



ROSA MARIA FERNANDES DE BARROS 272

PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E FUNCIONAIS DA HEMOCIANINA

DE MOLUSCO GASTROPODA Ampullaria canaliculata.

Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida pela candidata Rosa Maria Fernandes de Barros e aprovada pela Comissão julgadora.

*Maria Sumiko Arita Matsuura 11/05*

TESE APRESENTADA A UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - NA ÁREA DE BIOQUÍMICA.

Orientadora : Dra. Maria Sumiko Arita Matsuura.

CAMPINAS

1992

05443



## A G R A D E C I M E N T O S

A Profa. Dra. Maria Sumiko Arita Matsuura, pela orientação desse trabalho e pelo engrandecimento de meus conhecimentos

Ao Prof. Aldo Focesi Jr., por ter nos franquiado o seu laboratório.

As Profas. Dras. Lúcia Pereira da Silva, Satie Matsushika Ogo e Maria Alice Cruz Hüfling, pelas importantes críticas e sugestões feitas para o aprimoramento desse trabalho, por ocasião de sua análise prévia.

Ao Prof. Dr. Jorge Faria Vaz, do Departamento de Zoologia da USP, pelas informações a respeito do animal utilizado.

A Mickie Takagai, pela amizade sincera, integridade no convívio, ajuda e discussão nos experimentos realizados

Aos colegas da Bioquímica da UFMS pela colaboração na realização dos trabalhos didáticos.

Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da UNICAMP, que por diversas maneiras colaboraram para o cumprimento dessa etapa.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente contruíbaram para a realização desse trabalho, meus sinceros agradecimentos.

# I N D I C E

Resumo.....	i
Summary.....	ii
1. Introdução .....	1
2. Material e Métodos .....	15
2.1. Material Biológico .....	15
2.2. Determinação do pH da hemolinfa .....	15
2.3. Determinação da concentração de proteínas.....	16
2.4. Obtenção da hemolinfa desionizada .....	16
2.5. Purificação da hemocianina.....	16
2.6. Determinação do peso molecular e efeito de ions Ca <sup>2+</sup> e EDTA sobre a dissociação da hemocianina.....	17
2.7. Propriedade de ligação do ligante O <sub>2</sub> .....	18
2.8. Preparo do imunógeno.....	20
2.9. Obtenção do soro de coelho anti-hemocianina de .....	20
2.10. Análise imunoeletroforética.....	21
3. Resultados.....	23
3.1. Purificação e caracterização parcial do material biológico.....	23
3.2. Espectro de absorção.....	24
3.3. Determinação do peso molecular dos estados de agregação da hemocianina.....	26
3.4. Propriedades funcionais da hemocianina.....	30
3.5. Estado de dissociação da hemocianina.....	34

3.6. Efeito de EDTA e dos cátions divalentes sobre o estado de agregação da hemocianina.....	35
4. Discussão .....	38
5. Referências Bibliográficas .....	49

## R E S U M O

Hemocianina do Gastrópodo anfíbio Ampullaria canaliculata, da região do Pantanal Mato Grossense, mostrou grande similaridade com as hemocianinas de moluscos terrestres e marinhos, especialmente, com relação ao peso molecular e aos tipos de produtos de dissociação.

A determinação do peso molecular da hemocianina de A. canaliculata determinado por cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephacryl S-400 mostrou somente um pico de eluição, tanto na hemolinfa total quanto na hemocianina em presença de  $\text{Ca}^{2+}$  20 mM e  $\text{Mg}^{2+}$  20 mM, estimado em torno de  $7.5 \times 10^6$  Da.

Hemocianina desionizada de A. canaliculata submetida à filtração em gel resultou na formação de três picos, que através do volume de eluição mostraram ser proteínas de unidade de peso molecular  $7.5 \times 10^6$  Da,  $1.0 \times 10^6$  Da e  $3.2 \times 10^5$  Da, sugerindo ser espécies moleculares correspondentes a 1/1, 1/10 e 1/20 da proteína nativa.

Com a hemolinfa total, recém coletada, foram realizadas experiências de equilíbrio com  $\text{O}_2$  diretamente, variando apenas os valores de pH, e obteve-se um valor de  $P_{50} = 3.5$  mm Hg e  $n_H = 2.3$  em pH 8.2.

O efeito de cátions divalentes sobre o estado de agregação de hemocianina de A. canaliculata, assim como os

diferentes picos eluidos da coluna de Sephacryl S-400 são ilustradas por análises imunoelctroforéticas.

## S U M M A R Y

The functional properties of A. canaliculata hemocyanins, in their ability to transport oxygen, are very similar to several hemocyanins studied. In this snail the oxygen binding strength increases with increasing pH, exhibiting a normal Bohr shift. The oxygen binding to hemocyanins is also affected by presence of divalent cations. In this context, the two cations  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  act similarly, with no changes in the  $P_{50}$  and Bohr effect values. The oxygen curve using hemocyanin free of divalent cations showed inconsistent data for  $P_{50}$  and  $n_H$  values, suggesting the production of different association and dissociation behavior with pH variation. However, the hemolymph showed higher values of  $\log P_{50}$  than the hemocyanin in presence of divalent cations. This phenomenon should be explained by the existence of dialyzable factors, not strongly associated with hemocyanin, which does not affect cooperativity of the oxygen binding and Bohr effect. The A. canaliculata hemocyanin does not exhibit cooperative oxygen binding in the presence of EDTA, since on treatment with EDTA to remove divalent cations, it dissociates into several subunits as expected and shown by the immunoelectrophoretic analysis.

The molecular weight of A. canaliculata hemocyanin was determined by gel filtration. The native hemolymph, as well as

with hemocyanin in the presence of cations  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  showed  $M_w = 7.5 \times 10^6$  Da,  $1.0 \times 10^6$  Da and  $3.2 \times 10^5$  Da. However, for the preparation to the same hemocyanin dialyzed against buffer free of divalent cations, three molecular species of  $M_w = 7.5 \times 10^6$  Da were obtained.

The fractions eluted from Sephacryl S-400 column as well as effect of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  on both the stability of hemocyanin and reversibility of products of dissociation caused by EDTA were illustrated by immunologic analysis.



## I N T R O D U Ç Ã O

Moléculas transportadoras de oxigênio molecular constituem um excelente modelo para o estudo da correlação entre estrutura, função e evolução de proteínas, devido à sua ocorrência em quase todo o reino animal, constituindo, portanto, marcadores genéticos por excelência. Essas moléculas apresentam uma diversidade de propriedades funcionais (armazenar, transportar ou facilitar a difusão do oxigênio), formas e tamanhos em diferentes organismos; entretanto, todas elas são capazes de ligar reversivelmente o  $O_2$ . O estudo comparativo das propriedades funcionais e estruturais dessas moléculas transportadoras de  $O_2$  provenientes de diferentes organismos poderá contribuir para esclarecer o processo da evolução molecular, como também fornecer subsídios para melhor compreensão de suas propriedades alostéricas.

No decorrer da evolução foram desenvolvidas duas classes de proteínas transportadoras de oxigênio: globinas (mioglobinas e hemoglobinas) e hemocianinas.

Hemoglobinas de vertebrados são as que tem sido melhor estudadas sob ponto de vista estrutural e funcional. Estruturalmente, esse pigmento respiratório de importância fundamental para os seres vivos, é constituído de quatro cadeias polipeptídicas, das quais duas são denominadas cadeias alfa, cada

uma contendo 141 resíduos de aminoácidos, e as outras duas designadas beta, apresentando, cada uma, 146 resíduos de aminoácidos. Esses dois tipos de cadeias, alfa e beta, possuem estruturas secundárias e terciárias muito semelhantes entre si e similares à mioglobina. O tetrâmero apresenta peso molecular de 64 000 Da e conformação altamente organizada para desempenhar o transporte de oxigênio molecular que é regulado através da cooperatividade na ligação com O<sub>2</sub> proveniente de interação homotrópica, e pelo efeito exercido por interações heterotrópicas (Perutz, 1965; Perutz et alii., 1968; Perutz, 1970; Perutz et alii., 1971, e Antonini & Brunori, 1971).

A maior diferença no mecanismo funcional entre as moléculas transportadoras de O<sub>2</sub> de vertebrados e invertebrados esta no estado de agregação das subunidades. A maioria das hemoglobinas de vertebrados é tetramérica, exceto as hemoglobinas de lampréia que são monoméricas (Briehl, 1963), e hemoglobinas de Liophis miliaris, que apresentam formas diméricas quando oxigenadas (Matsuura et alii., 1987; Matsuura et alii., 1989; Focesi Jr. et alii., 1990). Atualmente, acredita-se que as propriedades alostéricas de hemoglobinas se originam das interações regulatórias entre as subunidades, intimamente relacionadas ao mecanismo de transição do tetrâmero (---) dímero dependente de oxigenação, ou seja dissociação do tetrâmero ( $\alpha/\beta$ ), forma desoxigenada, em  $2\alpha\beta$ , forma oxigenada. (Doyle et alii., 1991; Shibayama et alii., 1991; Speros et alii., 1991). As

moléculas transportadoras de  $O_2$  em invertebrados apresentam várias subunidades e esse fenômeno de dissociação/associação pode afetar a afinidade das moléculas pelo  $O_2$  (Larimer & Riggs, 1964; Antonini & Chiancone, 1977; Bonaventura et alii., 1983; Mangum, 1980; 1991). Outro mecanismo de regulação das proteínas respiratórias é o denominado controle alostérico. Esse pode ser de dois tipos: homotrópico, onde o efeito da ligação a um dos sítios ativos aumenta a afinidade de outros sítios localizados em outras subunidades da proteína oligomérica. Esse tipo de interação é frequentemente referido como cooperatividade. Interações cooperativas em proteínas são geralmente calculadas a 50% de saturação onde  $(\log Y/(1-Y)=0)$ . Estimativa gráfica da inclinação da curva de dissociação do  $O_2$  a 50% de saturação fornece o valor do coeficiente de Hill ( $n_H$ ), onde  $n_H = 1.0$  significa ausência de cooperatividade, ou seja, a ligação de cada molécula de  $O_2$  é independente das outras:  $n_H = 2.0$  significa que a ligação do oxigênio na hemoglobina é cooperativa, isto é, a ligação em um heme facilita a ligação do oxigênio em outros hemes da mesma molécula. A segunda classe de interações alostéricas é aquela designada efeitos heterotrópicos, manifestado quando a ligação de um efetor em um sítio específico da molécula muda a afinidade do sítio ativo da proteína. Os efetores alostéricos mais comuns nas moléculas transportadora de  $O_2$  em vertebrados são os prótons, o  $CO_2$ , e os ânions polifosfatos (Benesch & Benesch, 1967; Benesch et alii., 1968a; Kilmartin et alii., 1980) e os prótons e íons divalentes como

Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> em invertebrados (Brouwer et alii., 1978; Bonaventura & Bonaventura, 1980).

A teoria universalmente aceita para explicar as interações alostéricas é aquela proposta por Monod, Wyman e Changeaux (Monod et alii., 1965). Esse modelo é conhecido como MWC, ou modelo de dois estados conformacionais, ou "2-state Model". No modelo MWC assume-se que a proteína existe em apenas dois estados: um de alta afinidade ou estado R (relaxado) e um de baixa afinidade ou estado T (tenso). De acordo com o modelo MWC, a forma da curva de dissociação do O<sub>2</sub> pode ser interpretada da seguinte maneira: a molécula desoxigenada está no estado T: o primeiro estágio da ligação de O<sub>2</sub> reflete as propriedades da molécula na conformação T que apresenta baixa afinidade pelo O<sub>2</sub>. Extrapolação da curva até 50% de saturação leva a uma estimativa da afinidade pelo O<sub>2</sub> no estado T. Após a combinação de um certo número de moléculas de O<sub>2</sub> com a proteína ocorre uma transição conformacional e a inclinação do gráfico de Hill aumenta. Nessa parte da curva manifesta-se a cooperatividade na ligação da molécula protéica com O<sub>2</sub> e o valor do coeficiente de Hill é maior do que a unidade ( $n_H > 1$ ). Quando a transição conformacional se completa, a ligação da molécula com O<sub>2</sub> novamente torna-se não cooperativa, mas reflete as propriedades da molécula na conformação R que tem alta afinidade pelo O<sub>2</sub>. Desta forma, as interações homotrópicas entre as subunidades originam-se em virtude da transição conformacional entre os estados T e R.

Segundo esse mesmo modelo, a base das interações heterotrópicas é a ligação preferencial das moléculas efetoras a um determinado estado conformacional. Assim, um determinado efetor pode ativar ou inibir a propriedade funcional da proteína. Por exemplo, em proteínas respiratórias de vertebrados que apresentam efeito Bohr alcalino, os prótons estabilizam a conformação T, e estes prótons são liberados quando ocorre a transição conformacional T -----> R da molécula após oxigenação. Em moléculas transportadoras de O<sub>2</sub> nos invertebrados, os efetores alostéricos podem estabilizar a conformação de baixa afinidade ou a de alta afinidade (Bonaventura et alii., 1980). Desta maneira, os organismos usam a natureza alostérica da ligação de O<sub>2</sub> às suas proteínas para se adaptarem às mudanças que ocorrem frequentemente em seu habitat.

Entre os invertebrados, encontram-se outros tipos de proteínas respiratórias, tais como, eritrocruorinas que são hemoglobinas extracelulares encontradas entre os anelídeos, moluscos e artrópodos e hemocianinas que ocorrem em artrópodos e moluscos e apresentam cor azul quando oxigenadas.

Os anelídeos são caracterizados pela multiplicidade de adaptações respiratórias e sua distribuição parece estar governada pelas condições ambientais específicas e adaptações fisiológicas espécie-específicas (Weber, 1975). A hemoglobina de Lumbricus terrestris tem sido a mais estudada sob aspecto funcional, estrutural e filogenético (Vinogradov et alii., 1980; Fushitani et alii., 1986; Fushitani et alii., 1988; Jhianq et alii., 1989). Hemoglobinas de anelídeos apresentam propriedades

funcionais que variam amplamente chegando-se a situações extremas; baixa afinidade pelo  $O_2$ , ausência do efeito Bohr e cooperatividade (Rossi-Fanelli et alii., 1970; David & Daniel, 1974) ou alta afinidade pelo  $O_2$ , com alta cooperatividade e efeito Bohr (Garlick & Riggs, 1982). Suas afinidades pelo  $O_2$  são geralmente insensíveis aos fosfatos orgânicos, mas são sensíveis a sais inorgânicos, tais como,  $NaCl$ ,  $CaCl_2$ ,  $HgCl_2$  (Weber, 1980; Fushitani et alii., 1986).

A maioria das moléculas transportadoras de  $O_2$  em invertebrados apresenta elevado peso molecular e são classificadas de acordo com o número de sítios ativos e subunidades das hemoglobinas. Desde que as estruturas das subunidades das hemoglobinas extracelulares, quando comparadas às das hemocianinas apresentam considerável similaridade, passaremos a relatar a classificação destas hipermoléculas com base na estrutura quaternária. De acordo com Vinogradov, (1985) estas proteínas podem ser classificadas em 4 grupos distintos:

### 1. Domínios simples, moléculas de subunidade simples

Essas moléculas consistem de uma cadeia polipeptídica contendo um sítio ativo e apresentando peso molecular aproximadamente 16 000 Da. Esses tipos de moléculas são monoméricas e são encontradas em protozoários ciliados, tais

como, Paramecium e Tetrahymena (Keilin & Ryley, 1953; Steers & Davis, 1979 e Irie & Usuki, 1980), podendo também ocorrer em muitos tecidos de parasitas como platelmintos e nematóides (Lee & Smith, 1965; Ellenby & Smith, 1966; Phillips, 1978). Entre os insetos são encontrados muitos raramente; ocorrem em Hemiptera Euanoa confusa (Bergstrom, 1977), e entre Diptera somente na larva do Chironomus (Braun et alii., 1968). As hemoglobinas do polychaeta Aphrodite aculeata e do molusco gastrópoda Aplysia californica mostraram ser também monoméricas (Wittenberg et alii., 1965)

## 2. Dois domínios, moléculas de subunidades múltiplas.

A menor subunidade desse tipo de moléculas é uma cadeia polipeptídica de 30.000 - 40.000 Da contendo dois grupos prostéticos. Tal cadeia é, provavelmente, o resultado da duplicação do gene ancestral da globina. Esses tipos de moléculas são encontradas entre os crustáceos com carapaças (Ilan & Daniel, 1979a e Daniel, 1983). Hemoglobina dimérica ocorre também na larva do hemíptero Gastrophilus intestinalis e apresenta peso molecular de 35 000 Da e um P.M. mínimo, baseado no conteúdo de grupo prostético, de 17.600 Da (Phelps et alii., 1972).

## 3. Domínios múltiplos, moléculas de subunidades múltiplas.

Essas moléculas consistem de duas ou mais cadeias polipeptídicas, cada qual apresentando 8 - 20 domínios de ligações com oxigênio molecular. Tais cadeias devem ter sido

originadas como resultado de repetidas duplicações do gene ancestral da globina, e são encontradas em crustáceos sem carapaças, tais como Planorbis corneus e Helisoma trivalvis (Wood & Mosby, 1975 e Terwilliger et alii 1976a).

#### 4. Domínios simples, moléculas de subunidades múltiplas.

Essas moléculas consistem de agregados de cadeias simples. Algumas subunidades são ligadas por pontes dissulfetos como as hemoglobinas triméricas de Lumbricus terrestris (Fushitani et alii., 1986; Fushitani et alii., 1989).

Em invertebrados as moléculas transportadoras de O<sub>2</sub> estão distribuídas entre anelídeos, moluscos e artrópodos; apresentam múltiplas subunidades estruturais, elevado peso molecular e marcada variação funcional (Vinogradov et alii., 1976; Suzuki et alii., 1982; Bonaventura & Bonaventura, 1983).

As hemocianinas são funcionalmente análogas às hemoglobinas de vertebrados e invertebrados. Elas são proteínas oligoméricas contendo cobre, e estão envolvidas no transporte de oxigênio molecular em artrópodos e moluscos. Na forma oxigenada, elas se apresentam com a coloração azul e na forma desoxigenada são incolores. O oxigênio molecular liga-se a dois átomos de cobre e a cor azul que aparece reflete a mudança no estado de oxidação dos átomos de cobre (Cu<sup>+1</sup> <-----> Cu<sup>+2</sup>). Em moluscos existe um sítio de ligação cobre-oxigênio por unidade de 50 000 Da, enquanto que em artrópodos existe um sítio de cobre-oxigênio por proteína de 75 000 Da (Brouwer et alii., 1976, 1978, 1979).



Embora as propriedades funcionais, tais como, cooperatividade, efeito de prótons e efeito de íons divalentes das hemocianinas de artrópodos e moluscos mostrem ser similares, a arquitetura molecular e a estrutura das subunidade diferem marcadamente nos dois grupos. Em moluscos o peso molecular da subunidade funcional mínima é de 300.000 - 400.000 Da e cada subunidade contém cerca de 8 sítios de ligação com O<sub>2</sub> (Brouwer & Kuiper, 1973 e Qwitter et alii., 1978). A subunidade da hemocianina de molusco existe como estrutura de domínios múltiplos e os domínios de ligação do O<sub>2</sub> são unidades relativamente compactas que podem ser isoladas por clivagem proteolítica do polipeptídeo (Lontie et alii., 1973; Gielens et alii., 1975). Na hemolinfa de moluscos as subunidades de 400.000 Da estão dispostas dentro da hipermolécula que apresenta forma cilíndrica de 350 Angstrons de diâmetro e 380 Angstrons de comprimento, e o peso molecular da ordem de  $7 - 9 \times 10^6$  Da.

Com base na reconstrução tridimensional obtida através de microscopia eletrônica, as moléculas nativas parecem ser compostas de três elementos estruturais; uma parede, dois colares e duas capas (Melema & Klug, 1972; van Bruggen et alii., 1981).

Diferentes arranjos das subunidades dentro do cilindro tem sido sugerido por vários autores com base nos estudos físico-químicos dos produtos de dissociação. A molécula nativa pode formar espécies moleculares de 1/2, 1/10 e 1/20 do peso molecular original. A região entre as cadeias polipeptídicas da molécula

dissociada em 1/10 parece ser responsável pelo encaixe helicoidal da molécula. Esse tipo de molécula quando observada ao microscópio eletrônico apresenta-se como cilindros com a metade da altura da molécula intacta. Seria de grande interesse conhecer as condições nas quais os elementos capas, colares e paredes são definidos para constituição das cadeias polipeptídicas. Acredita-se que a base para definição dessas estruturas reside ao nível dos domínios de aproximadamente 50.000 Da. Heterogeneidade entre esses domínios tem sido demonstrada por proteólise limitada das subunidades e parece estar intimamente envolvida com a formação do colar no cilindro (Lontie & Witters, 1973; Verschueren et alii., 1981; Gielens et alii., 1981a e 1981b)

Modelos para organização de átomos de cobre no sítio ativo tem sido proposto por Frieden et alii., (1965), sugerindo que os sítios de ligação de O<sub>2</sub> nas hemocianinas consistem de um par de átomos de cobre ligado diretamente aos aminoácidos da cadeia protéica. Por outro lado, vários estudos têm demonstrado que o cobre está localizado em um ambiente fortemente hidrofóbico sugerindo que o sítio ativo possa ser uma reminiscência do sítio da hemoglobina, onde o grupo heme também se encontra localizado, isto é, em uma região altamente hidrofóbica, o "heme pocket" (Freedman et alii., 1976; Shaklai et alii., 1978)

A dissociação da hemocianina em subunidades e a ligação do O<sub>2</sub> à hemocianina são influenciadas pela presença de cátions divalentes e pela variação de pH e força iônica sugerindo que o grau de dissociação da hemocianina pode ser um fator importante

na alteração da curva de dissociação do oxigênio molecular (Larimer & Riggs, 1964). Experimentos com hemocianina de Homarus sp, (Pickett et alii., 1966) demonstraram que a forma da curva de equilíbrio com  $O_2$  não se altera quando são formadas moléculas de espécie 1/2, porém o valor do coeficiente de Hill é menor quando comparado à molécula não dissociada. Linzen et alii., (1977) verificaram, que pelo menos três tipos de subunidades de diferentes pesos moleculares estão envolvidas no desencadeamento das propriedades funcionais da hemocianina de Eurypelma hentzi, ou seja, espécies moleculares do tipo 1/1, 1/2 e 1/10. Agregados maiores são favorecidos perto de pH neutro, e à medida que os valores de pH se distanciam para valores abaixo ou acima do pH neutro podem propiciar formação de moléculas dissociadas. As espécies moleculares que predominam perto do pH neutro apresentam coeficiente de sedimentação 100 S e 60 S e as suas interconversões dependem da presença de íons  $H^+$  e  $Ca^{2+}$  na solução. Alguns trabalhos sobre o assunto tem sido relatado por Waugh, (1954) e estudos mais recentes tem sido sumarizados por Herskovits, (1988).

Cátions divalentes como  $Ca^{2+}$  e  $Mg^{2+}$  estabilizam a molécula de hemocianina na forma nativa e afetam a afinidade da molécula pelo  $O_2$ . Evidência direta da interação do íon  $Ca^{2+}$  com a hemocianina tem sido descrita por Klarman et alii., (1972, 1975, 1977). Os cátions divalentes, especialmente o  $Ca^{2+}$  tem mostrado duplo papel, isto é, controlando as interações entre as

subunidades e a afinidade de  $O_2$  no sítio do cobre. Hemocianina de Levantina heirosolima em pH 8.2 demonstrou possuir 20 sítios de ligação com o  $Ca^{2+}$  /50 000g de proteína, e dados experimentais demonstraram que concentrações de  $Ca^{2+}$ , na solução, menores do que 20 mM, apresentaram valores de  $nH = 1$  demonstrando não exibir cooperatividade.

Hemocianina é um excelente imunógeno. Assim, quando a hipermolécula é injetada em coelhos são produzidos, no estágio inicial, anticorpos contra os determinantes antigênicos acessíveis, ou seja, aqueles localizados na superfície da molécula denominados determinantes antigênicos conformacionais. Quando anticorpos e a hemocianina que serviu com imunógeno são misturados, ocorre reação de imunoprecipitação. Provas de reação cruzada podem ser realizadas com o anticorpo, fazendo-o reagir com hemocianinas relacionadas. Esse tipo de experimento geralmente se faz para investigar relações filogenéticas e diferenças entre espécies (Boyd, 1937; Bartel & Campbell, 1959; Denuce & Cushing, 1963).

Malley et alii., (1965), mostraram a importância dos estudos imunológicos na elaboração da sistemática bioquímica de crustáceos. Gielens et alii., (1981) e Wood, (1975) estabeleceram a presença de determinantes antigênicos comuns entre as hemocianinas pertencentes a famílias relacionadas, e a existência de determinantes antigênicos específicos entre algumas espécies mais correlatas. Esses autores observam também uma boa correlação entre a estrutura antigênica das hemocianinas estudadas e o

número de peptídeos tripsínicos comuns. Por outro lado, Bartel & Campbell, (1959) e Weigle, (1964) demonstraram que no processo de dissociação das moléculas nativas, alguns novos determinantes antigénicos são revelados.

Gastrópodos terrestres pulmonados e prosobrânquios marinhos tem sido estudados por vários pesquisadores (Svedberg & Pedersen, 1934; Wood, 1975; Ellerton et alii., 1983, Airoidi, 1983; Herskovits et alii., 1988; 1989; 1990; Petrovich et alii., 1990; Mangum, 1991). Entretanto, muito pouco se tem relatado sobre as hemocianinas de moluscos de água doce e especialmente sobre moluscos anfíbios. Entre os anfíbios prosobrânquios existem vários géneros e espécies na família Ampullaridae, superfamília Viviparacea, e é de conhecimento de longa data que as Ampulárias apresentam uma estrutura respiratória não usual (Troschel, 1845 e Pelseneer, 1895).

Ampullaria canaliculata é um molusco anfíbio apresentando apenas uma brânquia que é suficiente para a sobrevivência no seu meio natural aquático; porém dispõe de um pulmão que pode funcionar quando o animal está fora da água, o ar tem ampla entrada no saco pulmonar pelo pneumótomo dilatado onde se pode ter uma visualização da vascularização do pulmão. Por outro lado, quando o molusco está dentro da água, o pneumótomo obstrui completamente a abertura fechando hermeticamente a câmara pulmonar. Por este mecanismo o animal impede a entrada de água no pulmão, e o ar é absorvido por meio do tubo sifonal. A brânquia

funcional é monopectinada e única. Começa imediatamente atrás dos anéis do manto e segue até a parte posterior do intestino e medialmente até alcançar o ângulo frontal do lóbulo renal anterior. Desvia-se então para o lado esquerdo até terminar no ângulo pericardial. A brânquia está constituída por lamelas triangulares que se apoiam pela base na parte interna do manto. O órgão resultante do desdobramento do manto, adaptado especialmente para respiração, é o que se denomina pulmão nesses animais. Esse pulmão é considerado como um órgão de adaptação da vida anfíbia que veio agregar-se à brânquia, o órgão primitivo de respiração. Outra característica interessante desses animais é a hibernação, podendo passar o inverno enterrados no fundo das lagoas onde os níveis de  $O_2$  são muito baixos (Robson, 1922; Prashad, 1925; 1932; Andrews, 1965a; 1965b; McClary, 1964). Esse molusco apesar de seus caracteres primitivos de prosobrânquios, apresenta alta especialização no sistema respiratório relacionado às condições ambientais. Nesse contexto, pode-se esperar que a molécula transportadora de  $O_2$  desse molusco deva apresentar particularidades importantes sob ponto de vista funcional, estrutural e evolutivo.

Do exposto, podemos verificar as características interessantes apresentadas por essas hipermoléculas. Desta forma, na presente tese propusemo-nos a estudar algumas das propriedades físico-químicas e funcionais da hemocianina do molusco Ampullaria canaliculata.

## 2 . M A T E R I A L E M É T O D O S

### 2.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Gastropodos aquáticos, Ampullaria canaliculata (Lamarck, 1801), foram capturados na região de Miranda, no Pantanal Mato Grossense, MS. No laboratório, os animais adultos foram cuidadosamente lavados e mantidos em aquários com água destilada sob borbulhamento constante de ar. Após permanecerem três dias em jejum, a fim de evitar contaminação de hemolinfa por líquidos do trato digestivo, os animais foram sacrificados para retirada da hemolinfa através de um corte na região do manto; os moluscos foram colocados em um funil e a hemolinfa coletada dentro de uma proveta. Cada animal forneceu em média 8 a 10 ml de hemolinfa, contendo 12.5 mg de proteínas/ml. A hemolinfa foi clarificada por centrifugação a 5 800g por 30 minutos a 4 graus centígrados, utilizando centrífuga International Modelo IEC B-20A.

### 2.2. DETERMINAÇÃO DO PH DA HEMOLINFA.

A medida do valor de pH da hemolinfa foi realizada logo após a obtenção da hemolinfa, tomando-se o cuidado para que a solução ficasse o menor tempo possível em contato com o ar atmosférico para evitar a retenção de CO<sub>2</sub>. Um total de 30 amostras foram analisadas individualmente utilizando-se um pHmetro Expandomatic.

### 2.3. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS.

A concentração de proteína foi determinada utilizando-se coeficiente de extinção E (1%, 1cm) = 13.87 (Airoldi, 1983).

278

### 2.4. OBTENÇÃO DE HEMOLINFA DESIONIZADA.

A hemolinfa total foi inicialmente passada através de coluna de Sephadex G-25 (2.0 x 50 cm) equilibrada com tampão Tris-HCl 0.05 M pH 8.2 para remover os íons e, em seguida, passada através de uma coluna de Sephadex G-100 (2.0 x 50 cm) equilibrada com o mesmo tampão para remoção de proteínas apresentando peso molecular menores do que a hemocianina e, finalmente por uma coluna de Sephacryl S-400 (2.0 x 20 cm). Para desionização da hemocianina não foi utilizada solução contendo EDTA (ácido etilenodiaminotetracético).

### 2.5. PURIFICAÇÃO DA HEMOCIANINA.

A purificação da hemocianina de A. canaliculata foi realizada segundo método descrito por Heirwegh et alii, (1961) com algumas modificações realizadas por Airoldi, (1983). Todas as etapas foram realizadas a 4 graus centígrados.

A hemolinfa desionizada foi diluída com a adição de igual volume de tampão acetato de potássio 0.4 M, pH 5.3. A solução resultante foi levada a 50% de saturação com sulfato de amônio, pela adição de solução saturada desse sal, nesse mesmo



tampão, e centrifugada a 5 800 g por 20 minutos. O precipitado azul foi dissolvido em tampão acetato de potássio 0.1 M pH 5.7 e dialisado exaustivamente contra o mesmo tampão para remoção do sulfato de amônio. O dialisado foi submetido a centrifugação a 78 400 g por 6 horas em uma ultracentrífuga Beckman L5-65. O sedimento foi redissolvido em tampão Tris-HCl 0.05 M pH 7.8, contendo  $\text{Ca}^{2+}$  20 mM, e utilizado para obtenção de soro anti-hemocianina.

## 2.6. DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR E EFEITO DOS ÍONS $\text{Ca}^{2+}$ E EDTA SOBRE A DISSOCIAÇÃO DA HEMOCIANINA.

A determinação do peso molecular foi realizada por cromatografia de exclusão molecular utilizando coluna de Sephacryl S-400 HR (2.0 x 93 cm) da Pharmacia, equilibrada com tampão Tris-HCl 0.05 M pH 8.2, em presença ou ausência de  $\text{Ca}^{2+}$  20 mM ou  $\text{Mg}^{2+}$  20 mM. O volume útil do gel foi de 292 ml. Em cada experimento foram aplicados 5 ml de hemolinfa desionizada contendo 12.5 mg de proteína/ml, previamente dialisada contra o tampão de equilíbrio do gel. O eluato foi coletado no coletor de frações Buchler e as leituras da absorbância foram realizadas em um comprimento de onda de 278 nm, utilizando cubeta de quartzo de 1.0 cm de caminho ótico. A coluna foi previamente calibrada com Azul de Dextran (2000 da Pharmacia), IgM humano (750 000 Da), Catalase (232 000 Da) e IgG humano (150 000 Da). Conhecidos os parâmetros  $V_0$ ,  $V_t$  e  $V_e$ , foram determinados os valores de  $K_{av}$

segundo Laurent & Killander, (1964), utilizando-se a expressão:

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

Onde:  $K_{av}$  = coeficiente de partição entre fase líquida e o gel.

$V_o$  = volume total eluído com uma substância que é completamente excluída do gel.

$V_e$  = volume de eluição de cada uma das frações cujos valores estão compreendidos entre  $V_o$  e  $V_t$

$V_t$  = volume total do leito de gel.

## 2.7. PROPRIEDADE DE LIGAÇÃO DO LIGANTE OXIGENIO MOLECULAR

As propriedades de ligação da hemocianina com oxigênio molecular foram determinadas espectrofotometricamente segundo método descrito por Rossi-Fanelli & Antonini, (1958). Todos os experimentos de equilíbrio da hemocianina com  $O_2$  foram feitos a 25 graus centígrados  $\pm 0.5$ , utilizando uma concentração de proteína que variava de 0.8 - 1.0 mg/ml, e em tampão Tris-HCl 0.05 M pH entre 7.0 e 9.0. Esse método baseia-se no princípio de que o  $O_2$  se liga ao  $Cu^{1+}$  na proporção de 2:1. As propriedades espectrais da hemocianina são diferentes quando o cobre está livre, parcialmente oxigenado ou completamente saturado com  $O_2$ . As curvas de ligação do  $O_2$  foram determinadas com um tonômetro que consistia de um tubo de Thunberg modificado, contendo uma cubeta Pyrex de caminho óptico de 1 cm soldada na extremidade do tubo.

O equilíbrio com  $O_2$  foi determinado em hemolinfa total, em hemocianina purificada em presença de  $Ca^{2+}$  20 mM,  $Mg^{2+}$  20mM ou EDTA 10 mM. Os valores do pH foram medidos antes e imediatamente após a determinação da curva de oxigenação. O espectro foi traçado em um registrador XY Hewlett-Packard modelo 7044A acoplado a um espectrofotômetro digital Varian modelo 634. O oxigênio molecular foi removido da oxihemocianina por arraste com nitrogênio gasoso, purificado através de borbulhamento em uma solução alcalina de ditionito de sódio para assegurar total ausência de  $O_2$ . A desoxihemocianina foi evidenciada pelo desaparecimento do pico de absorção característico em 344 nm. As adições de quantidades conhecidas de  $O_2$  foram efetuadas utilizando-se seringa calibrada. Após a adição do ar, o tonômetro foi incubado por 10 minutos a 25 graus centígrados sob constante agitação e novo espectro foi obtido e assim sucessivamente, até a saturação completa da amostra, quando a absorbância em 344 nm foi igual à absorbância inicial obtida para a oxihemocianina.

As curvas de saturação com  $O_2$  foram representadas graficamente de acordo com a equação de Hill (Wyman, 1948 e 1964):

$$K(P) = \frac{Y^n}{1 - Y}$$

Onde: K = constante de equilíbrio

P = pressão parcial de  $O_2$

Y = saturação parcial da hemocianina pelo  $O_2$

n = constante de interação empírica de Hill.

O gráfico  $\log (Y/1-Y)$  em função de  $\log PO_2$  apresenta-se em geral sigmoidal, e a tangente da reta a 50% de saturação corresponde ao coeficiente de Hill ( $n_H$ ), que indica a cooperatividade da hemocianina nas condições de cada equilíbrio. O valor de  $P_{50}$ , ou seja, da pressão parcial de  $O_2$  necessária para se atingir 50% de saturação da hemocianina foi determinado pela intersecção da melhor reta obtida por regressão linear com o eixo das abcissas, e representa a afinidade da hemocianina pelo ligante.

## 2.8. PREPARO DE INUNÓGENO.

O adjuvante foi preparado segundo Freund, (1956). Em um almofariz foram emulsificados 15 g de lanolina em 85 ml de nujol. A emulsão foi distribuída em ampolas e esterilizada em autoclave.

O antígeno utilizado para imunização foi a hemocianina purificada de A. canaliculata emulsificada em adjuvante incompleto de Freund, na proporção de 1 volume de antígeno para 1 volume de adjuvante.

## 2.9. OBTENÇÃO DE SORO DE COELHO ANTI-HEMOCIANINA DE A. canaliculata

Os coelhos foram inoculados com hemocianina de A. canaliculata emulsificada em adjuvante incompleto de Freund na concentração de 5 mg de proteína/ml; nas doses de reforço foi utilizada a hemocianina diluída em salina fisiológica na

concentração de 1.0 mg de proteína/mg. O esquema de imunização empregado foi:

1 - inoculação - antígeno emulsificado em adjuvante incompleto de Freund ( 5 mg/ml), injetado em 4 locais (0.1 ml/local), junto à inserção muscular próxima às patas.

2 - inoculação - foi realizada 21 dias após a primeira inoculação, com antígeno diluído em salina fisiológica (0.5 mg/ml) injetado intradermicamente em quatro locais no dorso do animal (100 ug de proteína/local). Após a segunda inoculação ocorreu a reação inflamatória do tipo Arthus e "ring-test" positivo e as sangrias foram realizadas por punção cardíaca. O sangue foi deixado a temperatura ambiente para retração do coágulo e o soro foi submetido a centrifugação a 4 000 g por 30 minutos e mantidos a -20 graus centígrados.

## 2.10 ANÁLISE IMUNOELETRÓFORÉTICA.

A imunoelektroforese foi realizada segundo método descrito por Grabar & Willians, (1953), utilizando-se placas de vidro (8.0 x 12 cm), contendo uma camada de 3 mm de ágar a 1% em tampão veronal 0.05 M pH 8.2. Nos orifícios foram aplicados os antígenos e a eletroforese foi desenvolvida durante 2 horas, aplicando um gradiente de potencial de 200 volts e intensidade de corrente de 30 mA. Após decorrido o tempo, foram abertas as canaletas onde foram aplicadas os antisoros. As lâminas de ágar foram deixadas á temperatura ambiente por 12 horas e depois a 4 graus centígrados por 24 horas. Após este período, as lâminas

foram lavadas com NaCl 0.15M, secadas e coradas com negro de anido.

### 3. R E S U L T A D O S

#### 3.1. PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO MATERIAL BIOLÓGICO

Os valores de pH da hemolinfa recém coletada de 30 espécimes de A. canaliculata, mostraram ser razoavelmente constantes, apresentando valores que variaram entre 8.1 e 8.3, sugerindo que o valor do pH fisiológico da hemolinfa está em torno de pH 8.2.

Apesar da hemolinfa ser constituída de 90 a 98% de hemocianina, outras glicoproteínas e lipoproteínas podem estar presentes. Desta forma, a hemolinfa de A. canaliculata foi submetida, inicialmente, à cromatografia de exclusão molecular em gel de Sephadex G-25 para remoção de íons, e em seguida em gel de Sephacryl S-400 HR para remoção de moléculas proteicas de peso molecular menores que ao da hemocianina.

Uma parte da hemolinfa foi utilizada para purificação da hemocianina com solução saturada de sulfato de amônio pH 5.3 e submetida à ultracentrifugação. A hemocianina purificada foi tratada com NaCl 1M pH 5.7, condição de dissociação das moléculas nas subunidades do tipo alfa e beta em hemocianina de Helix pomatia (Heirwegh et alii., 1961) e Megalobulimulus ovatus (Airoldi, 1983). Após centrifugação em gradiente de sacarose (10-40% w/v) por 12 horas a 78 400 g foi encontrado somente um

componente sugerindo que a hemocianina de A. canaliculata apresenta apenas moléculas não dissociadas do tipo beta hemocianina. Desde que não se observaram diferentes componentes na hemocianina de Ampullaria canaliculata, a proteína purificada por precipitação com sulfato de amônio foi utilizada apenas para obtenção de antisoro específico para hemocianina. Para estudos funcionais e determinação de peso molecular, foram utilizadas hemocianina sedimentada por ultracentrifugação a 78 400 g e desionizada através de filtração em gel Sephadex G-25, G-100 e Sephacryl S-400, sem posterior purificação, uma vez que quase toda proteína presente na hemolinfa é constituída de hemocianina (90 - 98%).

### 3.2. ESPECTRO DE ABSORÇÃO.

A hemocianina de A. canaliculata apresenta espectro de absorção similar àqueles observados para hemocianinas de outras espécies de moluscos e artrópodos (FIG.1). Sob a forma desoxigenada, o cobre está no seu estado de oxidação (+1); quando o O<sub>2</sub> se liga à molécula protéica, surge a coloração azul que reflete uma mudança no estado de oxidação do cobre, apresentando um pico de absorção em 340 nm.



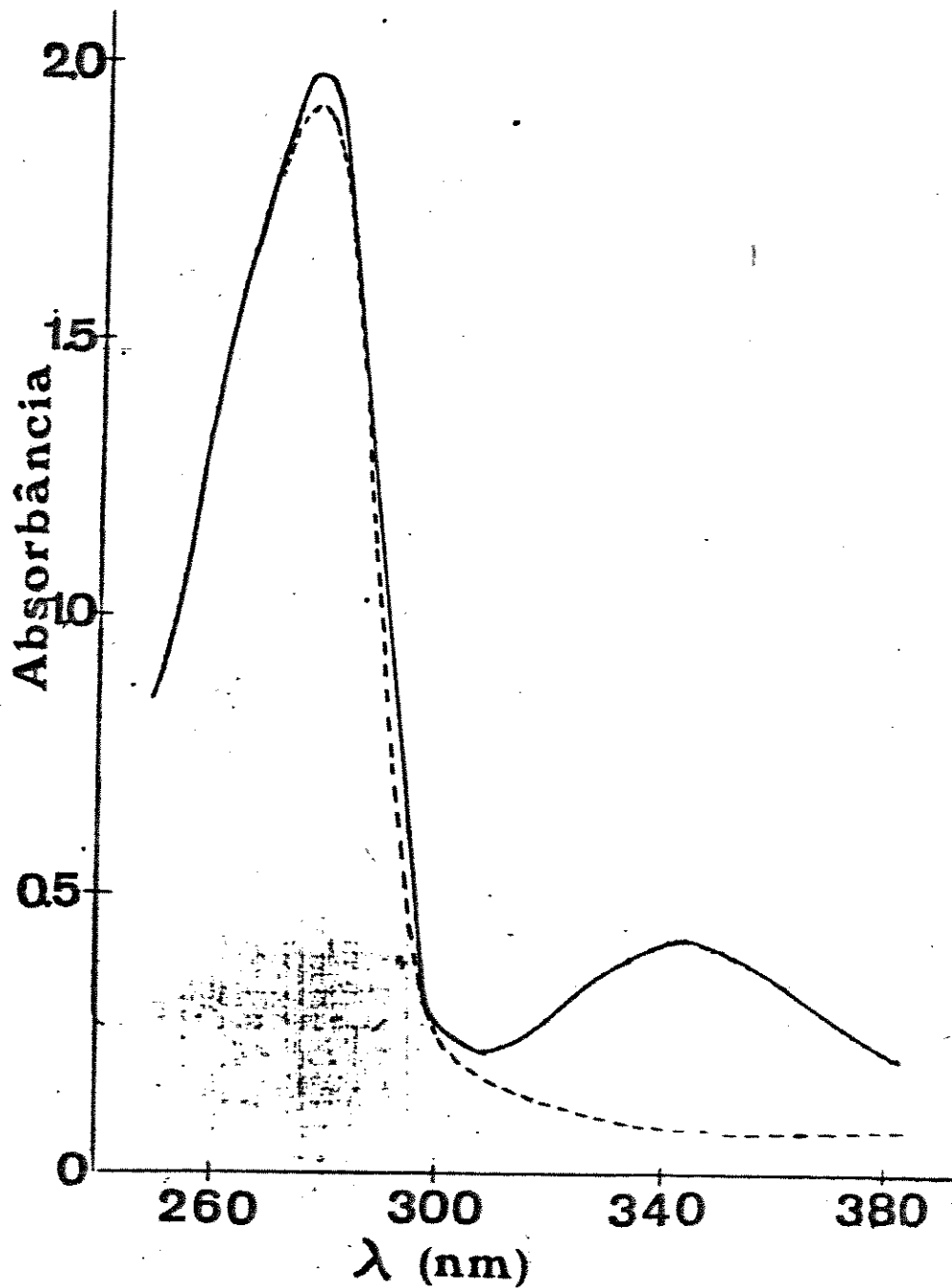


FIG. 1 - MUDANÇA ESPECTRAL ASSOCIADA COM A LIGAÇÃO DE O<sub>2</sub> A MOLECULA DE HEMOCIANINA DE A. canaliculata:

( - - - ) Hemocianina desoxigenada.

( ——— ) Hemocianina oxigenada.

### 3.3 DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR DOS ESTADOS DE AGREGAÇÃO DA HEMOCIANINA DE Ampullaria canaliculata.

Experimentos preliminares com hemocianina de Ampullaria canaliculata revelaram que as interações das subunidades desta hipermolécula são similares aos padrões observados para as outras hemocianinas de moluscos; agregação e dissociação podem ser afetadas pelos íons componentes da solução, mas são independentes da concentração da proteína. Estas observações sugerem que as várias formas de agregados podem ser facilmente separadas umas das outras. A FIG. 2 mostra os resultados de tais experimentos utilizando técnicas de filtração em gel. A hemolinfa total quando aplicada na coluna de Sephacryl S-400 HR, equilibrada com tampão Tris-HCl 0.05 M pH 8.2, resultou em um único pico de peso molecular  $7.5 \times 10^6$  Da. A presença de cátions divalentes  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  não afetou o estado de agregação, permitindo concluir que, uma vez que os íons divalentes têm a habilidade de manter a molécula no estado nativo, o peso molecular da molécula nativa deve ser da ordem de  $7.5 \times 10^6$  Da. A remoção de íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  da solução de hemocianina através de diálise exaustiva contra tampão livre de cátions divalentes, apresentou parte das moléculas nativas de P.M.  $7.5 \times 10^6$  Da e a formação de espécies dissociadas com moléculas de P.M.  $1.0 \times 10^6$  Da e de P.M.  $3.2 \times 10^5$  Da, referidas como moléculas 1/10 e 1/20, sendo que a molécula 1/20 pode ser considerada subunidade mínima da molécula

de hemocianina em estudo. Os valores de  $K_{av}$  e os marcadores utilizados para padronização da coluna são mostrados na FIG. 3.

$A_{280\text{nm}}$

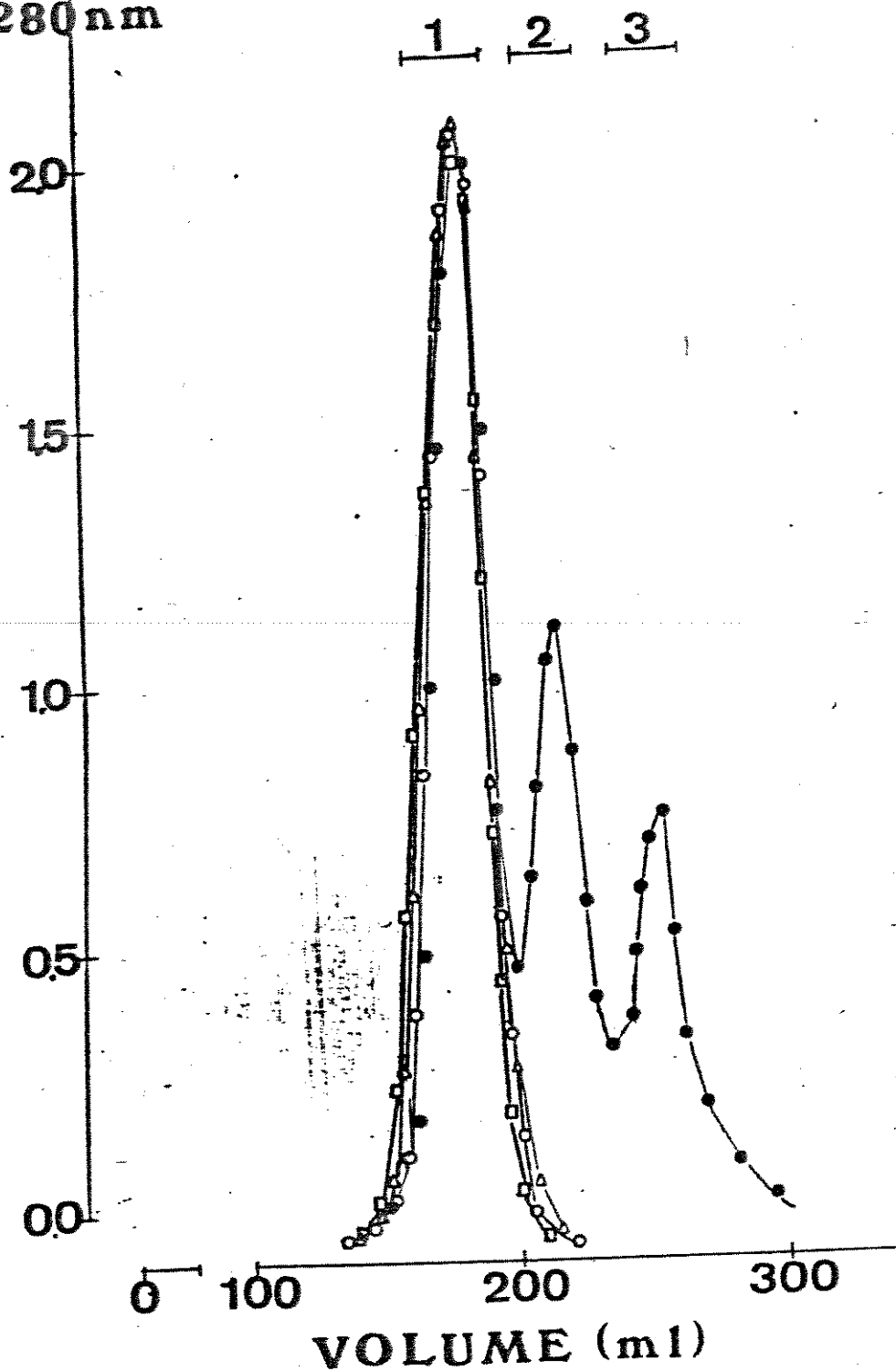


FIG. 2. -FILTRAÇÃO EM GEL DE SEPHACRYL S-400, EQUILIBRADA COM TAMPAO TRIS-HCl 0.05 M pH 8.2:

Hemolinfã total (O);

Hemocianina em presença de Ca<sup>2+</sup> 20 mM (Δ);

Hemocianina em presença de Mg<sup>2+</sup> 20 mM (◻);

Hemocianina desionizada(●).

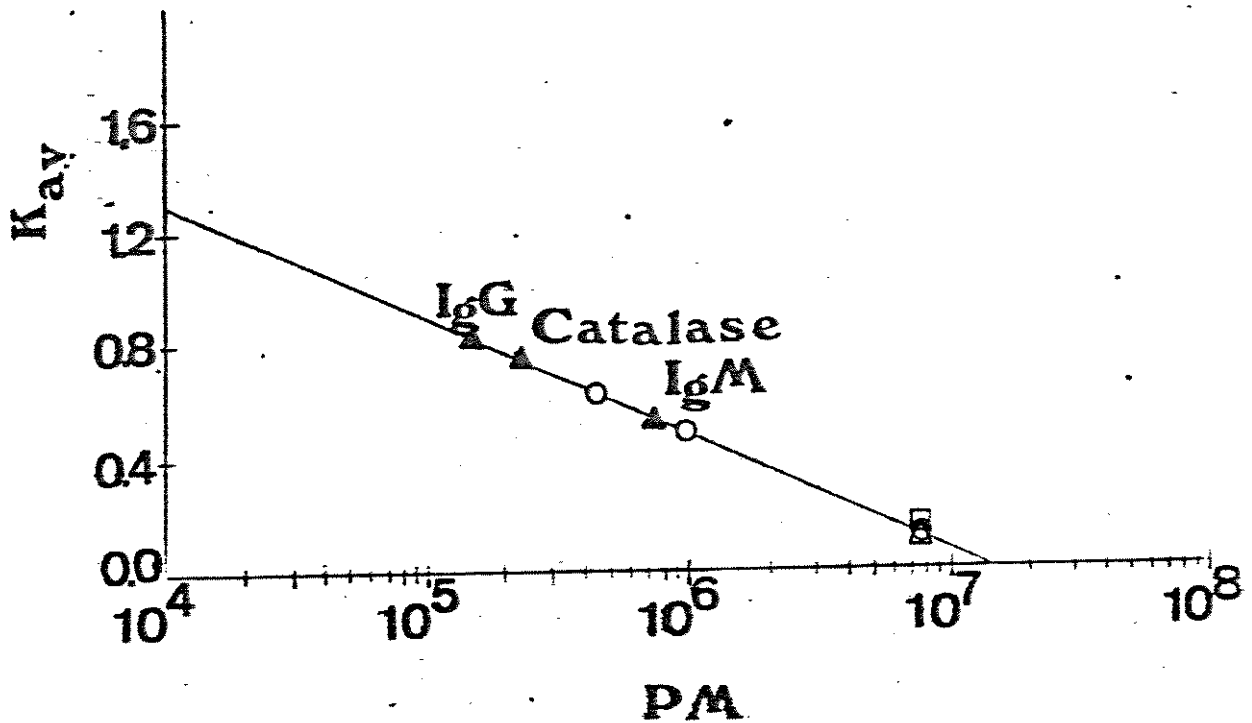


FIG. 3 - VALORES DE  $K_{av}$  DAS HEMOCIANINAS DE A. canaliculata. PADROES UTILIZADOS: IgH humano (P.M. 750 000 Da., CATALASE (P.M. 232 000 Da.) e IgG HUMANO (P.M. 150.000 Da):

Hemolinfa total (●);

Hemocianina em presença de Ca<sup>2+</sup> 20 mM (Δ);

Hemocianina em presença de Mg<sup>2+</sup> 20 mM (□);

Hemocianina desionizada (O).

### 3.4. PRORIEDADES FUNCIONAIS DA HEMOCIANINA

Os estudos da afinidade da hemocianina de Ampullaria canaliculata pelo oxigênio molecular foram realizados pelo método tonométrico, em uma faixa de pH entre 6.0 e 9.0 (Tabela I).

Como mostra a FIG. 4, a curva de saturação da hemocianina pelo oxigênio molecular dependeu da concentração de ions  $H^+$  ( $\Delta \log P_{50} / \Delta pH = -0.30$ ).

O valor do coeficiente de Hill ( $n_H$ ), que indica o grau de interação entre os sítios de ligação, variou de 1.0 a 2.3 no intervalo de pH estudado (6.0 a 9.0), sugerindo a formação de diferentes espécies moleculares pela variação de pH.

Para melhor visualização das propriedades funcionais da hemocianina de A. canaliculata, juntaram-se todos os dados funcionais em um gráfico (Fig. 4). Através da figura pode-se verificar que a ligação da molécula protéica com  $O_2$  foi dependente de pH, apresentando um valor de efeito Bohr de aproximadamente  $-0.30$ , nos intervalos de pH estudados (6.0 a 9.0), tanto na hemocianina total quanto na hemocianina em presença de cátions divalentes; a molécula em presença de  $Ca^{2+}$  e  $Mg^{2+}$  apresentou maior afinidade pelo  $O_2$  em todos os valores de pH estudados; o valor do coeficiente de Hill variou de 1.5 a 2.0 sugerindo a formação de espécies moleculares heterogêneas com a variação da concentração de ions  $H^+$ .

O quelante EDTA na concentração de 10 mM dissociou totalmente a molécula protéica, tornando-a não alostérica, ou

seja, não apresentando efeito Bohr e nem cooperatividade de ligação com  $O_2$ .

TABELA I

Dados de equilíbrio de O<sub>2</sub> da hemocianina de *A. canaliculata*.

pH	Cátions Divalentes	P <sub>50</sub> (mm Hg) <sub>1</sub>	n <sub>H</sub>
6.5	*total	6.31	1.8
6.8	total	6.03	1.9
7.3	total	5.62	2.1
7.5	total	5.25	2.2
7.7	total	4.47	2.2
8.0	total	3.86	2.3
8.4	total	2.82	2.3
8.7	total	2.10	2.3
9.0	total	1.70	2.3
6.4	Ca <sup>2+</sup> (20 mM)	4.80	1.6
6.7	Ca <sup>2+</sup> (20 mM)	5.17	1.6
6.9	Ca <sup>2+</sup> (20 mM)	5.00	1.6
7.2	Ca <sup>2+</sup> (20 mM)	4.02	1.8
7.4	Ca <sup>2+</sup> (20 mM)	3.40	2.0
7.7	Ca <sup>2+</sup> (20 mM)	2.60	2.0
8.0	Ca <sup>2+</sup> (20 mM)	2.31	2.0
8.2	Ca <sup>2+</sup> (20 mM)	2.00	2.0
8.4	Ca <sup>2+</sup> (20 mM)	1.50	2.0
8.6	Ca <sup>2+</sup> (20 mM)	1.30	2.0
6.5	Mg <sup>2+</sup> (20 mM)	4.00	1.5
6.7	Mg <sup>2+</sup> (20 mM)	4.20	1.6
7.1	Mg <sup>2+</sup> (20 mM)	3.63	1.8
7.4	Mg <sup>2+</sup> (20 mM)	3.20	1.8
7.7	Mg <sup>2+</sup> (20 mM)	2.50	1.8
8.0	Mg <sup>2+</sup> (20 mM)	2.24	1.9
8.3	Mg <sup>2+</sup> (20 mM)	1.66	2.0
8.5	Mg <sup>2+</sup> (20 mM)	1.40	2.0

\*Total significa Hemolinfa total recém coletada.



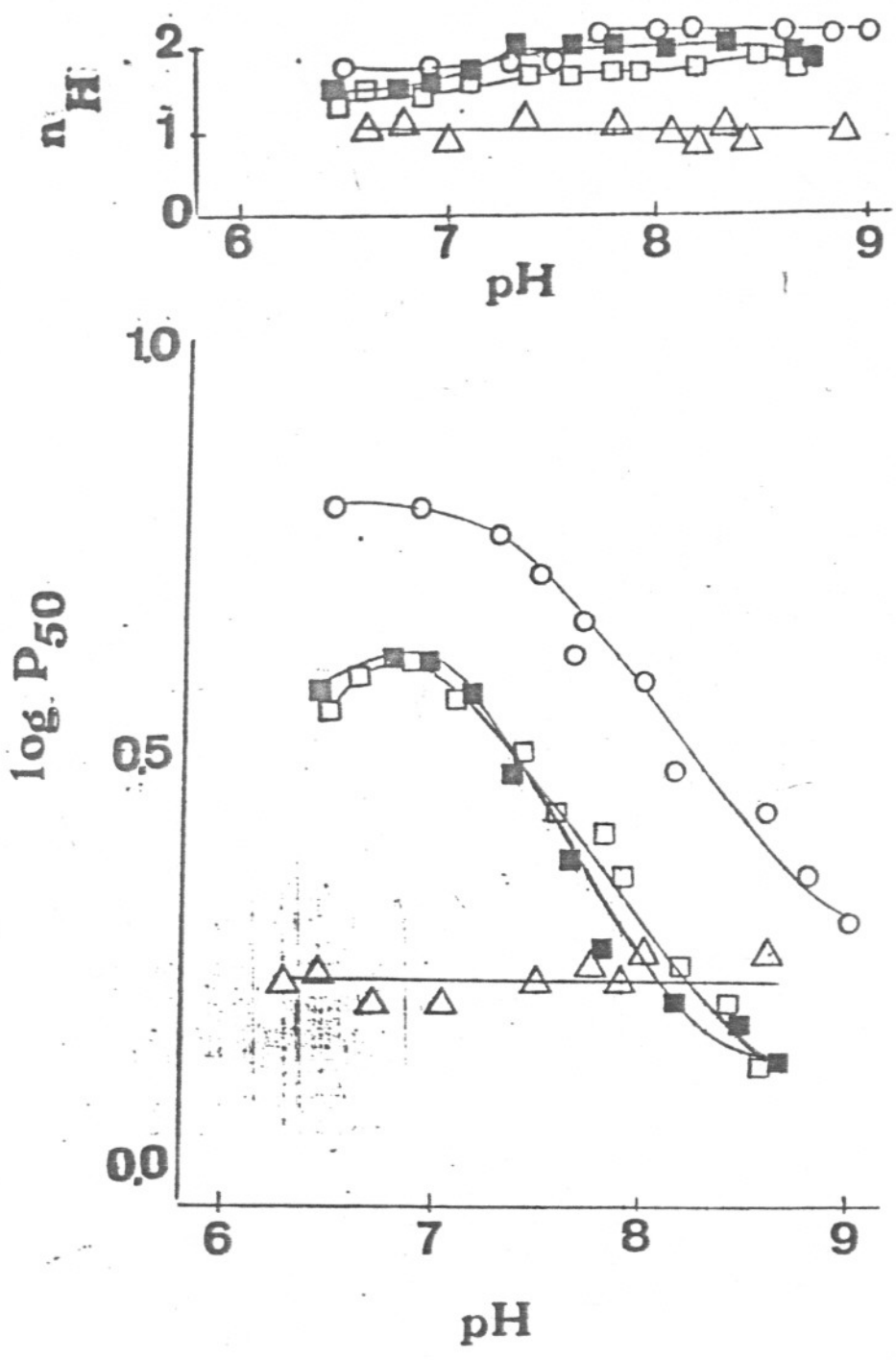


FIG. 4 - VARIAÇÃO DO COEFICIENTE DE HILL ( $n_H$ ) E PRESSÃO PARCIAL DE  $O_2$  NECESSÁRIA PARA SATURAR 50% DA MOLECULA DE HEMOCIANINA EM FUNÇÃO DO pH:

- Hemolinf total (O);
- Hemocianina em presença de  $Ca^{2+}$  20 mM (■)
- Hemocianina em presença de  $Mg^{2+}$  20 mM (□)
- Hemocianina em presença de EDTA 10 mM (△)

### 3.5. ESTADO DE DISSOCIAÇÃO DA HEMOCIANINA DE A. canaliculata.

O estado de dissociação da hemocianina foi determinado por filtração em gel de Sephacryl S-400 HR, equilibrado com tampão Tris-HCl 0.05 M pH 8.2 preparado com H<sub>2</sub>O milli-Q. Nestas condições, foram obtidos três picos de eluição de P.M.  $7.5 \times 10^6$  Da,  $1.0 \times 10^6$  Da e  $3.2 \times 10^5$  Da, correspondendo a subunidade 1/1, 1/10 e 1/20. A análise imunoeletroforética das frações eluídas da coluna é mostrada na FIG. 5. Os picos 1, 2 e 3 (orifícios 2, 3 e 4), apresentaram diferentes mobilidades eletroforéticas, sendo que a proteína de peso molecular mais elevado permaneceu mais próxima do orifício de aplicação. Além disso, podemos verificar aparecimento de novos arcos de precipitação à medida que ocorre a dissociação da molécula.

A hemocianina total (orifício 1) mostrou ser bastante homogênea nas condições que se desenvolveu a eletroforese, porém é possível observar pelo menos três arcos de precipitação, o que vem corroborar os resultados de filtração em gel, onde foram obtidos 3 picos de diferentes peso molecular. Por outro lado, a hemocianina desionizada e colocada em presença de EDTA 10 mM, (orifício 5), mostra a formação de várias espécies moleculares, apresentando identidade parcial entre as subunidades formadas.

### 3.6. EFEITO DE EDTA E DOS CÁTIONS DIVALENTES SOBRE O ESTADO DE AGREGAÇÃO DE HEMOCIANINA DE A. canaliculata.

Com o objetivo de verificar o efeito de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  sobre a hemocianina de A. canaliculata e, principalmente, a reversibilidade da dissociação ocasionada pelo EDTA, realizou-se o estudo de análise imunoeletroforética. Como mostrado na FIG. 6, a hemocianina desionizada mostrou maior heterogeneidade (orifício 4) nas condições de corrida do gel, ou seja, tampão veronal 0.05 M pH 8.2 em relação às moléculas contendo  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  20 mM (orifícios 3 e 5, respectivamente). Os ions  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  parecem dar maior estabilidade à molécula, fornecendo agregados maiores e mais compactos do que a hemocianina desionizada. Com o objetivo de verificar a reversibilidade do estado de agregação das subunidades, tratou-se a hemocianina desionizada com EDTA 10 mM e a seguir realizamos uma diálise exaustiva contra tampão Tris-HCl 0.05 M pH 8.2 para remoção do quelante (orifício 1). No orifício 2, foi colocada a mesma amostra após remoção do EDTA, e incubadas durante 12 horas com  $\text{Ca}^{2+}$  20 mM. O tratamento prévio da proteína com EDTA parece dissociar irreversivelmente a molécula.

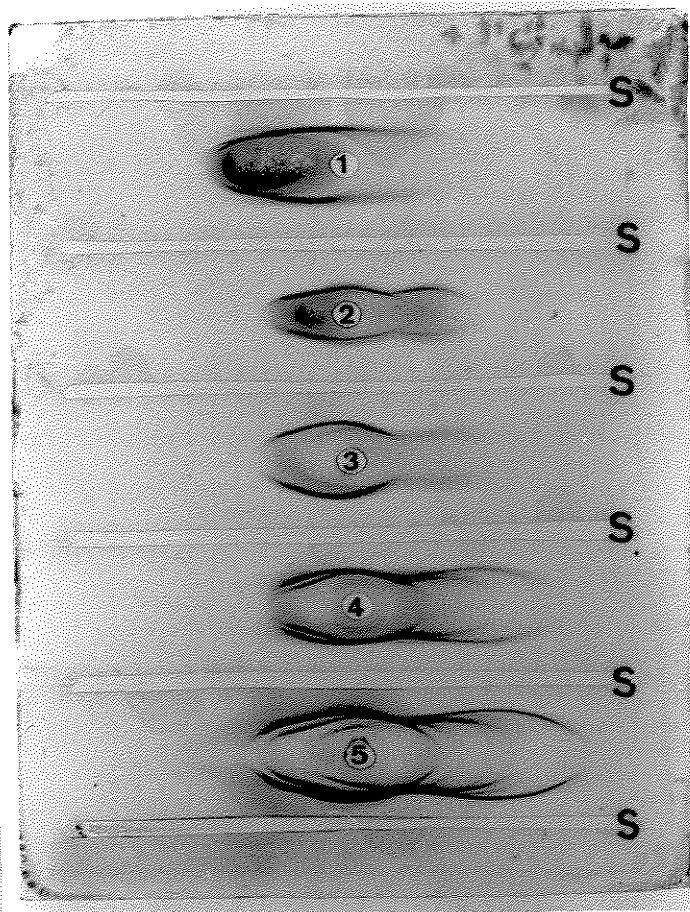
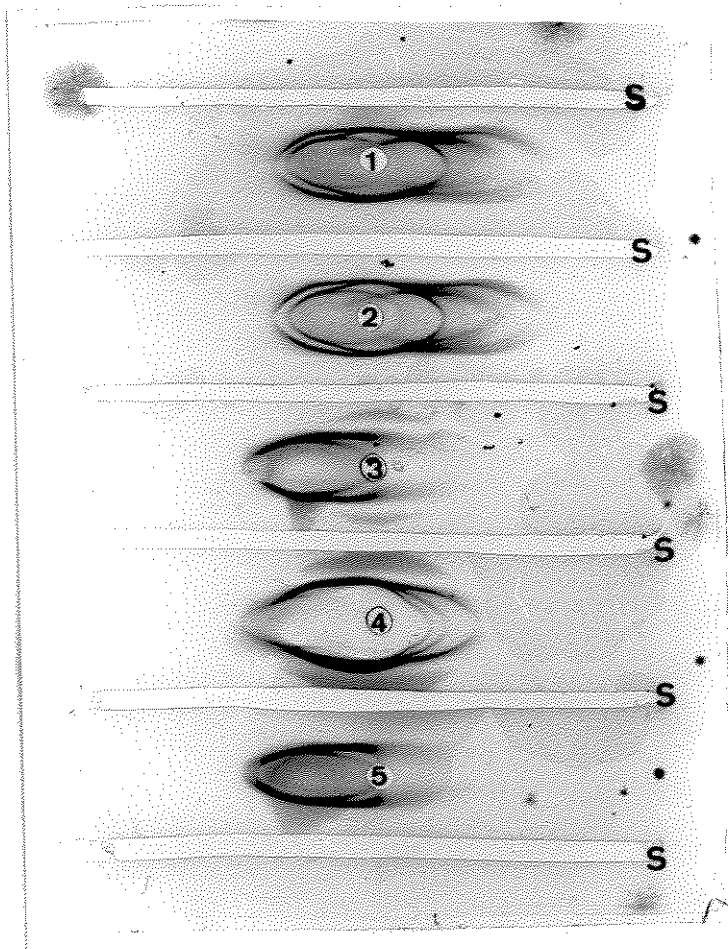


FIG. 5 - ANÁLISE IMUNOELETRÓFORÉTICAS DAS DIFERENTES FRAÇÕES  
 OBTIDAS DA COLUMA DE SEPHACRYL S-400. NAS CANALETAS (S)  
 FOI APLICADO SORO DE COELHO ANTI-HEMOCIANINA DE  
A.canaliculata. ORIFÍCIOS:

Hemocianina total (1);  
 pico 1 obtido do Sephacryl S-400 (2);  
 pico 2 obtido do Sephacryl S-400 (3);  
 pico 3 obtido do Sephacryl S-400 (4);  
 Hemocianina em presença do EDTA 10 mM (5).



IG. 6 - ANÁLISE IMUNOELETROFORETICA DA HEMOCIANINA DE A. canaliculata EM PRESENÇA DE CATIONES DIVALENTES E EDTA. NAS CANALETAS (S) FORAM COLOCADAS SORO DE COELHO ANTI-HEMOCIANINA DE A. canaliculata. Orifícios:

- (1) Hemocianina tratada com EDTA 10 mM e posteriormente dialisada contra tampão Tris-HCl 0.05 M pH 8.2;
- (2) Hemocianina com EDTA 10 mM, dialisada contra tampão e posterior incubação com Ca<sup>2+</sup> 20 mM;
- (3) Hemocianina em presença de Ca<sup>2+</sup> 20 mM;
- (4) Hemocianina desionizada;
- (5) Hemocianina em presença de Mg<sup>2+</sup> 20mM.

#### 4. D I S C U S S Ã O

Embora a hemocianina de Ampullaria canaliculata tenha mostrado grande similaridade com as hemocianinas de moluscos terrestres e marinhos, especialmente com relação ao peso molecular e aos tipos de produtos de dissociação, importante diferença pode ser observada em condições de alta força iônica no que diz respeito ao número de componentes. As hemocianinas de alguns gastrópodos quando colocada em tampão acetato 0.1 M pH 5.7 contendo NaCl 1 M, apresentam cerca de 70% das moléculas dissociadas em moléculas com a metade do tamanho original (moléculas do tipo 1/2). Esse fenômeno de dissociação das moléculas em condições de alta força iônica, tem sido observado em hemocianinas de Helix pomatia (Heirwegh et alii., 1961), e de Megalobulimus ovatus (Airoldi, 1983), onde 70 a 75% das moléculas sofrem dissociação; as hemocianinas de Helix hortensis, Strophocheilus terrestres e Helix aspersa (van Holde & van Bruggen, 1971) apresentam apenas 25 a 30% de moléculas dissociadas; existe também um caso extremo como o da hemocianina de Helix arbustorum (Konings et alii., 1969), que apresenta 100% de dissociação. Desta forma, denominou-se alfa-hemocianina à proteína que se dissocia em condições de alta força iônica e de beta-hemocianina àquela que permanece não dissociada. Os gastrópodos marinhos e de água doce parecem possuir apenas

moléculas do tipo beta, enquanto que os terrestres parecem possuir os dois tipos de espécies moleculares, embora a Helix arbustorum apresente 100% de moléculas tipo alfa-hemocianina. Com a hemocianina de A. canaliculata o aumento da força iônica até 1.5 M não promoveu a dissociação da molécula em dois componentes, obtendo-se apenas um tipo de molécula por ultracentrifugação em gradiente de sacarose. Interessante observar que Hoebeke & Elliot, (1971) estudando a hemocianina de Pila leopoldvillensis, gastrópodo anfíbio, e Hall et alii., (1975) a hemocianina de Lymaea stagnalis, molusco terrestre, obtiveram, também, apenas um componente, de maneira que, acredita-se que parece não existir razão plausível para que as propriedades de dissociação de hemocianina de H. pomatia e M. ovatus serem exatamente iguais para todas as hemocianinas de moluscos. A hemocianina do molusco Pila leopoldvillensis que apresenta apenas um componente (Konings et alii., 1969; Elliot et alii., 1972), dissocia reversivelmente em moléculas 1/2 em valores de pH entre 5.8 a 7.8, e acima de pH 7.5 ocorre a formação de moléculas 1/10. Wood, (1973), demonstrou que a dissociação das hemocianinas de gastrópodos Euccinum undatum, Neptunea antiqua e Colus gracilis induzidas pelo pH é parcialmente reversível e depende da presença de cátions divalentes de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ .

Intúmeros dados sobre o peso molecular da molécula 100 S, da cadeia polipeptídica, e subunidade mínima funcional das hemocianinas de gastrópodos tem sido acumulados. O peso molecular da molécula nativa (100 S) tem sido determinado para Archachatina

margata,  $9.08 \times 10^6$  (Wood et alii., 1971); Busycon canaliculatum  
 $8.8 \times 10^6$  (Quitter et alii., 1978); Helix pomatia,  $8.95 \times 10^6$   
(Pilz et alii., 1974), Levantina hierosolima,  $7.55 \times 10^6$  Da e  $3.72 \times 10^5$   
para a cadeia polipeptídica, (Herskovits and Russel, 1984).

A determinação do peso molecular da hemocianina de A. canaliculata, determinado por cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephacryl S-400 mostrou somente um pico de eluição, tanto na hemolinfa total quanto na hemocianina em presença de  $Ca^{2+}$  e  $Mg^{2+}$  20 mM. Para estimar o peso molecular da hemocianina nativa, foi necessário fazer extrapolação além das proteínas utilizadas como padrão (IgM, P.M. 750 000 ); no entanto, esse método forneceu um peso molecular estimado que pode ser comparado por outros métodos descritos na literatura. Desta forma, o peso molecular da hemocianina de A. canaliculata foi estimado em torno de  $7.5 \times 10^6$  Da.

Hemocianina desionizada de A. canaliculata submetida à filtração em gel resultou na formação de três picos, que através do volume de eluição mostraram ser proteínas de peso molecular  $7.5 \times 10^6$ ,  $1.0 \times 10^6$  e  $3.2 \times 10^5$  Da sugerindo ser espécies moleculares 1/1, 1/10 e 1/20 da molécula nativa. Por outro lado, Ilan et alii., (1986) obtiveram resultados parecidos, ou seja, P.M. de  $3.3 \times 10^5$  para a cadeia polipeptídica de H. pomatia pelo método de equilíbrio de sedimentação, que é um método termodinâmico para determinação de peso molecular absoluto, ou seja, um valor muito próximo ao peso molecular da cadeia



polipeptídica por nós determinado.

A análise do peso molecular da alfa-hemocianina de Helix pomatia (Brouwer & Kuiper, 1973) demonstrou a presença de três espécies moleculares de diferentes pesos moleculares que foram eluídos da coluna de Sepharose 4B. Os estudos de equilíbrio de sedimentação das frações demonstraram a presença de proteínas nativa e espécies moleculares 1/10 e 1/20.

As propriedades funcionais da hemocianina de Ampullaria canaliculata foram estudadas utilizando-se hemolinfa total, hemocianina desionizada, hemocianina em presença de cátions divalentes ( $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  20 mM) e hemocianina em presença de EDTA 10mM (Fig.4). Embora a variação da concentração de íons divalentes não deva ser tão intensa entre gastrópodos, a sua influência não pode ser desprezada. De qualquer forma, os dados da literatura para a hemolinfa de Helix pomatia mostram uma concentração em cátions divalentes em torno de 12 a 20 mM, portanto, supôs-se que trabalhando em concentrações de 20 mM, estar-se-ia dentro das condições de força iônica promovidas pela presença desses cátions divalentes.

Com a hemolinfa total, recém coletada, foram realizadas experiências de equilíbrio com  $\text{O}_2$  diretamente, variando apenas os valores de pH, e obteve-se um valor de  $P_{50} = 3.5$  mm Hg e  $n_H = 2.3$  em pH 8.2. Esse valor de  $P_{50}$  é relativamente próximo ao obtido por Bois D'Enghien et alii., (1971) para hemolinfa de Pila leopoldivillensis, embora o coeficiente de Hill nesse caso tenha sido de 1.2. Assim, ambas apresentam moderada afinidade pelo  $\text{O}_2$ .

nessas condições, o que aliás parece ser propriedade comum às hemocianinas de moluscos prosobrânquios em geral (Mangum, 1980).

A hemocianina de A. canaliculata, em pH 8.2 apresentou valor de  $P_{50} = 2.0$  mm Hg tanto para a molécula em presença de  $Ca^{2+}$  quanto de  $Mg^{2+}$  e o valor de  $n_H$  foram de 2.0. Os dados de afinidade pelo  $O_2$  e os valores de coeficiente de Hill são mostrados na Tabela I. O valor de efeito Bohr, foi de - 0.30, tanto para a hemolinfa total quanto para hemocianina em presença de  $Ca^{2+}$  e  $Mg^{2+}$ , na região fisiológica de pH 7.0 a 9.0. Na Fig. 4, pode-se verificar que na presença de íons de  $Ca^{2+}$  e  $Mg^{2+}$ , a hemocianina apresentou maior afinidade pelo oxigênio do que a hemolinfa total em todos os intervalos de pH estudados, porém o efeito Bohr, bem como o valor de  $n_H$  não foram afetados. Altas concentrações de íons de  $Ca^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$  e  $Mg^{2+}$  aumentam consideravelmente a afinidade das hemocianinas pelo oxigênio. Entretanto, é difícil diferenciar os efeitos não-específicos da mudança de força iônica e efeitos específicos de íons (Harris et alii., 1975). Em geral, baixas concentrações de  $Ca^{2+}$  e  $Mg^{2+}$  resulta em um decréscimo da afinidade da hemocianina pelo  $O_2$  (Redmond, 1955; Er-el et alii., 1972), enquanto a remoção completa destes íons pode resultar numa curva de oxigenação hiperbólica (Chantler et alii., 1973; Konings et alii., 1979c).

Shaklai et alii., (1975) verificaram que a natureza cooperativa da ligação de  $O_2$  pela hemocianina de Levantina hierosolima (Ilan et alii., 1986) pode ser explicada em termos de

energia livre de ligação dos dois ligantes,  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{O}_2$ . A dependência da afinidade pelo  $\text{O}_2$  com a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  tem sido interpretada em termos de dois sítios de ligação para íons  $\text{Ca}^{2+}$ , um promovendo e outro dificultando a ligação da hemocianina com o oxigênio.

As hemocianinas de Artrópodos, que têm sido estudadas por vários pesquisadores (Revisão Ellerton et alii., 1983), retêm alguma cooperatividade na ausência de íons divalentes, exceto a hemocianina de Limulus polyphemus (Sullivan et alii., 1974). Klarman & Daniel, (1980) sugeriram que a perda de cooperatividade, no caso da hemocianina de L. polyphemus seja devido ao tratamento com EDTA que ao remover os cátions divalentes dissociou a molécula em subunidades monoméricas. Os mesmos autores em 1981 compararam a cooperatividade de ligação com  $\text{O}_2$  entre vários Artrópodos e Gastrópodos e sugeriram que nas hemocianinas de moluscos a cooperatividade está condicionada à presença de íons de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ .

Hwang & Fung, (1970) demonstraram que a melhor maneira de retirar cátions da solução de hemocianina é dialisá-la contra tampão livre de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ . Embora a diálise remova os íons fracamente associados à molécula, resulta em alguma perda da cooperatividade. A adição de EDTA à solução promove perda total e irreversível da cooperatividade, demonstrando que mesmo após a diálise alguns cátions divalentes continuam associados à hemocianina. Por outro lado, Truchot, (1975), sugeriu a existência de um fator químico não identificado, que está

normalmente presente na hemolinfa total e pode modificar a afinidade da hemocianina pelo  $O_2$ . Nesse contexto, os efeitos de pH, temperatura,  $Ca^{2+}$  e  $Mg^{2+}$  podem ser quantitativamente descritos como uma expressão empírica de  $P_{50}$ . A existência de tal fator é suportado pelos resultados de Harris et alii., (1975) onde o valor de  $P_{50}$  é baixo na hemocianina de Carcinus mediterraneus dialisada contra tampão contendo  $Ca^{2+}$ , e a afinidade pelo  $O_2$  é restaurada pela reconstituição da hemolinfa pela adição do sobrenadante. Harris et alii (1975) verificaram ainda que o fator não afeta a cooperatividade de ligação com  $O_2$ , e sugerem que o fator é uma molécula pequena de P.M. menor do que 5000 Da, estável e que não está fortemente associada à hemocianina. Para explicar o mecanismo de cooperatividade, Monod et alii., (1965) sugeriram que uma proteína pode existir em dois estados conformacionais em equilíbrio. Existem o estado T, onde predomina a forma não ligada e o estado R, onde predomina a forma ligada, assumindo-se que todos os sítios de ligação são equivalentes. A constante alostérica  $[L] = [T]/[R]$ .  $K_T$  e  $K_R$  são constantes de dissociação para cada sítio no estado T e R, respectivamente. Alguns pesquisadores têm demonstrado que a simples teoria de MWC não consegue descrever satisfatoriamente o comportamento das propriedades alostéricas das hemocianinas (van Driel et alii., 1974; Zolla et alii., 1978; Kuiper et alii., 1980a), e tentaram explicar os seus dados experimentais utilizando o modelo MWC modificado, incluindo as condições em que

$K_R$  é independente de pH e  $K_T$  dependente de pH. Por outro lado, De Phillips & van Holde, (1970) têm relatado que para realizar os estudos das propriedades alostéricas da molécula de hemocianina, deve-se levar em consideração o estado de agregação das subunidades em função da variação de pH, presença de cátions divalentes e porcentagem de oxigenação.

Do exposto, a presença de substancial diversidade de subunidades pode fornecer um excelente modelo para o estudo da correlação estrutura-função, e os comportamentos funcionais dos diferentes tipos de espécies moleculares e a constante de reassociação das subunidades pela desoxigenação, pode levar a uma melhor compreensão dos mecanismos alostéricos que operam nas proteínas oligoméricas em geral.

Uma vez que as hemocianinas são moléculas proteicas multiméricas, faz-se necessário grande cautela na interpretação dos dados experimentais, principalmente, porque os padrões imunoelctroforéticos obtidos podem ser muito complexos devido às diferentes espécies moleculares de diferentes pesos moleculares. A interpretação clara das reações imunológicas da hemocianina com antisoro, requer uma compreensão geral das propriedades físico-químicas das hemocianinas em estudo.

No presente trabalho não tivemos a pretensão de obter informações sobre a microheterogeneidade das subunidades. Os testes sorológicos demonstraram que o soro de coelho anti-hemocianina de A. canaliculata apresenta alta especificidade reconhecendo determinantes antigênicos de superfície ou

conformacionais da molécula agregada, como também os determinantes antigênicos das subunidades (Fig. 5 e 6). Os padrões imunoeletroforéticos obtidos no presente trabalho foram muito similares àqueles obtidos por Masseyeff et alii., (1963) com hemocianina de Cybbium neptuni e por Denucé & Cushing (1963) com uma variedade de hemocianinas. Três ou mais linhas de precipitação foram observadas por imunoeletroforese em pH 8.2. O perfil consiste de linhas interiores pequenas e linhas externas muito mais difusas que se estendem desde o ponto de aplicação do antígeno. É sugestivo que as linhas internas correspondam à reação de precipitação com moléculas inteiras e as linhas difusas externas às reações com moléculas dissociadas 1/10 e 1/20. A demonstração de que a hemocianina de Ampullaria canaliculata dissociada difere imunoquimicamente da molécula associada apresenta um interessante significado prático, e pode ser utilizado para interpretar o grau de dissociação do antígeno a ser testado. Os resultados apresentam evidência adicional de natureza imunoquímica que envolve o mecanismo de reação de associação e dissociação, como também reversibilidade dessa reação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIROLDI, L.P.S., BERIAN, L.O.S. OLIVEIRA, A.R. and GASPAR, J. O. Hemocyanin of the Brazilian snail Megalobulimus ovatus: functional and structural aspects. Life chem. Reports 1: 137-138, 1983.
- ANDREWS, E.B. The functional anatomy of the gut of the prosobranch gastropod Pomacea canaliculata and of some other pilids. Proc. Zool. Soc. (Lond). 145:19-36, 1965a.
- ANDREWS, E.B. The functional anatomy of the mantle cavity, kidney and blood system of some pilid gastropods (Prosobranchia). J. Zool. 146:70-94, 1965b.
- ANTONINI, E. & BRUNORI, M. The equilibrium of hemoglobin and myoglobin with ligands. In: Hemoglobin and myoglobin in their reaction with ligands. Amsterdam, North-Holland, 21:153-186 (North-Holland Research Monographs. Frontiers in Biology. 1971.
- ANTONINI, E. & CHIANCONE, E. Assembly of multisubunit respiratory proteins. Annu. Rev. Biophys. Bioend., 6:239-271, 1977.
- BARTEL, A.H. & CAMPBELL, D.H. Some immunochemical differences between associated and dissociated haemocyanin. Archs. Biochem. Biophys. 82:232-234, 1954.
- BENESCH, R. & BENESCH, R.E. The effect of organic phosphate from human erythrocyte on the allosteric properties of hemoglobin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 26:162-166, 1967.
- BENESCH, R. & BENESCH, R.E. and YU, C.I. Reciprocal binding of oxygen diphosphoglycerate by human hemoglobin. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 59:526-532, 1968a.
- BERGTROM, G. Partial characterization of hemoglobin of the bug Buenoa confusa. Insect Biochem., 7:313-316, 1977.

- BOIS D'ENGLISHEN, A.P., ELLIOT, F.G., BARTELS, W.J. and van BRUGGEN, E.F.J. The haemocyanin of Pila leopoldvillensis. II. Quaternary structure and oxygenation. Comp. Biochem. Physiol., 40B:1045-1055, 1971.
- BONAVENTURA, J. & BONAVENTURA, C. Hemocyanins: Relationships in their structure, function and assembly. Am. Zool., 20:7-17, 1980.
- BONAVENTURA, C. and BONAVENTURA, J. The mollusca, vol.2, Environmental Biochemistry and Physiology, 1983.
- BOYD, W.C. Cross-reactivity of various haemocyanins with special references to the blood protein of the black widow spider. Biol. Bull. 73:181-183, 1937.
- BRAUN, V., CRICHTON, R. and BRAUNITZER, G. Haemoglobine. XV. Über monomere und dimere insektahaemoglobine. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. chem., 349:197-210, 1968.
- BRIEHL, R.W. The relation between the oxygen equilibrium and aggregation of subunits in Lamprey hemoglobin. J. Biol. Chem., 238:2361-2366, 1963.
- BROUWER, M. & KUIPER, H.A. Molecular-weight analysis of Helix pomatia alpha-hemocyanin in guanidine hydrochloride, urea and sodium dodecylsulfate. Eur. J. Biochem., 35:428-435, 1973.
- BROUWER, M., RYAN, M., BONAVENTURA, J. and BONAVENTURA, C. Functional and structural properties of Murex fluvescens hemocyanin; isolation of two different subunits required for reassociation of molluscan hemocyanin. Biochemistry, 17:2810-2815, 1978.
- BROUWER, M., WOLTERS, M. and van BRUGGEN, E.F.J. Proteolytic fragmentation of Helix pomatia alpha hemocyanin : structural domains in the polypeptide chain. Biochemistry, 15:18-23, 1976.
- BROUWER, M., WOLTERS, M. and van BRUGGEN, E.F.J. Proteolytic fragmentation of Helix pomatia alpha-hemocyanin: isolation of a functionally active chemically pure domain and evidence for heterogeneity. Arch. Biochem. Biophys., 193:487-495, 1979.



- CHANTLER, E.N., HARRIS, R.R. and BANNISTER, W.H. Oxygenation and aggregation properties of haemocyanin from Carcinus mediterraneus and Potamon edulis. Comp. Biochem. Physiol., 46A:333-343, 1973.
- DAVID, M.M. & DANIEL, E.J. Subunit structure of earthworm erythrocrucorin. J. Mol. Biol., 87:89-101, 1974.
- De PHILLIPS, H.A. Jr., NICKERSON, K.W. and van HOLDE, K.E. Oxygen binding and subunit equilibrium of Busycon hemocyanin. J. Mol. Biol. 50:471-479, 1970.
- DENUCE, J.N. & CUSHING, J.E. Comparative serology of crustaceans and molluscs of the coast of South California. Protides of the Biological Fluids, 11:146-149, 1963.
- DOYLE, M.L., SPEROS, P.C., LICATA, V.J., GINGRICH, D., HOFFMAN, B.M. and ACKERS, G.K. Linkage between cooperative oxygenation and subunit assembly of cobaltous human hemoglobin. Biochemistry, 30:7263-7271, 1991.
- ELLENBY, C. & SMITH, L. Haemoglobin in Mermis subnigrescens, Enoplus brevis and E. communis. Comp. Biochem. Physiol., 19-871-877, 1966.
- ELLERTON, M.D., ELLERTON, M.F. and ROBINSON, H.A. Hemocyanin - A current perspective. Proc. Biophys. Molec. Biol., 41:143-248, 1983.
- ELLIOT, F.G., WITTERS, R. BORGINON, H. and LONTIE, R. The haemocyanin of Pila leopoldivillensis. III. The dissociation studies by ultracentrifugation. Comparison with alpha-haemocyanin of Helix pomatia. Comp. Biochem. Physiol., 42B:649-657, 1972.
- ER-EL, Z., SHAKLAI, M. and DANIEL, E. Oxygen binding properties of haemocyanin from Levantina hierosolima. J. Mol. Biol., 64:341-352, 1972.
- FREDMAN, T.B., LOEHR, J.S. and LOEHR, T.M. A resonance Raman study of the copper protein, hemocyanin. New evidence for the structure of the oxygen-binding site. J. Am. Chem. Soc., 98:2809-2815, 1976.

FREUND, F. The mode of action of immunologic adjuvants. Adv. Fortschr. Tuberkforsch., 7:130-147, 1956.

FRIEDEN, E., OSAKI, S. and KOBAYASHI, H. cooper proteins and oxygen. Correlations between structure and function of the cooper oxidase. J. Gen. Physiol., 49:213-252, 1965.

FOCESI, Jr., A., OGO, S.H. AND MATSUURA, M.S.A. Dimer-teramer transition in hemoglobin from Liophis miliaris. I. Evidence with stripped proteins. Comp. Biochem. Physiol., 96B:119122, 1990.

FUSHITANI, K., IMAI, K. and RIGGS, A.F. Oxygenation properties of hemoglobin from the earthworm Lumbricus terrestris. J. Biol. Chem., 261:8414-8423, 1986.

FUSHITANI, K., MATSUURA, M.S.A. and RIGGS, A.F. The aminoacid sequence of chains a, b, and c, that form the trimer subunit of the extracellular hemoglobin from Lumbricus terrestris. J. Biol. Chem., 263:6502-6517, 1988.

GARLICK, R.L. & RIGGS, A.F. The amino acid sequence of a major polypeptide chain of earthworm hemoglobin. J. Biol. Chem., 257:9005-9015, 1982.

GIELENS, C., PREAUX, G. and LONTIE, R. Limited trypsinolysis of beta-hemocyanin of Helix pomatia. Eur. J. Biochem. 60:271-280, 1975.

GIELENS, C., VERSCHUEREN, L.J., PREAUX, G., and LOTIE, R. Localization of the domains in the polypeptide chain of beta c hemocyanin of Helix pomatia. In: Invertebrate Oxygen-Binding Proteins. Structure, Active Site and Function. ed. J. Lamy & Lamy, pp.295-303, Dekker, New York, 1981a.

GIELENS, C., VERSCHUEREN, L.J., PREAUX, G., and LONTIE, R. Gel chromatographic separation of haemocyanin of Helix pomatia. Further electrophoretic and immunological characterization of the components. Comp. Biochem. Physiol., 69B455-462, 1981b.

- GRABAR, P. & WILLIAMS, C.A. Jr. Methode permettant l'etude conjugée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un sérum sanguin. Biochim. Biophys. Acta, 10:193-197, 1953.
- HALL, R.L., PEARSON, J.S. and WOOD, E.J. The hemocyanin of Lymnaea stagnalis L. (Gastropoda Pulmonata). Comp. Biochem. Physiol., 52B:211-218, 1975.
- HARRIS, R.R., CHANTLER, E.N. and BANNISTER, W.H. Comp. Biochem. Physiol. 52A:189-191, 1975.
- HEIRWEGH, K. BORGINON, H. and LONTIE, R. Separation and absorption spectra of alpha and beta-hemocyanin of Helix pomatia. Biochim. Biophys. Acta. 48:517-526, 1961.
- HERSKOVITS, T.T. Recent aspects of the subunit organization and dissociation of hemocyanins. Comp. Biochem. Physiol., 91B(4):597-611, 1988.
- HERSKOVITS, T.T., BLAKE, P.A., GONZALEZ, J.A. HAMILTON, M.G. and WALL, J.S. Subunit structure and higher order assembly of the hemocyanins of the Melogonidae family : Melodonta corona (Gmelin), Busycun canaliculatum (Linné), B. Carica (Gmelin), B. contrarium (Conrad), and B. spiratum (Lamarck). Comp. Biochem. Physiol., 94B(2):415-421, 1989.
- HERSKOVITS, T.T., BLAKE, P.A., and HAMILTON, M.G. Subunit dissociation and denaturation of Fascion tulipa hemocyanin. Comp. Biochem. Physiol. 90B(4):869-874, 1988.
- HERSKOVITS, T.T., GUZHAN, A.E. and HAMILTON, M.G. The haemocyanin of the whelk Busycun contrarium (Conrad): aggregation states and subunit structure. Comp. Biochem. Physiol., 92B(1):181-187, 1989.
- HERSKOVITS, T.T., OTERO, R.M. and HAMILTON, M.G. The hemocyanin of the ramshorn snail Marisa cornuarietis (Linné). Comp. Biochem. Physiol., 97B(4):623-629, 1990.
- HOEBEKE, J.J. & ELLIOT, F.G. Dissociation of Pila haemocyanin at low ionic strength. Eur. J. Biochem., 23:171-177, 1971.

- HOGBEN, L.T. & PINHEY, K.F. Some observations on the hemocyanin of Limulus. J. Exp. Biol. (Lond.) 5:55-66, 1927.
- ILAN, E., AVISSAR, I., BANIN, D. and DANIEL, E. Subunit structure of hemocyanin from the gastropod Levantina hierosolima. Biochemistry, 25:4994-4999, 1986.
- IRIE, T. & USUKI, J. Disparity of native oxyhemoglobin components isolated from Paramecium caudatum and P. primaurelia. Comp. Biochem. Physiol. 62B:549-554, 1980.
- KEILIN, D. RYLEY, J.F. Haemoglobin in Protozoa. Nature, 172:451, 1953.
- KILMARTIN, J.V., FOGG, J.H. and PERUTZ, M.F. Role of C-terminal histidine in the alkaline Bohr effect of human hemoglobin. Biochemistry. 19:3189-3193, 1980.
- KLARMAN, A. & DANIEL, E. Oxygen binding properties of stripped (calcium ion and magnesium ion free) hemocyanin from the scorpion Leirus quinquestriatus. Biochemistry, 19:5176-5180, 1980.
- KLARMAN, A., SHAKLAI, N. and DANIEL, E. The binding of calcium ions to the hemocyanin from Levantina hierosolima at physiological pH. Biochem. Biophys. Acta, 257:150-157, 1972.
- KLARMAN, A., SHAKLAI, N. and DANIEL, E. Oxygen binding by hemocyanin from Levantina hierosolima. I. Exclusion of subunit interactions as a basis for cooperativity. Biochemistry, 14:102-104, 1975.
- KLARMAN, A., SHAKLAI, N. and DANIEL, E. Tyrosyl fluorescence in hemocyanin from the scorpion Leirus quinquestriatus. Biochim. Biophys. Acta, 490:322-330, 1977.
- KONINGS, W.N., SEIZEN, R.J. and GRUBER, M. Structure and properties of hemocyanins. VI. Association-dissociation behavior of Helix pomatia hemocyanin. Biochim. Biophys. Acta. 194:376-385, 1969.

- KONINGS, W.N., van DRIEL, R., van BRUGGEN, E.F.J. and GRUBER, M. Structure and properties of hemocyanins. V. Binding of oxygen and cooper in Helix pomatia hemocyanin. Biochim. Biophys. Acta., 194:55-66, 1969.
- LAMY, J., LAMY, J., LECLER, M. COMPING, S., SIZARET, P.-Y. and WEILL, J. Invertebrate Oxygen-Binding Proteins. eds. J. Lamy & J. Lamy, pp.181-195, Marcel Dekker, New York, 1981c.
- LARIMER, J.L. & RIGG, A.F. Properties of hemocyanins - I. The effect of calcium ions on the oxygen equilibrium of crayfish hemocyanin. Comp. Biochem. Physiol. 13:35-46, 1964.
- LAURENT, T.C. & KILLANDER, J.A. Theory of gel filtration and its experimental verification. J. Chromatol., 14:317-330, 1964.
- LEE, D.L & SMITH, M.H. Haemoglobin in parasitic animals. Exp. Parasit., 16:392-424, 1965.
- LINZEN, B., ANGERSEBACH, D., LOEWE, R., MARKL, J. and SCHMID, R. Structure and function of haemocyanin ed. J.V. Bannister, pp.31-36, Springer-Verlag, Heidelberg, 1977.
- LONTIE, R., DELEY, M. ROBBERECHT, H. and WITTERS, R. Isolation of small functional subunits of Helix pomatia hemocyanin after subtilisin treatment. Nature, 242:180-182, 1973.
- LONTIE, R., & WITTERS, R, Hemocyanin. In: Inorganic Biochemistry. ed. G L Eichorn., pp.344-358, Elsevier, Amsterdam, 1973.
- MALLEY, A., SAHA, A. and HALLIDAY, W.J. Immunochemical studies of hemocyanin from the giant keyhole Limpet (Megathura crenulata) and the horseshoe crab (Limulus polyhemus). J. Immunol., 95:141-147, 1965.
- MANGUM, C.P. Primitive respiratory adaptations. In: Adaptation to the marine environment. ed. R.C. Newell, pp.191-278, Butterworth, Lond., 1976.

- MANGUM, C.P. Respiratory function of the hemocyanins. Amer. Zool., 20:19-38, 1980.
- MANGUM C.P. Salt sensitivity of the hemocyanin of euri- and stenohaline squids. Comp. Biochem. Physiol., 99A(1/2):159-161, 1991.
- McCLARY, A. Surface inspiration and ciliary feeding in Pomacea paludosa (Prosobranchia: Mesogastropoda; Ampullariidae) Malacologia, 2:87-104, 1964.
- HELLEMA, J.E. & KLUG, A. Quaternary structure of gastropod haemocyanin. Nature (Lond.), 239:146-450, 1972.
- MONOD, J., WYMAN, J. and CHANGEUX, J. on the nature of allosteric transitions: A plausible models. J. Mol. Biol., 12:88-112, 65.
- MATSUURA, M.S.A., FUSHITANI, K. and RIGGS, A.F. The amino acid sequence of the alpha and beta chains of hemoglobin from snake, Liophis miliaris. J. Biol. Chem., 264(10):5515-5521, 1989.
- MATSUURA, M.S.A., OGO, S.H. and FOCESI, A. Jr. Dimer-tetramer transition in hemoglobins from Liophis miliaris. I. Effect of organic polyphosphates. Comp. Biochem. Physiol., 86A:683-687, 1987.
- PELSENEER, P. Prosobranches aeriens et pulmones branchiferes. Arch. Biol. Paris, 14:351-393, 1895.
- PERUTZ, M.F. Structure and function of haemoglobin. I. A tentative atomica model of horse oxyhaemoglobin. J. Mol. Biol., 13:646-668, 1965.
- PERUTZ, M.F. Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin. Nature, (Lond.), 22:726-739, 1970.

- PERUTZ, M.F., MUIRHEAD, H., COX, J.M., GOAMAN, L.C.G., MATHEWS, F.M., MCGANG, E.L. and WEBB, L.E. Three-dimensional fourier synthesis of horse oxyhaemoglobin at 2.8 Å resolution: (1) X-ray analysis. Nature (Lond.), 219:29-32, 1968.
- PERUTZ, M.F., PUSINELLI, P.D., TENEVCK, L.F., HAMILTON, H.B. Haemoglobin Hiroshima and the Mechanism of alkaline Bohr effect. Nature (Lond.), 232:147-149, 1971.
- PETROVICH, D.P., MORRIS, S. and McMAHON, B.R. Oxygen binding by the hemocyanin of Eusyccon canaliculatum. Comp. Biochem. Physiol., 97B(4):745-750, 1990.
- PHELPS, C.F., ANTONINI, E., BRUNORI, M. and KELLENTT, G. The kinetics of binding of oxygen and carbon monoxide to Gastrophilus haemoglobin. Biochem. J., 129:891-896, 1972.
- PHILLIPS, J.J. The occurrence and distribution of the hemoglobin in the endosymbiotic rhabdocoel Paravortex scrobicularia. Comp. Biochem. Physiol., 61A:679-683, 1978.
- PILZ, I., ENGELBORGH, Y., WITTERS, R. and LOTIE, R. Studies by x-ray small-angle scattering of the quaternary structure in solution of halves and tenths of Helix pomatia haemocyanins and of Sepia officinalis haemocyanins. Eur. J. Biochem., 42:195-202, 1974.
- PRASHAD, B. Anatomy of the common Indian apple-snail, Pila globosa. Mem. Ind. Mus., 8:91-154, 1925.
- PRASHAD, B. Pila (the apple-snail). Indian Zool. Mem., 4:1-83, 1932.
- QUITTER, S., WATT, L.A., CROSBY, C. and ROXBY, R. Molecular weights of aggregation states of Eusyccon hemocyanin. J. Biol. Chem., 253:252-530, 1978.
- REDMOND, J.R. Bohr effect: absence in a molluscan hemocyanin. Science, 139:1294-1295, 1963.
- ROBSON, G.C. Notes on the respiratory mechanism of the Ampullaridae. Proc. Zool. Soc. (Lond.), pp.341-346, 1922.

- ROSSI-FANELLI, A. & ANTONINI, E. Studies on the oxygen and carbon monoxide equilibria of human myoglobin. Arch. Biochem Biophys., 77:428-492, 1958.
- ROSSI-FANELLI, M.R., CHIANCONE, E., VECCHINI, P. and ANTONINI, E. Studies on erithrocruorin. I. Physicochemical properties of earthworm erythrocrorin. Arch. Biochem. Biophys., 141::278-283, 1970.
- SHAKLAI, N. GAFNI, A. and DANIEL, E. Proximity relationships of tryptophanyl residues and oxygen binding site in Levantina hierosolima hemocyanin. A fluorimetric study. Biochemistry, 17:4438-4442, 1978.
- SHAKLAI, N., KLARMAN, A., and DANIEL, E. Oxygen binding by hemocyanin from Levantina hierosolima. II. Interpretation of cooperativity in terms of lingand-lingand linkage. Biochemistry, 14:105-108, 1975.
- SHIBAYAMA, N., IMAI, K., HIRATAH., HIRAIWA, H., MORIMOTO, H., and SAIGO, S. Oxygen equilibrium properties of highly purified human adult hemoglobin cross-linked between 82 beta, and 82 beta residues by bis (3,5-dibromosalicyl) fumarate. Biochemistry, 30:8158-8165, 1991.
- SPEROS, P.C., LICATA, V.J., YONETANI, T. and ACKERS, G.K. Experimental resolution of cooperative free energies for the ten ligation species of Cobalt (II)/Iron(II)-CO hemoglobin. Biochemistry, 30:7254-7262, 1991.
- STEERS, E. Jr., DAVIS, R.H. Purification and characterization of myoglobin from Paramecium tertaurelia. Comp. Biochem. Physiol., 62B:393-402, 1979.
- SULLIVAN, B., BONAVENTURA, J. and BONAVENTURA, C. Functional differences in the multiple hemocyanin of the horseshoe crab Limulus polyphemus, L. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 71:2558-2562, 1974.
- SVEDEBERG, T. & HEDENIUS, A. The sedimentation constants of the respiratory proteins. Biol. Bull., 66:191-223, 1934.



- SUZUKI, T., TAKAGI, T., GOTOH, T. Amino acid sequence of the smallest polypeptide chain containing heme of extracellular hemoglobin from the polychaete Tylorrhynchus heterochaetus. Biochim. Biophys. Acta, 708-253-258, 1982.
- TERWILLIGER, R.C., TERWILLIGER, N.B. and SCHABTACH, E. Comparison of chlorocruorin and annelid hemoglobin quaternary structures. Comp. Biochem. Physiol., 55A:51-55, 1976b.
- TROSCHEL, F.H. Anatomie von Ampullaria urceus und uber die gattung lanister montf. Aech. Naturgesch, 11:197-216,, 1845.
- TRUCHOT, J.P. Factors controlling the in vitro and in vivo oxygen affinity of the hemocyanin in the crab Carcinus maenas (L). Resp. Physiol., 24:173-189, 1975.
- van BRUGGEN, E.F.J., SCHUTTER, W.M., van BREMEN, J.F.L., WICHERTJES, T. and KEEGSTRA, W. Recent electron microscopy of various hemocyanins. In: Invertebrate oxygen-binding proteins. Structure, Active Sites and Function. eds. J. Lamy and J. Lamy, pp.405-418, Dekker, New York, 1981.
- van DRIEL, R., BRUNORI, M. and ANTONINI, E. Kinetics of the cooperative and non-co-operative reaction of Helix pomatia haemocyanin with oxygen. J. Mol. Biol., 89:103-112, 1974.
- van HOLDE, K.E. & van BRUGGEN, E.F.J. The hemocyanin. In: Timasheff, S.H. & Fasman, G.D. eds. Biological Macromolecules series, 5:1-53, Marcel Dekker, New York, 1971.
- VESCHUEREN, L.J., De SADLEER, J., GIELENS, C. and LONTIE, R. Plasminolysis of the two polypeptide chains of alpha hemocyanin of Helix pomatia. In: Invertebrate Oxygen Binding Proteins. Structure, Active Sites and Function. ed. J. Lamy & J. Lamy, pp.285-293, Dekker, New York, 1981.
- VINOGRADOV, S.N. The structure of erythrocrucorins and chlorocruorins, the invertebrate extracellular hemoglobins. In: respiratory Pigments in Animals. Relation Structure Function. ed. J. Lamy & J. Lamy, JP. Truchot and R. Gielens, Springer-Verlag, pp. 9-20, 1985.

- VINOGRADOV, S.N., HALL, B.C. and SHLON, J.R. Subunit homology in invertebrate hemoglobins: a primitive heme-binding chain. Comp. Biochem. Physiol., 53B:89-92, 1976.
- VINOGRADOV, S.N., SHLON, J.M., KAPPA, O.H. and FROSSARD, P. The dissociation of annelid extracellular hemoglobins and their subunits: structure. Comp. Biochem. Physiol., 67B:1-12, 1980.
- WEBER, R.E. Function of invertebrate hemoglobin with special reference to adaptation to environmental hypoxia. Am. Zool. 20:79-102, 1980.
- WEIGLE, W.O. Immunochemical properties of haemocyanins. Immunochimistry. 1:295-302, 1964.
- WITTENBERG, B.A., BRIEHL, R.W. and WITTENBERG, J.B. The haemoglobins of invertebrate tissues. Biochem. J., 96:363-371, 1965.
- WOOD, E.J. Gastropod haemocyanins; dissociation of haemocyanins from Buccinum undatum, Neptunea antiqua, and Colus gracilis in the region of pH 7.5-9.2 Biochim. Biophys. Acta, 328:101-106, 1973.
- WOOD, E.J. Immunochemical properties of the haemocyanins from Buccinum undatum (L) and Neptunea antiqua (L). Comp. Biochem. Physiol., 52B:219-225, 1975.
- WOOD, E.J., BANNISTER, W.H., OLIVER, C.J. LONTIE, R. and WITTERS, R. Diffusion coefficients, sedimentation coefficients and molecular weights of some gastropod haemocyanins. Comp. Biochem. Physiol., 40B:19-24, 1971.
- WOOD, E.J. & MASBY, L.J. Physicochemical properties of Planorbis coneus erythrocytorin. Biochem. J., 149:437-445, 1975.
- ZOLLA, L., KUIPER, H.A., VECCHINI, P., ANTONINI, E. and BRUNORI, M. Dissociation and oxygen-binding behavior of meta-hemocyanin from Helix pomatia. Eur. J. Biochem., 87:467-473, 1978.