Chem**, v. 389, n. 4, p. 1087-93, Oct 2007.

SHEN, L. *et al.* Expression of Acc-Royalisin gene from royal jelly of Chinese honeybee in *Escherichia coli* and its antibacterial activity. **J Agric Food Chem**, v. 58, n. 4, p. 2266-73, Feb 24 2010.

SHINODA, M.; NAKAJIN, S.; OIKAWA, T.; SATO, K., KAMOGAWA, A.; AKIYAMA, Y. Biochemical studies on vasodilative factor in royal jelly. **Yakugaku Zasshi**, v. 98, p. 139–145, Mar 1978.

SIMPSON, S. J.; SWORD, G. A.; LO, N. Polyphenism in insects. **Curr Biol**, v. 21, n. 18, p. R738-49, Sep 27 2011.

SIMUTH, J. Some properties of the main protein of honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly. **Apidologie**, v. 32, n. 1, p. 69-80, 2001.

TAKENAKA, T. Chemical compositions of royal jelly. **Honeybee Sci.**, v. 3, p. 69-74, 1982.

TAMURA, S.; AMANO, S.; KONO, T.; KONDOH, J.; YAMAGUCHI, K.; KOBAYASHI, S.; AYABE, T.; MORIYAMA, T. Molecular characteristics and physiological functions of major royal jelly protein 1 oligomer. **Proteomics**, v. 9, n. 24, p. 5534-43, Dec 2009.

TAMURA, S.; AMANO, S.; KONO, T.; KONDOH, J.; YAMAGUCHI, K.; KOBAYASHI, S.; AYABE, T.; MORIYAMA, T. Molecular characteristics and physiological functions of major royal jelly protein 1 oligomer. **Proteomics**, v. 9, n. 24, p. 5534-43, Dec 2009.

TAMURA, T.; FUJII, A.; KUBOYAMA, N. Antitumor effects of royal jelly (RJ). **Folia Pharmacologica Japonica**, v. 89, n. 2, p. 73-80, Feb 1987.

TOWNSEND, G. F.; BROWN, W. H.; FELAUER, E. E.; HAZLETT, B. Studies on the in vitro antitumor activity of fatty acid IV. The esters of acids closely related to 10-hydroxy-2-decenoic acid from royal jelly against transplantable mouse leukemia. **Can. J. Biochem. Physiol.** v. 39, p. 1765–1770, Mar 1961.

TOWNSEND, G. F.; MORGAN, J. F.; HAZLETT, B. Activity of 10-hydroxydecenoic acid from royal jelly against experimental leukaemia and ascitic tumours. **Nature**, v. 183, n. 4670, p. 1270-1, May 2 1959.

TOWNSEND, G. F.; MORGAN, J. F.; TOLNAI, S.; HAZLETT, B.; MORTON, H. J.; SHUEL, R. W. Studies on the in vitro antitumor activity of fatty acids. I. 10-Hydroxy-2-decenoic acid from royal jelly. **Cancer Res**, v. 20, p. 503-10, May 1960.

WALDEN, H. *et al.* Tiny TIM: a small, tetrameric, hyperthermostable triosephosphate isomerase. **J Mol Biol**, v. 306, n. 4, p. 745-57, Mar 2 2001.

WATANABE, K.; SHINMOTO, H.; KOBORI, M.; TSUSHIDA, T.; SHINOHARA, K.; KANAEDA, J.; YONEKURA, M. Stimulation of cell growth in the U-937 human myeloid cell line by honey royal jelly protein. **Cytotechnology**, v. 26, n. 1, p. 23-27, 1998.

WINZOR, D. J. Analytical exclusion chromatography. **J Biochem Biophys Methods**, v. 56, n. 1–3, p. 15-52, 2003.

YU, C.-M.; MUN, S.; WANG, N.-H. L. Theoretical analysis of the effects of reversible dimerization in size exclusion chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1132, n. 1-2, p. 99-108, 2006.