



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA
MOLECULAR

**Caracterização parcial de uma Pro-Lectina funcional
de sementes de *Dioclea grandiflora* Benth expressa em
Escherichia coli.**

Bruno Lopes de Sousa

Fortaleza

Março – 2010



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA
MOLECULAR

**Caracterização parcial de uma Pro-Lectina funcional
de sementes de *Dioclea grandiflora* Benth expressa em
Escherichia coli.**

Dissertação submetida à Coordenação do
Curso de Pós-Graduação em Bioquímica
como requisito para obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica

Bruno Lopes de Sousa

Fortaleza

Março – 2010

DEFESA DE DISSERTAÇÃO:

**Caracterização parcial de uma Pro-Lectina funcional
de sementes de *Dioclea grandiflora* Benth expressa em
Escherichia coli.**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica
como requisito para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica

Bruno Lopes de Sousa

Licenciado em Biologia

BANCA EXAMINADORA:

Professor Doutor Benildo Sousa Cavada (Orientador)
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará

Professor Doutor Celso Shiniti Nagano (Co-orientador)
Departamento de Engenharia de Pesca
Universidade Federal do Ceará

Professor Doutor João Paulo Matos Santos Lima
Departamento de Bioquímica
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Fortaleza

Março – 2010

A Deus,
As pessoas que amo.

Dedico

“O acaso favorece aos espíritos preparados.”

Louis Pasteur

“Masakatsu agatsu – A verdadeira vitória é a vitória sobre si mesmo.”

Morihei Ueshiba

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, pela vida, pelas oportunidades, pelas experiências e pelas pessoas maravilhosas que me foram permitidas conhecer nesse caminho, enfim, por tudo.

Em particular a minha família, fonte de amor e inspiração, minha mãe Goreth, meu pai Juveraldo, e minhas irmãs Roberta, Gabriela e Fernanda, pelo apoio e incentivo.

Aos meus demais familiares, avós, tios, tias e primos, pelo carinho e incentivo, e em especial aos meus tios Othon e Arimatéia, pelo exemplo de vida acadêmica.

Ao Professor Doutor Benildo Sousa Cavada, pela orientação e pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório juntamente com sua excelente equipe, e acima de tudo por acreditar no meu potencial, possibilitando que essa fase fosse concluída com êxito.

Ao Professor Doutor Celso Shiniti Nagano, pelas instruções, orientações e críticas, além da paciência e das inúmeras conversas construtivas, o meu muito obrigado!

Agradeço a Professora Doutora Kyria Santiago, pelo auxílio e colaboração no decorrer de todo o mestrado.

Ao Professor João Paulo Matos Santos Lima por seu apoio e pelas considerações que permitiram o aprimoramento deste trabalho.

Agradeço muito ao Professor Doutor Thalles Grangeiro, por ter me aberto as portas na Universidade Federal do Ceará e por todas as instruções que me concedeu enquanto estive sob sua orientação.

Aos Professores Francisco Campos e Tadeu Oliveira, pelo acesso aos seus laboratórios e pelos diversos ensinamentos.

Aos integrantes da família BioMol, Eduardo, Maria Júlia, Tales, Camila, Júnior, Rodrigo Maranguape, Bruno Anderson, Raniere, Joana, Batista (Bapte), Arthur, Rômulo, Fernando, Guilherme, Alfa, André, Sara, Alysson, Jéssica e Soraya, pelo companheirismo, apoio e cooperação.

Em especial agradeço a Saminha, que tanto me ajudou nesses últimos anos, compartilhando comigo as angústias e alegrias da vida no laboratório. E aos amigos Ito, Helton e Rafael, pela amizade e ajuda em todos os momentos.

Agradeço aos amigos do Núcleo de Biotecnologia de Sobral – NUBIS, pelo auxílio e suporte técnico em diversos momentos.

Aos amigos do laboratório de Genética Molecular: Tuana, Marina, Denise, Sandra, Natália, Júlio e Adriana, pelo carinho e apoio no início da minha vida acadêmica.

Aos colegas da turma de mestrado, pela amizade e companheirismo.

Agradeço imensamente aos amigos: Germano, Pedro Bastos, Pedro Augusto, Márcio, Camila, a todos os amigos do curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual do Ceará e aos amigos e colegas praticantes de aikido do Instituto Seigan.

Por fim, agradeço a Ana Linda, pelo amor, carinho e dedicação, indispensáveis nessa reta final.

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	8
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	10
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE TABELAS.....	15
RESUMO	16
ABSTRACT	17
1.INTRODUÇÃO.....	18
2. OBJETIVOS.....	21
2.1 Objetivos Gerais.....	22
2.2. Objetivos Específicos	22
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	23
3.1. Lectinas.....	24
3.1.1. Aspectos Históricos e Definição	24
3.1.2. Classificação Geral	26
3.1.3. Ocorrência	27
3.1.4. Princípios Gerais do Reconhecimento Proteína-Carboidrato	28
3.1.5. Funções das Lectinas	29
3.2. Lectinas Vegetais	31
3.3. Lectinas de Leguminosas	32
3.3.1. Aspectos Estruturais das Lectinas de Leguminosas.....	33
3.3.2. Sítio de Ligação a Carboidrato das Lectinas de Leguminosas.....	35
3.4. Subtribo Diocleinae	36
3.4.1. Expressão de Lectinas na Subtribo Diocleinae	38
3.4.2. Lectina de Sementes de <i>Dioclea Grandiflora</i> – DGL.....	39
3.5. Lectinas Vegetais Recombinantes	41
3.5.1. Expressão e Purificação de Lectinas em <i>Escherichia coli</i>	42
3.6. Aplicações Biotecnológicas das Lectinas	44
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
4.1. Material Biológico.....	48
4.2. Alinhamento e Análise Estrutural de Lectinas de Leguminosas.....	48
4.3. Extração de DNA e RNA	49

4.4. Síntese do cDNA	50
4.5. Clonagem do precursor da lectina de sementes de <i>Dioclea grandiflora</i>	50
4.6. Construção do Vetor de Expressão	52
4.7. Expressão Recombinante	53
4.8. Purificação	53
4.9. Detecção da Atividade Hemaglutinante.....	54
4.9.1. Cálculo da Atividade Hemaglutinante Específica	55
4.9.2. Especificidade por Carboidratos.....	55
4.10. Espectrometria de Massa	56
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
5.1. Clonagem do Gene para a r-pro-DGL	59
5.2. Expressão Recombinante e Purificação da r-pro-DGL.....	60
5.3. Ensaio de Hemaglutinação e Inibição	66
5.4. Determinação da Sequência Primária da r-pro-DGL por Espectrometria de Massa.....	68
5.5. Análise das Alterações Pós-Traducionais	70
6. CONCLUSÕES	77
7. REFERÊNCIAS	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A.H.: Atividade Hemaglutinante

ConA: Lectina de *Canavalia ensiformis* (*C.ensiformis* lectin)

ConBr: Lectina *Canavalia brasiliensis* (*C.brasiliensis* lectin)

ConM: Lectina de *Canavalia maritima* ConA: Lectina de *Canavalia ensiformis* (*C.ensiformis* lectin)

DEPC: Dietilpirocarbonato

DGL: Lectina de *Dioclea grandiflora* (*D. grandiflora* lectin)

Dguia: Lectina de *Dioclea guianensis* (*D.guianensis* lectin)

EcorL: Lectina *Erythrina corallodendron* (*E.corallodendron* lectin)

GalNAc: N-Acetil-Galactosamina

GlcNAc: N-Acetil-Glicosamina

GNA: Lectina de *Gallanthus nivalis* (*G. nivalis* lectin)

PCR: Reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction)

PDB: Protein Data Bank

PHA: Lectina de *Phaseolus vulgaris* (*P.vulgaris* agglutinin)

PNA: Aglutinina de *Arachis hypogea* (*A. hypogea* agglutinin)

PPL2: Lectina número 2 de *Parkia platycephala* (*P.platycephala* lectin number 2)

RCA: Aglutinina de *Ricinus comunis* (*R.comunis* agglutinin)

RIP: Proteínas Inativadoras de Ribossomos (Ribosome Inactivating proteins)

RpbA: Aglutinina (lectina) da casca de *Robinia pseudoacacia* (*R.pseudoacacia* bark agglutinin)

r-pro-DGL: Pro-DGL recombinante

RT-PCR: Transcriptase Reversa - Reação em cadeia da polimerase (Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction)

SBA: Aglutinina de *Glicine max* (*G. max* agglutinin)

SDS-PAGE: Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em presença de Dodecil Sulfato de Sódio

SjbA: Aglutinina de *Sophora japonica* (*S. japonica* agglutinin)

TxLC-I: Lectina de Tulipa

VML: Lectina de *Vatairea macrocarpa* (*V. macrocarpa* lectin)

Xman: 5-bromo-4-cloro-3-indol- α -D-manose

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Representação esquemática de merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas (VAN DAMME <i>et al.</i> , 1998).	27
Figura 02. (a) Diagrama esquemático da estrutura terciária das lectinas de leguminosas, mostrando a posição das folhas e do sítio de ligação a carboidrato. (b) Motivo <i>jellyroll</i> .	33
Figura 03. Ácido L-2-amino-4-guanidinoxibutanóico.	37
Figura 04. Modificações pós-traducionais durante o processo de maturação de lectinas na subtribo Diocleinae.	39
Figura 05. Flores (a) e sementes (b) de <i>Dioclea grandiflora</i> .	40
Figura 06. (a) Estrutura tridimensional da DGL silvestre complexada a um trimanosídeo (número de acesso: 1DGL). (b) Estrutura tridimensional da DGL recombinante complexada a XMan (número de acesso 2JE9).	41
Figura 07. Interação entre resíduos vizinhos da cauda de histidina (His-tag) e a matriz contendo níquel imobilizado.	44
Figura 08. Mapa do plasmídeo de clonagem pTOPO.	51
Figura 09. Mapa do plasmídeo de expressão pET32a. Os sítios para as enzimas de restrição utilizadas encontram-se assinalados.	52
Figura 10. Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR <i>colony</i> a partir de clones positivos de <i>E.coli</i> DH5 α transformados com o plasmídeo pTOPO contendo o gene para a r-pro-DGL.	59
Figura 11. Subclonagem do gene para a r-pro-DGL no plasmídeo de expressão pET32a.	60
Figura 12. Análise da expressão de clones positivos de <i>E.coli</i> BL21 (DE3) transformados com o gene para a proteína de fusão r-pro-DGL-His6-tioredoxina.	60

Figura 13. Cromatograma referente à aplicação de 75 ml da solução de proteínas totais da fração solúvel em coluna de níquel imobilizado.	61
Figura 14. Cromatograma referente à aplicação de 75 ml da solução de proteínas totais da fração insolúvel em coluna de níquel imobilizado.	62
Figura 15. Perfil cromatográfico referente à aplicação direta sob fluxo contínuo da solução contendo a r-pro-DGL.	63
Figura 16. Perfil cromatográfico referente à aplicação cíclica da r-pro-DGL.	63
Figura 17. Passos sequenciais da purificação da r-pro-DGL.	66
Figura 18. Ensaio da atividade hemaglutinante da r-pro-DGL.	67
Figura 19. Ensaio de inibição da atividade hemaglutinante da r-pro-DGL pelos açúcares manose, glicose, galactose e lactose.	68
Figura 20. Perfil de fragmentação da r-pro-DGL após digestão por tripsina.	69
Figura 21. Alinhamento realizado pelo programa ClustalW entre as sequências da pro-lectina silvestre de sementes de <i>D.grandiflora</i> e a pro-lectina recombinante expressa em <i>E.coli</i> .	69
Figura 22. Alinhamento entre a sequência da lectina de sementes de <i>D.grandiflora</i> e lectinas ligantes de galactose pertencentes a outras tribos de leguminosas.	71
Figura 23. Estrutura tridimensional dos sítios de ligação a carboidrato das lectinas da casca de <i>R. pseudoacacia</i> (a) (numero de acesso no PDB: 1FNY) e da lectina madura (cadeia α) de sementes de <i>D. grandiflora</i> (b)	72
Figura 24. Modelo tridimensional da r-pro-DGL gerado pelo programa MODELLER com base nas lectinas de <i>D. grandiflora</i> , <i>R. pseudoacacia</i> e <i>P. angolensis</i> .	74
Figura 25. Possíveis alterações estruturais causadas às alças adjacentes ao sítio de ligação da r-pro-DGL	74

Figura 26. (a) Disposição do peptídeo intermediário no modelo gerado para a r-pro-DGL. (b) Exposição das cadeias laterais de aminoácidos hidrofóbicos (resíduos em amarelo) no peptídeo intermediário (em verde escuro).	75
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diferentes tipos de interface formados entre monômeros de lectinas de leguminosas (adaptado de SINHA <i>et al.</i> , 2007).	35
Tabela 2. Principais trabalhos envolvidos na caracterização e análise da DGL.	41
Tabela 3. Lectinas de leguminosas clonadas e expressas em <i>E.coli</i> .	65
Tabela 4. Análise dos ensaios de hemaglutinação e inibição da r-pro-DGL	67
Tabela 5. Sequências dos peptídeos trípticos da r-pro-DGL	70

RESUMO

A pro-lectina de sementes de *Dioclea grandiflora* apresentou-se ativa quando expressa de forma recombinante (r-pro-DGL) no citoplasma do modelo procariótico *Escherichia coli*. Obtida de forma solúvel a partir do vetor pET32a, a proteína recombinante apresentou massa aparente (25 kDa) e sequência (obtida por espectrometria de massas) idênticas à pro-lectina silvestre, mostrando-se atipicamente funcional em comparação a outras lectinas de leguminosas expressas de forma heteróloga, possuindo uma atividade específica de 134.217.728 (U.H./mg). Diferentemente de sua contraparte silvestre, a r-pro-DGL não reconheceu especificamente glicose, sendo apenas fracamente inibida por manose. Em decorrência da alta similaridade de sequência entre os precursores de lectinas na subtribo Diocleinae e lectinas ligantes de galactose pertencentes a outras tribos de leguminosas, há a hipótese de que o processamento pós-traducional peculiar dessa subtribo poderia influir de forma decisiva sobre a especificidade fina dessas proteínas. Entretanto, a r-pro-DGL não apresentou afinidade por galactose ou lactose, demonstrando ser a topologia do sítio de ligação, bem como a conformação das alças que o estruturam, os principais fatores determinantes da especificidade a monossacarídeos. Assim, pode-se afirmar que precursores de lectinas na subtribo Diocleinae apresentam-se ativos enquanto deglicosilados, sendo ainda capazes de formar oligômeros e estabelecer ligações cruzadas entre membranas celulares e glicoconjugados.

Palavras-chave: *Dioclea grandiflora*, clonagem, expressão recombinante e processamento pós-traducional.

ABSTRACT

The pro-lectin from *Dioclea grandiflora* seeds has been shown active when expressed in the cytoplasm of the prokaryotic model *Escherichia coli* (r-pro-DGL). The recombinant protein was produced in a soluble way through the pET32a system and presented identical apparent molecular mass (25kDa) and sequence (obtained by mass spectrometry) to the wild pro-lectin, being atypically functional comparing to other legume lectins expressed in heterologous systems. Unlike its wild counterpart, r-pro-DGL did not recognize specifically glucose, being only weakly inhibited by mannose. Due to the high similarity among sequences and structures from Diocleinae lectins and galactose-binding lectins from other leguminous tribes, was proposed the hypothesis that the typical post-translational process of this subtribe could be itself determinant to generate the specificity of these proteins. However, it was not detected any affinity for galactose or lactose by the recombinant pro-lectin, demonstrating that binding site topology, as well the conformation of the surrounding loops, are the main factors in determining the monosaccharide specificity. Following these data we could affirm that lectins precursors from Diocleinae subtribe are active after deglycosilation, being capable to form oligomers and to crosslink cellular membranes.

Key-words: *Dioclea grandiflora*, cloning, recombinant expression and post-translational processing.

Lectinas são (glico)proteínas de origem não imune capazes de reconhecer especificamente mono ou oligossacarídeos, ligando-se a estes sem no entanto alterar suas estruturas químicas. Diversas evidências diretas e indiretas apontam para uma possível função de defesa das lectinas, dentre as quais podemos citar o fato dessas moléculas serem capazes de reconhecer especificamente carboidratos não existentes em seus organismos de origem, entretanto, encontrados em patógenos ou predadores naturais desses seres. (PEUMANS & VAN DAMME, 1995, VASCONCELOS & OLIVEIRA, 2004). A capacidade de reconhecimento específico dessas moléculas permite que as mesmas atuem na decodificação de glicocódigos, representados pelos glicoconjugados existentes tanto ancorados a membranas quanto livres nos meios intra e extracelulares (VAN DAMME *et al.*, 1998). Embora as lectinas possuam características em comum, as respostas biológicas por elas desencadeadas podem diferir em tipo e intensidade mesmo entre lectinas com alta conservação de sequência e estrutura. Tais características, aliadas a fácil purificação de várias dessas moléculas, têm despertado o interesse pela sua busca e por possíveis aplicações biotecnológicas (GABOR *et al.*, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2003; SHARON & LIS, 2004)

Embora as lectinas apresentem uma distribuição ubíqua dentre os seres vivos, as lectinas vegetais têm recebido uma maior atenção em decorrência da sua abundância, facilidade de purificação e da importância econômica de diferentes espécies para a economia e nutrição humana (ROUGÉ *et al.*, 1987; SHARON & LIS, 1989). Dentre elas, as provenientes da família das leguminosas (Fabaceae) são as mais extensivamente estudadas, sendo consideradas modelos para o estudo das interações entre proteínas e carboidratos

As lectinas de leguminosas pertencentes à subtribo Diocleinae merecem destaque em virtude do complexo processamento pós-traducional a que são submetidas durante seu processo de maturação, envolvendo a permuta circular dos fragmentos obtidos a partir da clivagem proteolítica de seus precursores, de modo que estes se apresentam de forma inversa nas proteínas maduras em comparação à estrutura gênica. Essas lectinas reconhecem especificamente resíduos de glicose e manose, entretanto, existe uma grande similaridade entre seus precursores e lectinas pertencentes a outras tribos de leguminosas (aproximadamente 50%), muitas das quais específicas para galactose. Devido a essa similaridade, surgiu a hipótese de que a permuta circular característica da subtribo Diocleinae seria por si só responsável pela alteração da afinidade específica dessas lectinas, uma vez que suas cadeias dispõem-se de forma inversa em comparação a outras.

Diversos experimentos envolvendo a clonagem e expressão heteróloga de lectinas de leguminosas, algumas das quais sob a forma de pro-lectinas, têm possibilitado a realização de análises sobre a estrutura e função dessas moléculas. A expressão da pro-lectina de *Canavalia ensiformis* (ConA) em diferentes estágios de processamento em *E.coli* forneceu diversos relatos a respeito da funcionalidade e das modificações sofridas por lectinas da subtribo Diocleiane durante seu processo de maturação (YAMAUCHI & MINAMIKAWA, 1990; MIN *et al.*, 1992; MIN & JONES, 1994; DINCTURK *et al.*, 2001). A funcionalidade dos precursores nessa subtribo já foi tema de diversos trabalhos, entretanto, alguns aspectos ainda necessitam serem esclarecidos a respeito do ponto exato onde tais moléculas adquirem sua capacidade de reconhecimento específico de carboidratos. Primeiramente, determinou-se que tais lectinas tornavam-se ativas após a clivagem proteolítica de seus precursores, o que deveria ser acompanhado por alterações conformacionais responsáveis pela formação do sítio de ligação (BOWLES *et al.*, 1986; CHRISPEELS, 1986). Outros trabalhos relataram como sendo a deglicosilação do precursor o passo chave na aquisição da capacidade de ligação (MARCUS & BOWLES, 1988; MIN & JONES, 1992; SHELDON & BOWLES, 1992), entretanto, pesquisas subseqüentes reportaram tal etapa como sendo insuficiente para a ativação da lectina (RAMIS *et al.*, 2001).

A inconclusividade desses dados confere uma grande relevância a estudos adicionais sobre as pro-lectinas pertencentes à família das leguminosas. A análise da funcionalidade e das alterações pós-traducionais responsáveis pela ativação dessas moléculas possibilitará compreender e justificar a existência de processamentos tão complexos entre grupos distintos.

2.1 Objetivos Gerais

Expressar de formar recombinante em *Escherichia coli* uma pro-lectina de sementes de *Dioclea grandiflora* com o intuito de analisar a importância das modificações pós-traducionais ocorrentes durante o processo de maturação dessa lectina, relacionando-os à sua funcionalidade, bem como a influência desse processamento peculiar na determinação da afinidade específica das lectinas da subtribo Diocleinae.

2.2. Objetivos Específicos

- Clonar e expressar em *E.coli* o gene referente à pro-lectina de sementes de *D.grandiflora* (r-pro-DGL);
- Otimizar o protocolo de purificação da r-pro-DGL, visando a obtenção de um bom rendimento de proteínas solúveis;
- Analisar a funcionalidade e a possível inversão de afinidade da pro-lectina;
- Realizar análises sobre a influência do processamento pós-traducional nas lectinas da subtribo Diocleinae.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. Lectinas

3.1.1. Aspectos Históricos e Definição

As lectinas surgiram no cenário científico em 1888 durante estudos realizados por Herman Stillmark sobre o princípio tóxico de extratos de sementes de mamona (*Ricinus communis*). Durante esses estudos ele observou que tais extratos, assim como os de outras plantas pertencentes à família Euphorbiacea, apresentavam a capacidade de aglutinar eritrócitos de diferentes animais. Stillmark propôs que tanto a toxicidade quanto a capacidade aglutinante desses extratos deviam-se a presença de um mesmo fator protéico, mais especificamente uma enzima, denominada por ele de Ricina (STILLMARK, 1888). Entretanto, hoje sabemos que o fator protéico de *R.comunis* analisado por Stillmark era uma combinação de diferentes aglutininas não-tóxicas e da verdadeira Ricina, uma proteína capaz de inativar ribossomos, sendo extremamente tóxica.

Em 1891, Hellin relatou que extratos tóxicos de sementes de jeriquiti (*Abrus precatorius*) também se apresentavam capazes de aglutinar eritrócitos, sendo o fator protéico responsável por essa atividade denominado por ele de Abrina. Em decorrência das similaridades exibidas por ambas as proteínas, Ricina e Abrina, Elfstand propôs em 1898 o termo hemaglutininas para proteínas que se apresentassem tóxicas e capazes de aglutinar eritrócitos. Entretanto, a idéia de que a toxicidade era uma propriedade intrínseca dessas proteínas foi abandonada no começo do século XX, quando Landsteiner & Raubitschek reportaram pela primeira vez a presença de hemaglutininas não-tóxicas em extratos de leguminosas como *Pisum sativum*, *Lens* e *culinaris* (LANDSTEINER & RAUBITSCHEK, 1907). Após esse trabalho, muitas outras hemaglutininas vegetais não-tóxicas foram identificadas (LANDSTEINER & RAUBITSCHEK, 1907).

Em 1906, Summer isolou a partir de sementes de *Canavalia ensiformis* uma fração protéica hemaglutinante (ConA) capaz de se ligar também a amido, glicogênio e mucinas. Ele observou que tais interações podiam ser inibidas por carboidratos de baixo peso molecular, como a sacarose (SUMMER & HOWELL, 1936), evidenciando pela primeira vez a capacidade dessas moléculas em reconhecer carboidratos. Posteriormente, a descoberta de que diferentes aglutininas apresentavam predileção por distintos tipos de eritrócitos (LANDSTEINER & VAN DER SCHEER, 1931) permitiu a Boyd em 1954 propor o termo

lectina (do latim *legere*, escolher) (BOYD & SHAPLEIGH, 1954). Inicialmente esse termo enfatizava apenas a capacidade hemaglutinante dessas proteínas, surgindo então a necessidade de diferenciá-las de outras moléculas dotadas dessa mesma habilidade. Atualmente existem diversas definições para lectinas, entretanto, todas se enquadram dentro de três requisitos principais (GABIUS, 1997; GOLDSTEIN *et al.*, 1980; KOCOUREK & HOREJSI, 1983), sendo eles:

- 1 – São (glico)proteínas capazes de reconhecer especificamente carboidratos,
- 2 – Não se associam ao sistema imunológico,
- 3 – As lectinas não alteram a estrutura química de seus ligantes.

Essas três premissas permitem diferenciar as lectinas de outras moléculas capazes de causar aglutinação de células, como taninos, alguns lipídios, substâncias catiônicas e carboidratos que interagem com oligossacarídeos, além de destacar também a não relação das mesmas ao sistema imune, apesar do padrão de expressão dessas proteínas poder ser alterado mediante situações de estresse, como infecções virais (SCHEGGIA *et al.*, 1988) e secas (SINGH *et al.*, 2000). O fato das lectinas não causarem alterações estruturais às moléculas que ligam permite também distingui-las de certas enzimas como glicosiltransferases e glicosidases, que a baixas temperaturas podem causar hemaglutinação, tendo em vista que a união dessas enzima a superfície celular ocorre mais rapidamente que a hidrólise da ligação glicosídica (SHANNON *et al.*, 1981).

Tendo por base essas considerações, Peumans e Van Damme conceituaram lectinas como sendo proteínas de origem não imune que possuem pelo menos um único sítio não catalítico capaz de se ligar de forma específica e reversível a mono- ou oligossacarídeos (PEUMANS & VAN DAMME, 1995), sendo esta a definição mais aceita. Entretanto, lectinas também podem ser definidas como proteínas ou glicoproteínas de origem não imune com um ou mais sítios por subunidade, capazes de interagir reversivelmente com segmentos glicídicos por meio de pontes de hidrogênio e interações Van der Waals (LIS & SHARON, 1998). Ambas as definições são bastante abrangentes e incluem proteínas não aglutinantes e certas enzimas, como as quitinases vegetais de classe I (VAN DAMME *et al.*, 1998). Tais moléculas são consideradas lectinas em decorrência de seu sítio único de ligação a carboidrato ser separado do sítio catalítico, não apresentando relação com a atividade enzimática.

3.1.2. Classificação Geral

As lectinas podem ser estruturalmente distinguidas entre si, havendo sido proposto por Peumans e Van Damme em 1998 (VAN DAMME *et al.*, 1998) a separação dessas proteínas em quatro grandes classes com base em suas estruturas gerais (figura 1). São elas:

- Merolectinas: são lectinas monovalentes, apresentam um único sítio de ligação a carboidrato, sendo dessa forma incapazes de causar aglutinação de células ou a precipitação de glicoconjugados (VAN DAMME *et al.*, 1998).
- Hololecinas: são proteínas que apresentam dois ou mais sítios de ligação a carboidratos, apresentando dessa forma a capacidade de estabelecer ligações cruzadas entre células e glicoconjugados, precipitando-os. Um exemplo dessa classe é a lectina de *Canavalia brasiliensis* (Conbr) (SANZ-APARICIO *et al.*, 1997).
- Quimerolectinas: as lectinas dessa classe apresentam, além dos domínios ligantes de carboidrato, um ou mais domínios independentes e de função biológica distinta (ex: atividade enzimática). Podemos citar como exemplo a PPL2, uma lectina obtida a partir de sementes de *Parkia platycephala*, que apresenta de forma independente um domínio ligante de quitina e outro com atividade endoquitinásica (CAVADA *et al.*, 2006).
- Superlectinas: apresentam pelo menos dois domínios distintos de ligação a carboidratos, diferentemente das hololecinas essas proteínas são hábeis a reconhecer diferentes sacarídeos (VAN DAMME *et al.*, 1998).

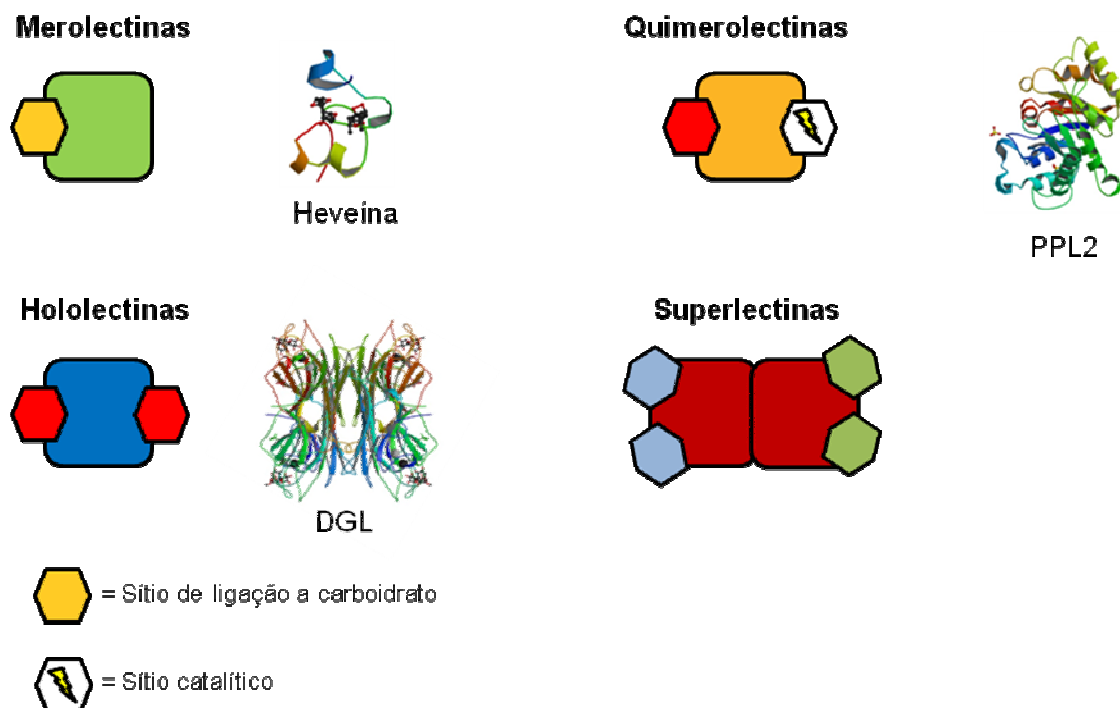


Figura 01. Representação esquemática de merolectinas, hololectinas, quimerolectinas (PEUMANS & VAN DAMME, 1995) e superlectinas (VAN DAMME *et al.*, 1998).

3.1.3. Ocorrência

Diversas lectinas já foram isoladas a partir de uma grande variedade de seres vivos, como bactérias (IMBERTY *et al.*, 2004), fungos (KAWAGISHI *et al.*, 2001), plantas (BRANCO *et al.*, 2004), insetos (TAKASE *et al.*, 2009) e vertebrados (KILPATRICK, 2002), podendo ser encontradas até mesmo em vírus (GLICK *et al.*, 1991). Esses relatos demonstram a ubiquidade das lectinas na natureza, evidenciando um importante papel dessas moléculas na fisiologia desses organismos.

Em vegetais as lectinas são frequentemente isoladas de sementes (CAVADA *et al.*, 1998; GUPTA & SRIVASTAVA, 1998; MOREIRA *et al.*, 1998; REGO *et al.*, 2002; KONOZY *et al.*, 2003) e, em menores proporções, de outros tecidos como folhas, entrecascas, frutos, raízes e flores (MARTINEZ & CORDOBA, 2000; NAEEM *et al.*, 2001; MISHRA *et al.*, 2004). As lectinas vegetais que são produzidas em órgãos de estocagem (sementes, na maioria, mas também tubérculos, bulbos e raízes, dependendo da planta) dominam o cenário da Lectinologia por serem encontradas em quantidades preparativas, bem como pela importância econômica e nutricional de suas espécies.

3.1.4. Princípios Gerais do Reconhecimento Proteína-Carboidrato

O padrão de glicosilação presente na superfície celular (glicocálice) atua como um verdadeiro cartão de identificação da célula, armazenando informações valiosas a respeito do tipo celular e sobre seu estado metabólico. Entretanto, a forma como essa informação se apresenta é essencialmente diferente do que ocorre nos ácidos nucléicos e nas proteínas. Sequências de DNA, RNA e aminoácidos contém informações ordenadas de forma linear, enquanto os oligossacarídeos apresentam-se por sua vez ramificados. Dessa forma, os carboidratos apresentam-se capazes de gerar uma maior diversidade de conformações (apesar de constituídos também por unidades básicas) do que as estruturas de polímeros lineares (LORIS, 2002). Assim as interações entre proteínas e carboidratos servem como grandes vias de informação biológica, podendo ocorrer em diferentes contextos biológicos (GABIUS *et al.*, 2002).

As lectinas participam dessa interface como decodificadores, reconhecendo de forma específica mono ou oligossacarídeos ancorados a membrana celular. Entretanto, o processo de reconhecimento de estruturas glicídicas por proteínas apresentam algumas peculiaridades. Diferentemente dos 20 aminoácidos existentes, os blocos constituintes dos oligossacarídeos (monossacarídeos) são extremamente semelhantes, existindo apenas alguns poucos grupos funcionais para direcionar o reconhecimento (grupos OH, N-acetila, carboxilato, sulfato e pequenas cadeias alifáticas), porém, seu padrão de ramificação gera variedade conformacional suficiente para contornar esse problema (LORIS, 2002). Outro ponto centra-se na inflexibilidade natural dos glicanos (IMBERTY & PEREZ, 2000), o que torna as interações entre proteínas e carboidratos basicamente de baixa afinidade.

Uma característica bem difundida entre as lectinas é o fato de seus sítios de ligação apresentarem-se basicamente constituídos por sítios primários capazes de reconhecer especificamente um único monossacarídeo (com baixa afinidade). Entretanto, frequentemente existem sítios secundários que ligam-se a outros resíduos de monossacarídeos, ou mesmo a grupos hidrofóbicos, conectados ao mesmo monossacarídeo presente no sítio primário. A existência desses sítios adicionais aumenta a afinidade de ligação em uma ordem de magnitude que varia de duas a cinquenta vezes (LORIS *et al.*, 1998). Porém, na prática as lectinas fazem-se valer de múltiplos sítios de ligação (multivalência), uma vez que a maioria delas apresenta-se como dímeros ou tetrâmeros. Dessa forma, a conformação e disposição dos

sítios de ligação, bem como dos epítomos por eles reconhecidos, são capazes de gerar uma interação de alta especificidade (BREWER & DAM, 2002; SACCHETTINI *et al.*, 2001).

3.1.5. Funções das Lectinas

Desde a sua descoberta as lectinas têm gerado polêmica com relação as suas possíveis funções, entretanto, mesmo para lectinas com grande similaridade torna-se difícil atribuir uma função em comum, tendo em vista que as mesmas podem apresentar variações em relação à especificidade, localização intracelular e período de síntese (RÜDIGER & GABIUS, 2001). A capacidade de reconhecer carboidratos de forma específica permite que as lectinas atuem na decodificação de glicocódigos, representados pelos polissacarídeos e glicoconjugados. Tais moléculas podem existir tanto nas formas livre, quanto ancoradas à membrana celular ou a matriz extracelular (VAN DAMME *et al.*, 1998).

Em vegetais, uma das premissas mais aceitas trata sobre a possível função de defesa das lectinas em detrimento de simples reservas de nitrogênio. Essa hipótese é sustentada pelo fato de muitas dessas proteínas apresentarem a capacidade de reconhecer especificamente carboidratos inexistentes em seus vegetais de origem, mas abundantes em outros organismos (PEUMANS & VAN DAMME, 1995). Suas destacadas resistência a proteólise e estabilidade mediante variações consideráveis de temperatura e pH (VASCONCELOS & OLIVEIRA, 2004) são outras características que corroboram para essa idéia. Essas “funções externas” das lectinas conferem aos vegetais uma maior adaptabilidade ao seu meio. Dentre elas, podemos citar:

1 - Proteção contra herbívoros: Essa propriedade é conferida pela capacidade e algumas lectinas vegetais de interagir com glicanos presentes na superfície celular do trato digestivo de insetos e mamíferos (VASCONCELOS & OLIVEIRA, 2004). Diversos trabalhos reportam vários efeitos tóxicos e/ou antinutricionais causados por essas proteínas, como a WGA, ConBr e GSA, todas capazes de inibir o crescimento de *Callosobruchus maculatus*, o gorgulho do feijão-de-corda (GRANGEIRO *et al.*, 1999a; GRANGEIRO *et al.*, 1999b; MURDOCK *et al.*, 1990; ZHU *et al.*, 1996); além da GNA, que apresenta efeito tóxico contra o afídeo *Aulacorthum solani* (DOWN *et al.*, 1996).

2 – Atividade antifúngica: A quitina, polímero constituído por resíduos de N-Acetil-Glicosamina (GlcNAc) unidos por ligações $\beta(1-4)$, é o principal constituinte da parede celular fúngica. Dessa forma, lectinas ligantes de GlcNAc podem exercer efeito inibitório sobre o crescimento celular fúngico, como por exemplo a WGA (RÜDIGER, 1997).

3 – Simbiose com bactérias nitrificantes: Várias plantas, em particular as leguminosas, são conhecidas pela sua habilidade em estabelecer simbiose com bactérias capazes de fixar o nitrogênio atmosférico, como as do gênero *Rhizobium* e outros relacionados, tornando-as independentes da adição de fertilizantes nitrogenados (RÜDIGER, 1984). Essa relação ocorre mediante a interação entre lectinas presentes nas raízes e glicoconjugados (lipochitooligossacarídeos) da parede celular bacteriana (EIJSDEN *et al.*, 1995).

Apesar de apresentarem importantes papéis no meio externo, as lectinas também possuem funções indispensáveis no controle da homeostase vegetal. Dentre elas podemos citar o papel das lectinas como reservas de nitrogênio durante o desenvolvimento inicial da planta, já que o estoque dessas proteínas diminui progressivamente durante o crescimento da plântula. Essa função é acoplada ao possível papel na defesa, uma vez que quantidades consideráveis de lectinas presentes na semente podem ajudar a evitar que essa seja predada ou danificada, porém, se não requisitadas, são então consumidas (PEUMANS & VAN DAMME, 1995). Outro papel das lectinas encontra-se na interação com enzimas, direcionando sua atuação a sítios específicos e ao mesmo tempo modulando sua atividade (TAIPALENSUU *et al.*, 1997; WIERZBA-ARABSKA *et al.*, 1987)

Em animais, numerosos processos intra- e intercelulares são mediados por lectinas em interação a biomoléculas, onde tais processos podem ser tanto de natureza fisiológica (reconhecimento específico entre espermatozóide e óvulo na fecundação, interações entre células e célula-matriz extracelular durante a embriogênese e no desenvolvimento do organismo, diferenciação e proliferação celular, etc.) (GABIUS, 1997) quanto patológica (união de bactérias, vírus e toxinas a membrana celular; transformação maligna e metástase, etc.). Diversos trabalhos reportam ainda a participação dessas proteínas em vários distúrbios metabólicos no homem, como alterações no padrão de expressão de galectinas durante a inflamação e câncer, patologias decorrentes de alterações sofridas por glicolipídeos (síndromes de Fabry, Krabbe, Gaucher, Tay-Sachs, etc.) ou glicoproteínas (impedindo o reconhecimento específico dessas moléculas em processos celulares), e ainda na colonização

de diferentes tecidos por bactérias e protozoários (LORIS, 2002; MITCHELL *et al.*, 2002).

3.2. Lectinas Vegetais

Muitas lectinas vegetais têm sido extensivamente caracterizadas recentemente. Geralmente, essas proteínas recebem suas denominações a partir das plantas das quais são obtidas, como no caso das lectinas de *Canavalia brasiliensis* (ConBr), *Canavalia maritima* (ConM), *Dioclea guianensis* (Dguia) e *Dioclea grandiflora* (DGL). A maior parte dessas lectinas é destinada a secreção, sendo acumuladas nos vacúolos ou integradas a parede celular ou espaços intercelulares. Podemos citar como alguns exemplos a Concanavalina A (ConA) e as lectinas de soja (SBA), ervilha (PSA) e fava, que apresentam altas taxas de acumulação nos vacúolos de seus cotilédones (8 a 10% das proteínas totais), porém, baixas taxas em outros tecidos embrionários. Essas lectinas são sintetizadas durante o desenvolvimento da semente juntamente com várias importantes proteínas de reserva (RÜDIGER, 2001).

As lectinas vegetais podem ser classificadas com base em suas estruturas em sete famílias distintas, de acordo com Peumans e Van Damme (1998), sendo elas:

- Lectinas de Leguminosas;
- Lectinas de monocotiledôneas ligantes de manose;
- Lectinas ligantes de quitina,
- RIPs do tipo 2 (Proteínas Inativadoras de Ribossomos);
- Lectinas relacionadas a jacalina;
- Lectinas relacionadas a amarantina;
- Lectinas de floema de Curcubitaceae.

Apesar de poderem apresentar afinidade por carboidratos distintos, as lectinas vegetais apresentam uma extensa similaridade que se faz presente mesmo em membros de grupos taxonômicos não relacionados, o que demonstra uma estreita relação evolutiva entre essas moléculas (PEUMANS & VAN DAMME, 1998). Além do que, em uma mesma espécie pode-se encontrar lectinas estruturalmente relacionadas, mas que desencadeiem diferentes

respostas biológicas. Um exemplo desse fato é a espécie *Ricinus comunis*, que produz uma lectina tóxica (Ricina) com fraca capacidade aglutinante, e outra não-tóxica com alta capacidade aglutinante (RCA – *Ricinus comunis* agglutinin) (RÜDIGER & GABIUS, 2001).

3.3. Lectinas de Leguminosas

As lectinas de leguminosas (família Fabaceae) constituem o grupo estruturalmente mais estudado dentre as lectinas vegetais. São geralmente obtidas a partir de sementes e apresentam uma alta conservação entre suas estruturas primárias e terciárias, apresentando-se em sua maioria como homodímeros ou homotetrâmeros. Esse grupo de plantas tem recebido nos últimos anos uma grande atenção do meio científico, especialmente nos campos da genômica e proteômica, como consequência de sua grande importância na nutrição humana e na agricultura sustentável (ROUGÉ *et al.*, 1987; SHARON & LIS, 1989).

Dentre os estudos envolvendo genômica, diversos genes para lectinas têm sido identificados e caracterizados em leguminosas, bem como a realização de estudos comparativos e filogenéticos entre os mesmos. A expressão dessas lectinas em sistemas procarióticos e/ou eucarióticos possibilita não apenas a realização de análises estruturais (cristalografia ou ressonância magnética nuclear), mas também a obtenção de um melhor entendimento a respeito dos mecanismos de regulação dessas proteínas. Diversos estudos envolvendo transferência de genes têm abordado também o potencial dessas lectinas como ferramentas para o combate a pragas agrícolas, tendo em vista sua possível função de defesa (NAISA *et al.*, 2009; QURESHI *et al.*, 2007).

A proteômica por sua vez, esta emergindo como uma potente ferramenta complementar a genômica na análise dos aspectos estruturais e dinâmicos dessas moléculas (NAISA *et al.*, 2009). Hoje, mais de 250 sequências de aminoácidos são conhecidas, a maioria homólogas, com exceção das lectinas de *Parkia platycephala* (GALLEGO DEL SOL *et al.*, 2005). Foram também resolvidas mais de 35 estruturas tridimensionais de lectinas através da técnica de difração de raios X, tanto em suas formas livres quanto complexadas a diferentes ligantes (3D Lectin Data Bank).

3.3.1. Aspectos Estruturais das Lectinas de Leguminosas

A estrutura tridimensional das lectinas de leguminosas é caracterizada pela presença do motivo protéico conhecido como “jellyroll” (figura 2), também encontrado em outras proteínas e frequentemente associado ao processo de reconhecimento de carboidratos (KEITEL *et al.*, 1993; VARELA *et al.*, 1997). Esse motivo possui em suas porções anterior e posterior, respectivamente, uma folha β parcialmente estendida de seis fitas e uma folha β curvada de sete fitas, anti-paralelas e unidas entre si por uma terceira e curta folha de cinco fitas situada na porção superior do motivo (CAVADA *et al.*, 2001). Tais folhas apresentam-se conectadas por alças (loops) que variam de tamanho dentre as diferentes lectinas. Tal estrutura assemelha-se a um sanduíche e é estabilizada pela presença de dois núcleos hidrofóbicos (BANERJEE *et al.*, 1996). Esse motivo (“legume lectin fold”) foi observado pela primeira vez na estrutura da lectina de *Canavalia ensiformis* (ConA), sendo o mais extensamente observado dentre as lectinas (VIAJAVAN & CHANDRA, 1999).

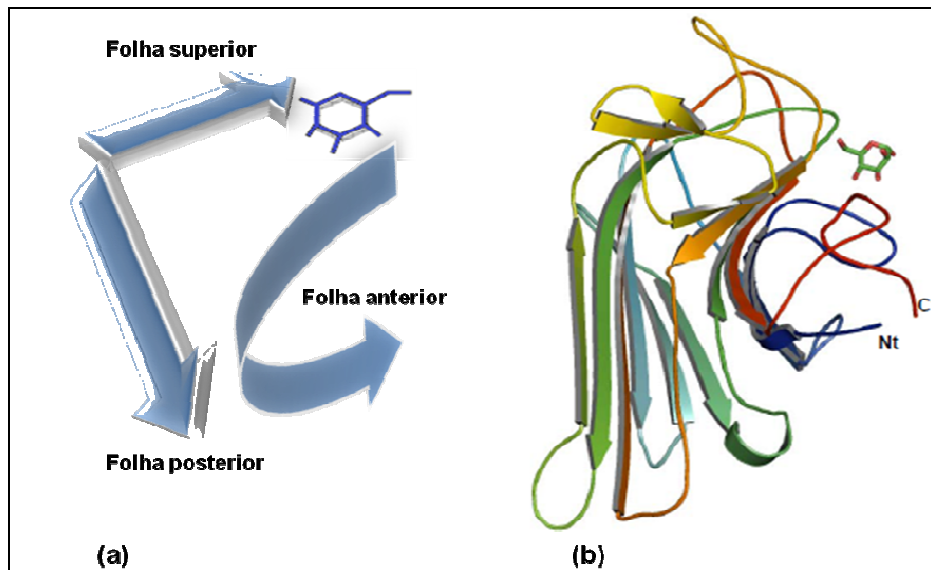


Figura 02. (a) Diagrama esquemático da estrutura terciária das lectinas de leguminosas, mostrando a posição das folhas e do sítio de ligação a carboidrato (adaptado de Chandra *et al.*, 2001). (b) Motivo “jellyroll” (adaptado de Nagano *et al.*, 2008).

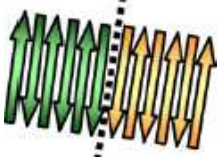
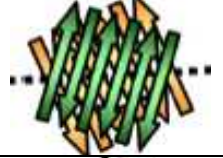

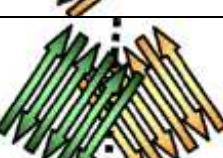
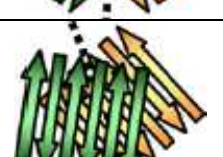
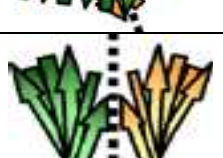
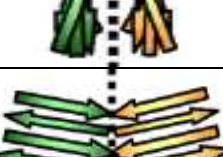
Apesar da grande similaridade existente entre as lectinas desse grupo, alterações sutis em suas sequências de aminoácidos podem acarretar modificações significativas na forma de associação entre os monômeros. Essas associações, ou interfaces, podem ocorrer de

sete formas distintas, sendo elas: canônica (ou tipo II), X1, X2, X3, X4, X5, e a chamada interface não usual da PNA (BRINDA *et al.*, 2004; SINHA *et al.*, 2007) (tabela 1).

A interface canônica é a mais comumente observada, sendo marcada por uma disposição paralela das folhas β que se situam na porção posterior do motivo “jellyroll”, originando uma folha contínua de 12 fitas. Entretanto, alterações nesse padrão podem ocorrer em decorrência de características intrínsecas da própria molécula, como a presença de glicosilações ou aminoácidos carregados no sítio de associação. Essas alterações permitem a formação dos diferentes tipos de interface, que são caracterizadas pela sobreposição dessas mesmas folhas, havendo variação apenas no ângulo de disposição (BRINDA *et al.*, 2004). Em 2008, Moreno *et al.* reportaram a existência de um novo tipo de interface observada entre os dímeros GS4 da lectina de *Lotus tetragonolobus* (LTA), diferenciada das previamente relatadas em decorrência de uma glicosilação existente na região de associação entre os dímeros.

Com base nessas diferentes formas de associação, as lectinas de leguminosas podem exibir oito diferentes tipos de estrutura quaternária, entre dímeros e tetrâmeros, que podem ser classificadas como: Canônica, tipo EcorL, GS4, DBL, tipo ConA, tipo PNA, GS1 e DB58 . Os tetrâmeros são geralmente dímeros de dímeros, apresentando principalmente dois tipos de interface. Essas diferenças estruturais têm influência direta na afinidade específica dessas lectinas, tendo em vista que o sítio de ligação a carboidrato irá expor-se de forma diferenciada em cada uma delas (BRINDA *et al.*, 2004; SINHA *et al.*, 2007).

Tabela 1. Diferentes tipos de interface formados entre monômeros de lectinas de leguminosas (adaptado de SINHA *et al.*, 2007).

Tipo de Interface	Ocorrência	Representação
Canônica ou Tipo II	Presente em Lectinas diméricas como a PSL, ou tetraméricas como ConA e SBA.	
X1	Observada no dímero DB58 e nas interfaces não-canônicas da PHA e SBA.	
X2	Apenas em tetrâmeros, como na interface não canônica da ConA e DGL.	
X3	Dímeros tipo EcorL.	
X4	Dímeros tipos GS4 e GS1.	
X5	Observada em dímeros do tipo GS1. Assemelha-se a interface X4, entretanto, com uma orientação diferente.	
Interface não-usual da PNA	Lectina de <i>Arachis hypogea</i> (PNA).	

3.3.2. Sítio de Ligação a Carboidrato das Lectinas de Leguminosas

O sítio de ligação a carboidrato em lectinas de leguminosas é uma estrutura relativamente simples formada essencialmente por quatro alças (loops) (LORIS *et al.*, 1998; SHARMA & SUROLIA, 1997). Três dessas alças estruturam o sítio de ligação (YOUNG e OOMEN, 1992), no qual alguns poucos resíduos semi-invariantes conferem a afinidade da lectina, enquanto a quarta alça é responsável pela especificidade de ligação a

monossacarídeos. Além do sítio primário, frequentemente as lectinas de leguminosas apresentam sítios secundários capazes de reconhecer açúcares ou grupos hidrofóbicos, contribuindo assim para a especificidade fina da lectina (HALMELRYCK *et al.* 1998).

A conformação ativa do sítio de ligação a carboidrato é mantida por dois íons metálicos de transição, cálcio e manganês (BOUCKAERT *et al.*, 1995; LORIS *et al.*, 1998; BOUCKAERT *et al.*, 2000). Na estrutura da ConA, o sítio de união a Mn^{2+} denomina-se S1, enquanto do sítio de união a Ca^{2+} denomina-se S2 (HARDMAN & AINSWORTH, 1972). A presença dos íons na lectina é necessária para a manutenção da conformação “cis” da ligação Ala207-Asp208, que por sua vez modula a arquitetura do sítio de união a carboidrato. Dessa forma, a desmetalização causa a perda da capacidade de reconhecimento específico de monossacarídeos (LORIS *et al.*, 2004). Em contrapartida, a união do íon Mn^{2+} ao sítio S2 da apo-lectina (desmetalizada) induz alterações conformacionais que permitem a formação do sítio S2. A união do íon Ca^{2+} ao sítio S2 reestrutura o sítio de união a carboidrato, tornando a lectina novamente ativa (BREWER *et al.*, 1983).

As lectinas de leguminosas podem ser divididas em cinco grupos de acordo com sua especificidade de união a monossacarídeos (SHARON & LIS, 1990): (1) específicas de fucose; (2) específicas para GlcNAc/GlcNAc (β 1-4) GlcNAc ; (3) ligantes de glicose/manose; (4) específicas para galactose e/ou N-Acetil-galactosamina; e (5) aquelas que não se ligam a monossacarídeos. O sítio de união a carboidrato nas lectinas de leguminosas localiza-se em uma depressão na superfície da proteína, e o reconhecimento específico de carboidratos se dá por intermédio de pontes de hidrogênio entre a lectina e o açúcar. Também participam do processo de reconhecimento interações de Van der Waals estabelecidas entre o anel aromático do açúcar e as cadeias laterais de aminoácidos hidrofóbicos. Contatos adicionais entre o carboidrato e a superfície da proteína (diretos ou mediados por moléculas de água), contribuem para a alta seletividade (WEIS & DRICKAMER, 1996; ELGAVISH & SANAN, 1997).

3.4. Subtribo Diocleinae

A subtribo Diocleinae ocorre principalmente no continente americano e possui algumas características primitivas, como o hábito lenhoso ou grosso, as flores grandes

possuindo discos proeminentes em torno do ovário, a hila normalmente longa e a presença do aminoácido não-protéico canavanina (ácido L-2-amino-4-guanidinoxibutanóico) (figura 3).

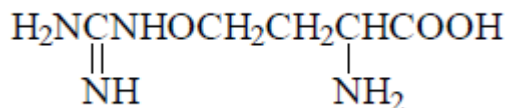


Figura 03. Ácido L-2-amino-4-guanidinoxibutanóico.

Lackey em 1981 reconheceu a presença de 13 táxons ao nível de gênero em Diocleinae: *Dioclea*, *Cymbosema*, *Cleobulia*, *Macropychanthus*, *Canavalia*, *Luzonia*, *Camptosema*, *Cratylia*, *Collaea*, *Galactia*, *Calopogonium*, *Herpyzia*, *Pachyrhizus* (LACKEY, 1981), porém, ele próprio sugeriu que os três últimos gêneros talvez estivessem inapropriadamente localizados nesta subtribo (VARELA, 2004). Estudos anteriores da morfologia do pólen da subtribo Diocleinae (KAVANGH & FERGUSON, 1981) já confirmavam essa observação e sugeriram a exclusão desses três gêneros, além da reclassificação do gênero *Cymbosema* para *Dioclea*. Estudos filogenéticos da tribo Phaseolae baseados no DNA dos cloroplastos (DOYLE & DOYLE, 1993) e na análise do rDNA (VARELA, 2004; LEE & HYMOWITZ, 2001) concluíram que os gêneros *Calopogonium* e *Pachyrhizus* pertencem na verdade a subtribo Glycininae. Estudos filogenéticos da subtribo Diocleinae baseados do DNA ribossômico confirmaram essa exclusão e a reclassificação do gênero *Cymbosema*, cujo único representante era *Cymbosema roseum*, como uma nova espécie de *Dioclea* (VARELA, 2004). Dessa maneira, a subtribo Diocleinae possui atualmente nove gêneros: *Dioclea*, *Cleobulia*, *Macropychanthus*, *Canavalia*, *Luzonia*, *Camptosema*, *Cratylia*, *Collaea* e *Galactia*.

As lectinas isoladas de sementes de leguminosas pertencentes à subtribo Diocleinae apresentam uma alta similaridade de sequência a ConA (ConA-like), entretanto, exibem variações em seus equilíbrios dímero-tetrâmero pH dependente (CALVETE *et al.* 1999) e nas respostas biológicas que desencadeiam. Dentre essas atividades podemos citar a proliferação de linfócitos, produção de interferon γ (BARRAL-NETO *et al.* 1992), atividade pro - inflamatória (RODRIGUEZ *et al.* 1992) e liberação de histamina por mastócitos peritoneais em ratos (BARBOSA *et al.* 2001; CAVADA *et al.* 2001; FERREIRA *et al.* 1996). Tais variações derivam de alterações singelas na sequência primária de aminoácidos

que podem, entretanto, causar modificações significativas. Como exemplo podemos citar a substituição de um único aminoácido na posição 58 da sequência da ConA em relação a ConBr (ácido aspártico na ConA e Glicina na ConBr), que gera diferenças na orientação dos sítios de ligação a carboidrato na estrutura quaternária dessas lectinas ao impedir a formação de uma ponte de hidrogênio na interface dímero-dímero (SANZ-APARICIO *et al.* 1997). Assim, ConA e ConBr podem ligar-se a carboidratos similares ou idênticos expostos diferentemente na superfície celular, podendo desencadear respostas em diferentes populações celulares ou ocasionar efeitos de diferentes intensidades em um mesmo grupo de células. Adicionalmente, como apenas a forma tetravalente dessas lectinas é capaz de causar ligações cruzadas entre receptores na superfície celular, as diferentes razões entre as formas diméricas e tetraméricas em um dado pH podem contribuir também para gerar variabilidade nas respostas biológicas (GALLEGO DEL SOL *et al.*, 2004).

3.4.1. Expressão de Lectinas na Subtribo Diocleinae

As lectinas na subtribo Diocleinae, assim como em outras leguminosas, são sintetizadas primeiramente como precursores glicosilados inativos, que apresentam em suas sequências um peptídeo sinal de (em torno de 30 aminoácidos) para seu direcionamento ao retículo endoplasmático (HERMAN *et al.*, 1985). Após a eliminação do peptídeo sinal o precursor é enviado ao complexo de Golgi, sendo em seguida armazenado já na forma de lectina madura em corpos protéicos de origem vacuolar (BOWLES & PAPIN, 1988). Diferentemente de outras leguminosas, as lectinas da subtribo Diocleinae sofrem um processo de maturação que envolve um complexo mecanismo pós-traducional. O oligossacarídeo ancorado a porção central do precursor é fundamental para a entrada do mesmo no complexo de Golgi, entretanto, uma vez aí compartimentalizado a pro-lectina sofre clivagens proteolíticas que dependem da deglicosilação da mesma (CLAUDE *et al.*, 2005). Esse processo acarreta a remoção de uma porção C-terminal de nove aminoácidos e de um peptídeo intermediário de 15 aminoácidos, originando as cadeias γ e β , que são em seguida unidas novamente numa ordem inversa a que originalmente se encontravam no precursor, formando a cadeia α madura (CARRINGTON, 1985; BOWLES, 1986; CHRISPEELS, 1986; FAYE, 1987; BOWLES & PAPIN, 1988; SHELDON & BOWLES, 1992; SHELDON, 1996). Essa reação de transpeptidação é característica da subtribo, sendo denominada permuta circular (figura 4). Tanto a hidrólise dependente de deglicosilação como a religação são

catalisadas pela mesma enzima, uma asparaginil endopeptidase (MIN & JONES, 1994). A atividade dessa enzima não é completamente eficiente, uma vez que a fração contendo a proteína purificada consiste numa mescla constituída por 60% da cadeia madura (contendo seus 237 aminoácidos), e por 40% de seus fragmentos β (1-118, 14 kDa) e γ (119-237, 12 kDa), unidos de forma não-covalente a estrutura terciária do protômero. Essas lectinas são codificadas por genes desprovidos de íntrons, como indicam os dados de seqüenciamento obtidos a partir dos mRNAs e do DNA genômico dessas proteínas (NAGANO, 2008; GRANGEIRO, 1996, CARRINGTON,1985).

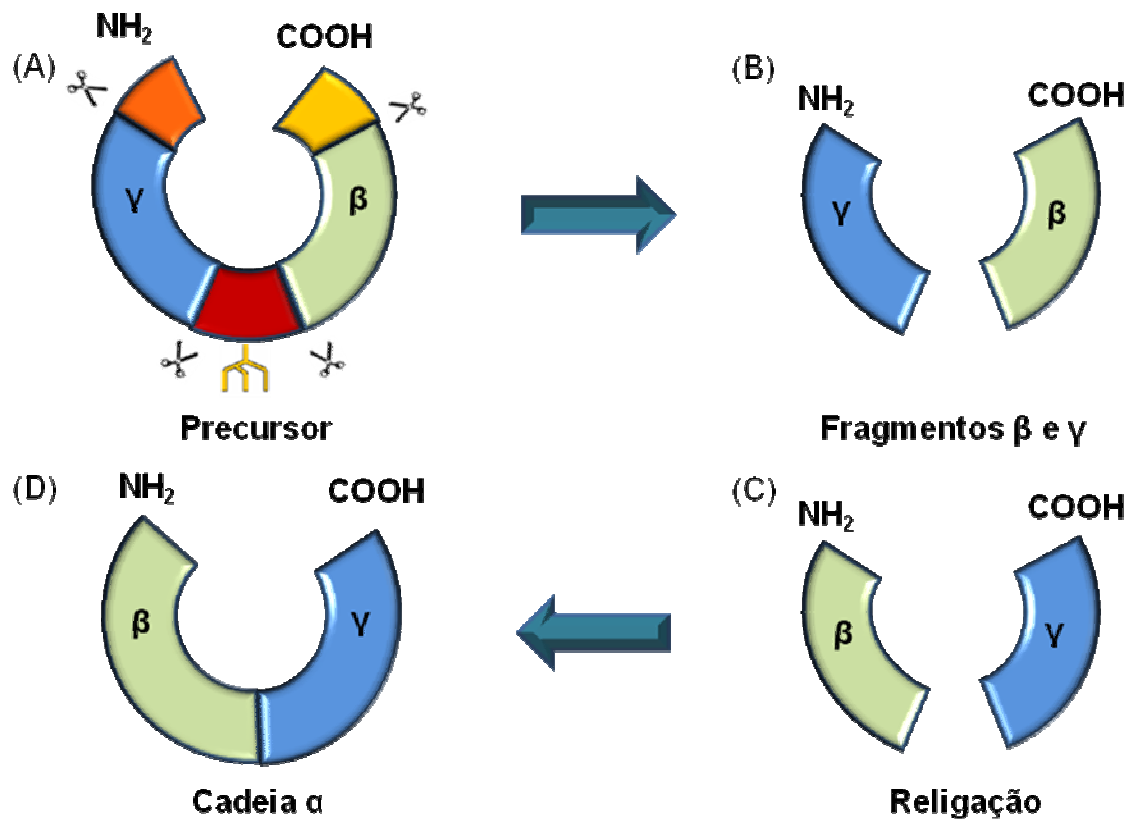


Figura 04. Modificações pós-traducionais durante o processo de maturação de lectinas na subtribo Diocleinae. (A) Clivagem proteolítica dependente de deglicosilação. (B) Formação das cadeias γ e β . União dos fragmentos de forma inversa, originando a cadeia α (C e D). Adaptado de Nagano *et al.*, 2008.

3.4.2. Lectina de Sementes de *Dioclea Grandiflora* – DGL

Dioclea grandiflora (figura 5), conhecida popularmente como mucunã, é uma espécie pertencente à família das leguminosas e tipicamente encontrada no norte do Brasil. É

popularmente empregada no tratamento de doenças na próstata e nos rins, havendo sido ainda reportados possíveis efeitos sedativo, tônico e anti-epilético (MATTEI *et al.*, 1995).

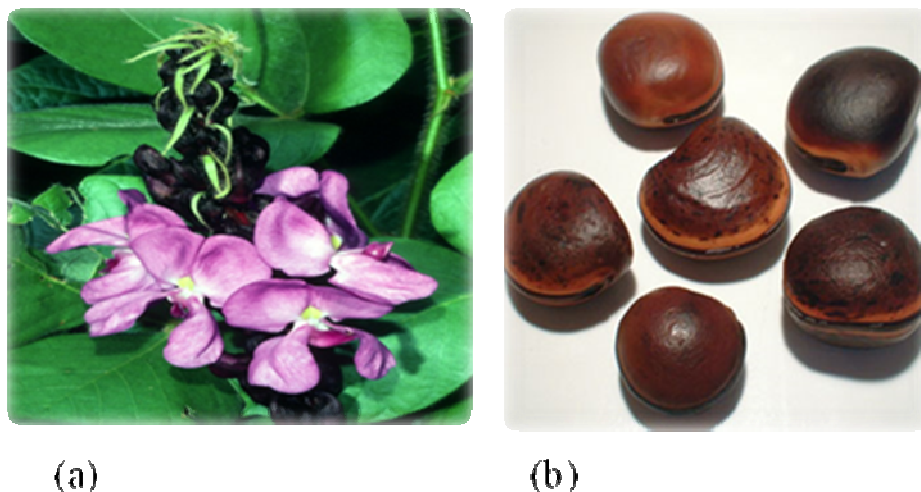


Figura 05. Flores (a) e sementes (b) de *Dioclea grandiflora*.

A lectina de sementes de *D.grandiflora* é uma proteína glicose/manose ligante não-glicosilada, descrita como um tetrâmero constituído por dois dímeros canônicos de massa molecular de 100 kDa (MOREIRA *et al.*, 1983). Assim como outras lectinas de leguminosas, DGL necessita ligar-se aos íons Ca^{2+} e Mn^{2+} para exibir sua atividade. Essa lectina possui um alto grau de similaridade com a lectina de sementes de *C.ensiformis* (ConA-like), diferindo em apenas 42 aminoácidos de suas sequências completas (GUPTA *et al.*, 1996), apresentando todos os aminoácidos relacionados ao sítio de ligação a carboidrato conservados, bem como cinco dos seis resíduos dos sítios de ligação a metal (RICHARDSON *et al.*, 1984). A DGL apresenta-se fisicamente, quimicamente e estruturalmente bem caracterizada (tabela 2). Sua estrutura tridimensional (figura 6) encontra-se depositada no PDB sob o número de acesso 1DGL (ROZWARSKI, 1998), e diversos estudos adicionais sobre sua estrutura (NAGANO *et al.*, 2008), caracterização (CAVADA *et al.*, 1996) e atividades biológicas já foram realizados (ANDRADE *et al.*, 1999; DAM *et al.*, 1998). Diferentemente de outras lectinas de Diocleinae, mas similarmente a ConA, DGL apresenta uma alta afinidade pelo trimanosídeo 3,6-di-O-(α -D-mannopiranosil)- α -D-manopiranosose, presente na maioria das glicosilações protéicas (GUPTA *et al.*, 1996).

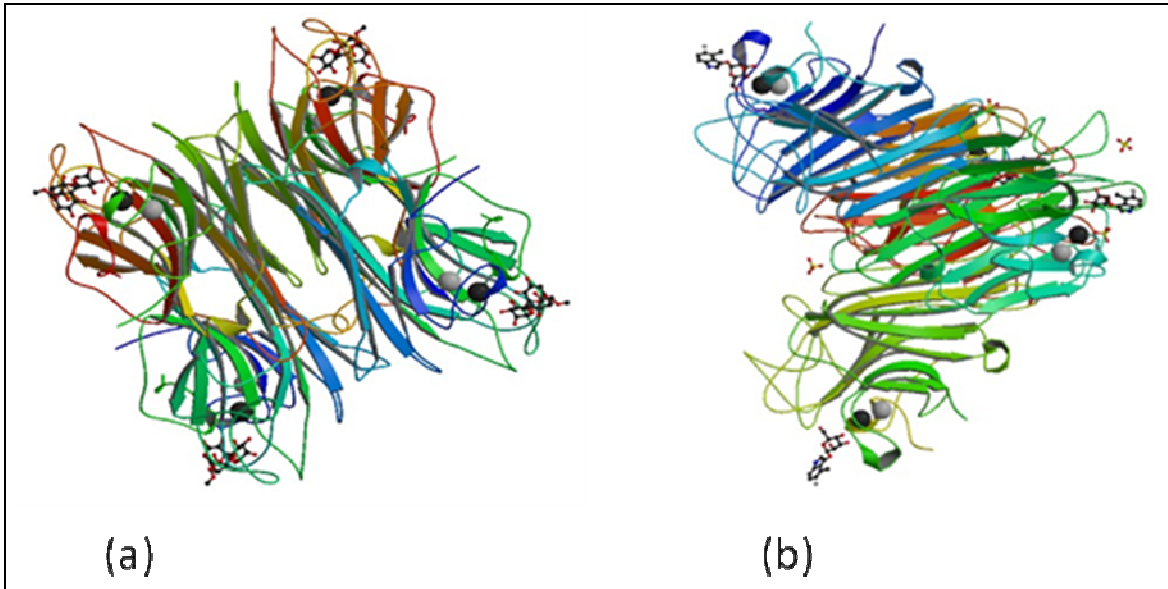


Figura 06. (a) Estrutura tridimensional da DGL silvestre complexada a um trimanosídeo (número de acesso: 1DGL). (b) Estrutura tridimensional da DGL recombinante complexada a X-Man (número de acesso 2JE9).

Tabela 2. Principais trabalhos envolvidos na caracterização e análise da DGL.

Purificação e caracterização - MOREIRA *et al.*, 1983.

Obtenção da sequência de aminoácidos - AINOUZ *et al.*, 1987.

Determinação da estrutura tridimensional - ROZWARSKI *et al.*, 1998

Expressão recombinante e mutagênese - NAGANO *et al.*, 2008.

3.5. Lectinas Vegetais Recombinantes

Nas últimas duas décadas o rápido desenvolvimento das técnicas em engenharia genética (tecnologia do DNA recombinante) tem alavancado as pesquisas envolvendo lectinas vegetais por possibilitar o acesso à sequências completas de cDNAs de várias dessas proteínas. Várias delas têm sido expressas em sistemas heterólogos, como bactérias (*Escherichia coli*), leveduras (*Pichia pastoris* e *Saccharomyces cerevisiae*), plantas (*Nicotiana tabacum*), ou mesmo células de mamíferos (células de rins de macaco). A clonagem e expressão recombinante de lectinas vegetais servem as seguintes propostas: (1) determinação de suas estruturas primárias; (2) análise de sua genética, evolução e biosíntese; (3) avaliação do papel de diferentes resíduos de aminoácidos no reconhecimento de

carboidratos e na associação de monômeros; (4) produção de lectinas com novas especificidades; e (5) para estudo das funções das lectinas nos organismos vegetais.

As lectinas recombinantes apresentam especificidades e afinidades muito similares às suas contrapartes silvestres podendo, entretanto, diferir de forma mais significativa a nível estrutural. Isso ocorre principalmente porque originalmente as lectinas vegetais são submetidas a processamentos pós-traducionais que muitas vezes não são usuais. Por exemplo, as lectinas de *Pisum sativum* e *Vicia faba* são clivadas em duas cadeias, enquanto a concanavalina A (assim como outras lectinas de Diocleinae) sofre um processo de permuta que a torna circularmente similar a outras lectinas de leguminosas (figura 4). Além disso, lectinas glicosiladas expressas em bactérias apresentam-se desprovidas de seus oligossacarídeos (já que as mesmas apresentam-se incapazes de realizar a maioria dos processamentos pós-traducionais), e quando expressas em sistemas eucarióticos podem apresentar glicosilações diferenciadas das originais (ETZLER, 2000; PUTZAI, 1991; RÜDIGER, 1997).

3.5.1. Expressão e Purificação de Lectinas em *Escherichia coli*

O primeiro sistema utilizado para a expressão recombinante de proteínas foi o modelo procariótico *Escherichia coli*. Esse organismo foi inicialmente escolhido em decorrência do conhecimento aprofundado sobre o seu metabolismo, além de já haver sido utilizado anteriormente de forma bem sucedida para procedimentos de clonagem. Além disso, esse modelo oferece diversas rotas alternativas para a expressão de proteínas (MERGULHÃO *et al.*, 2005; CHOI & LEE, 2005), algumas das quais já foram utilizadas a produção recombinante de lectinas (tabela 3). Para a expressão de proteínas recombinantes, é necessário inicialmente subclonar o cDNA de interesse em um plasmídeo específico para a expressão, o qual estará sob o controle de um forte promotor induzível. Um dos sistemas de expressão mais populares é o pET, que engloba um família de plasmídeos detentores do promotor T7. Esse promotor normalmente não é reconhecido pela RNA polimerase da *E.coli*, sendo necessária para a expressão do gene sob o seu controle a presença de uma RNA polimerase adequada. Uma vez subclonado, o plasmídeo é transferido para uma cepa apropriada de *E.coli* (geralmente BL21), desenvolvida para a expressão recombinante, a qual contém uma cópia cromossômica do gene para a T7 RNA polimerase sob o controle do promotor *lac*. Dessa,

forma, a produção da T7 RNA polimerase pode ser promovida pelo acréscimo do indutor isopropil- β -tiogalactosidase (IPTG), promovendo altos níveis de expressão da lectina recombinante (SØRENSEN & MORTENSEN, 2005a).

Um problema comum durante a expressão recombinante de proteínas é a formação dos chamados “corpos de inclusão”. Esses corpos consistem em agregados insolúveis que se formam no citoplasma bacteriano quando é detectada a presença de altos níveis de proteínas potencialmente tóxicas, exógenas ou inativas. Isso acaba por diminuir substancialmente a quantidade solúvel de proteína recombinante. Entretanto, esses agregados podem ser solubilizados (após a extração protéica) por meio de agentes desnaturantes (tampões contendo uréia 8M ou cloridrato de guanidina 7M), porém, é necessário submeter posteriormente a lectina a um processo de “refolding” (renaturação). Tal processo é realizado mediante a remoção progressiva do agente desnaturante mediante ultracentrifugação ou sucessivas diálises. Frequentemente mais de 90% das lectinas formam corpos de inclusão, o que pode ser utilizado como uma forma prática de purificação, uma vez que a maior parte desses agregados é constituída por um único tipo de proteína (SØRENSEN & MORTENSEN, 2005b).

O passo final no processo de purificação consiste geralmente em cromatografias de afinidade seguidas por diálise ou cromatografias de exclusão molecular. Entretanto, uma das estratégias para facilitar esse processo consiste na expressão de proteínas de fusão. Para isso, o gene para lectina é ligado ao gene de outro peptídeo ou proteína (já presente no plasmídeo de expressão) que apresente propriedades de interesse. Dentre esses parceiros podemos citar a tioredoxina, capaz de conferir uma maior solubilidade a proteína que se deseja expressar; ou uma cauda de histidina (seis resíduos de histidina fusionados a um dos terminais da lectina). Essa cauda de histidina é capaz de formar interações reversíveis com metais de transição immobilizados (Co^{2+} ou Ni^{2+}), possibilitando a purificação da proteína de interesse em um único passo cromatográfico (SØRENSEN & MORTENSEN, 2005a). No caso da coluna de níquel (HisTrap), os sítios livres na esfera de interação do metal interagem com os anéis imidazol na cauda de histidina da proteína recombinante (figura 7).

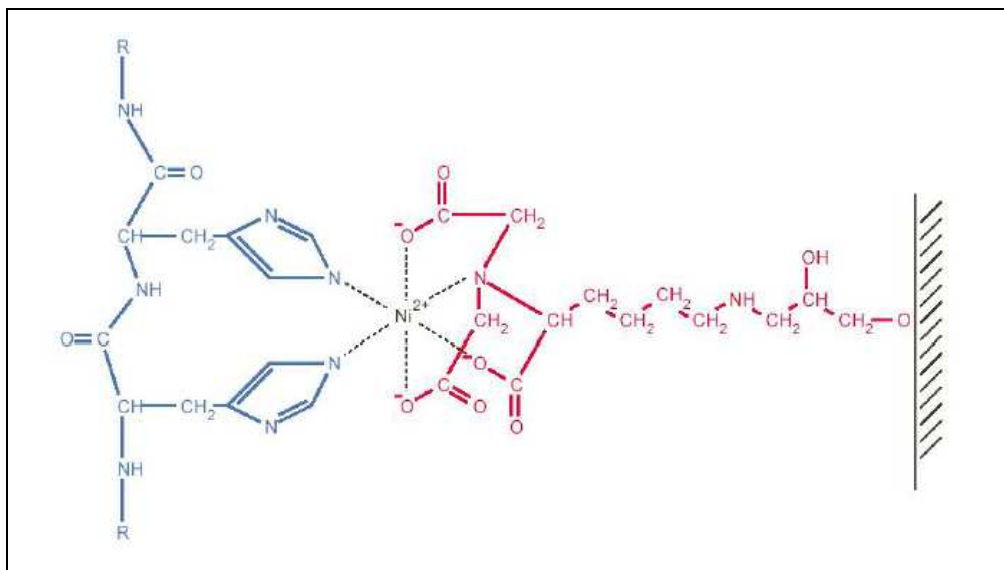


Figura 07. Interação entre resíduos vizinhos da cauda de histidina (His-tag) e a matriz contendo níquel imobilizado (Histrap) (CARUSO, 2007).

3.6. Aplicações Biotecnológicas das Lectinas

A análise do potencial biotecnológico das lectinas tem despertado a atenção de diversos grupos de pesquisa em virtude de sua grande aplicabilidade como ferramentas biológicas. A capacidade de reconhecer especificamente um amplo espectro de carboidratos, aliado a facilidade de purificação, são características que corroboram para esse interesse crescente. Dentre suas aplicações, as lectinas podem ser utilizadas para o isolamento de glicoconjugados através de cromatografias de afinidade por meio da imobilização dessas moléculas em suportes insolúveis (SANTOS FILHO, 2001). Entretanto, não apenas a purificação, mas a caracterização desses glicoconjugados também pode ser auxiliada. Microarranjos de lectinas têm se mostrado ferramentas valiosas para uma determinação prática do conteúdo glicídico de amostras, facilitando a análise de proteínas glicosiladas e de superfícies celulares (YUE & HAAB, 2009).

Estudos sobre a proliferação de linfócitos ou de mecanismos relativos a apoptose se fazem valer de lectinas dotadas de atividade mitogênica, como a lectina de *Cratylia mollis* (MACIEL *et al.*, 2004), capazes de alterar o estado quiescente dessas células, induzindo a sua multiplicação. Já na histoquímica, lectinas com diferentes especificidades de ligação a carboidratos são ferramentas úteis para investigar mudanças na glicosilação e expressão de glicoconjugados que podem ocorrer no crescimento e progressão de câncer, doenças

metabólicas e outras condições patológicas (SHARON & LIS, 2004). A aplicabilidade dessas moléculas estende-se ainda ao diagnóstico clínico, podendo ser empregadas como marcadores para a detecção de transformações celulares malignas. Como exemplo podemos citar as lectinas de *Vicia vilosa*, que reconhece especificamente o antígeno Tn (N-acetil-galactosamina Ser/Thr) (MEDEIROS *et al.*, 2000), e a lectina de *Sauromatum venosum*, que reconhece N-acetil-lactosamina (SINGH *et al.*, 2005), ambos específicos de carcinomas. Da mesma forma, são utilizadas para distinguir o câncer de próstata e a hiperplasia benigna neste órgão (BASU *et al.*, 2003), bem como para detecção de modificações celulares em vários tecidos (KUNSTFELD & PETZELBAUER, 2001).

Diversas lectinas podem ainda apresentar aplicações terapêuticas, podendo ser utilizadas no combate de diferentes patógenos. A lectina isolada da alga vermelha *Solieria filiformis* foi eficiente ao inibir o crescimento das bactérias gram-negativas *Serratia marcescens*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus* sp e *Pseudomonas aeruginosa* (HOLANDA *et al.* 2005). Lectinas específicas de manose obtidas de monocotiledôneas apresentam ainda atividade antiretroviral, podendo ser utilizadas no combate a síndrome da imunodeficiência adquirida em humanos (AIDS) (BALZARINI *et al.*, 1991). Isso se deve ao fato dessas lectinas ligarem-se a glicoproteína da cápsula viral relacionada ao reconhecimento e adesão a linfócitos, gp120, impedindo a invasão dessas células (BALZARINI *et al.*, 1992).

Devido ao fato de algumas lectinas possuírem a habilidade para mediar mucoadesão, citoadesão e a citoinvasão de drogas (GABOR *et al.*, 2004), essas moléculas têm sido exploradas quanto à sua utilização em sistemas de liberação de drogas. Lectina de folhas de *Bauhinia monandra* e a lectina de *Lens culinaris* foram incorporadas e também adsorvidas na superfície de nanopartículas, mostrando ser potenciais ferramentas para a utilização em medicamentos de administração oral com liberação controlada (RODRIGUES *et al.*, 2003).

Grandes culturas ao redor do globo sofrem com o ataque de organismos patógenos e predadores, que acabam por causar grandes perdas na produção agrícola. Plantas geneticamente modificadas para a expressão de lectinas com atividade tóxica ou inibitória sobre esses organismos tem se apresentado resistentes e, conseqüentemente mais produtivas. A expressão constitutiva do gene para a lectina do alho (*Allium sativum*) em plantas de mostarda indiana (*Brassica juncea*) tem conferido a essa uma maior resistência contra o pulgão *Lipaphis erysimi* (DUTTA *et al.*, 2005). Da mesma forma, plantas de milho

modificadas para expressão da GNA (lectina de *Gallanthus nivalis*) mostraram-se resistentes contra o ataque do afídeo *Rhopalosiphum maidis* (WANG *et al.*, 2005). A GNA também foi utilizada para a produção de espécimes de *Arabidopsis thaliana* capazes de resistir ao ataque do nematóide *Meloidogyne incognita* (RIPOLL *et al.*, 2003).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Material Biológico

As sementes de *D.grandiflora* foram obtidas a partir de plantas adultas localizadas no Campus da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza – CE. A identificação dos espécimes foi facilitada através de consultas a exsicata referente à espécie em questão armazenada no herbário Prisco Bezerra, da Universidade Federal do Ceará. Para induzir a germinação, as sementes foram imersas em uma solução de ácido sulfúrico concentrado, permanecendo sob agitação leve por cerca de 20 minutos, sendo em seguida lavadas em água corrente por 5 minutos. As sementes tratadas foram dispostas em folhas de papel filtro umedecidas com água destilada e mantidas em câmara úmida a 25° C na ausência de luz. As primeiras plântulas foram obtidas após uma semana de incubação.

4.2. Alinhamento e Análise Estrutural de Lectinas de Leguminosas

A sequência de aminoácidos da pro-DGL (número de acesso: CAM91962) foi deduzida com base em seu mRNA (número de acesso: AM701773.1)(NAGANO *et al.*, 2008) e comparada contra sequências de lectinas de leguminosas pela utilização do algoritmo BLASTp (ALTSCHUL *et al.*, 1990), sendo analisadas similaridades entre a sequência desse precursor e lectinas de outras tribos. As lectinas mais intimamente relacionadas (maior similaridade) foram alinhadas para a análise da conservação dos resíduos envolvidos na estruturação dos sítios de ligação a metal (cálcio e manganês) e a carboidrato. Foram selecionadas as seguintes lectinas: lectina de sementes de *Sophora japonica* (SJAbg – número de acesso: P93538), lectina de *Vaitarea macrocarpa* (VML – número de acesso: P81371) e lectina da casca de *Robinia pseudoacacia* (RPbAI – número de acesso: 1FNZ A), das tribos Sophorea, Dalbergiae e Robineae, respectivamente (todas específicas para galactose).

Adicionalmente, os resíduos envolvidos no reconhecimento específico de monossacarídeos nessas lectinas foram visualizados com o auxílio dos programas Wincoot (COWTAN & EMSLEY, 2004) e Pymol (DELANO, 2002), auxiliando na sugestão de possíveis alterações estruturais no sítio de ligação da pro-DGL. Em seguida, foi gerado um modelo tridimensional com o auxílio do programa easyMODELLER (ESWAR *et al.*, 2006),

utilizando como modelos as estruturas das lectinas da casca de *Robinia pseudoacacia*, *Pterocarpus angolensis* e *D.grandiflora* (2 PHF, 1 FNY, 1 DGL).

4.3. Extração de DNA e RNA

Para a extração do ácido desoxirribonucléico (DNA genômico) 0,5g de folhas recém expandidas foram maceradas, com o auxílio de nitrogênio líquido, até a obtenção de um pó fino. O macerado foi transferido para um tubo de 15 ml contendo 6 ml de tampão de extração pré-aquecido (Tris 100 mM pH 8,0; CTAB 2%; NaCl 1,4 M; EDTA 20 mM; 2-mercaptoetanol 0,2% v/v), o qual permaneceu em incubação por 1 hora a 60° C, sendo a reação homogeneizada a cada 10 minutos. Em seguida foram adicionados 6 ml de clorofórmio:álcool isoamílico (25:1, v/v) à mistura, que permaneceu em agitação suave por 10 minutos. Para separar as fases solúvel e insolúvel, o extrato foi centrifugado a 5.000 g durante 10 minutos a 25° C. A fase aquosa foi coletada (sobrenadante) e transferida para um novo tubo, sendo adicionados a esta 0,1 volumes de acetato de amônio 3 M pH 5,0, e 0,6 volumes de isopropanol. A reação foi então centrifugada a 10.000 g durante 20 minutos a 4° C. O precipitado foi lavado com 1 ml de etanol 70% e centrifugado como anteriormente. Por fim, o pelete obtido foi solubilizado em volume adequado (30-50 µl) de tampão TE (Tris 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM) e armazenado a 4° C.

O ácido ribonucléico total (RNA) foi obtido pela utilização do kit Concern Plant RNA Reagent, seguindo-se as instruções do fabricante. Para isso, 0,1 g de plântulas de 15 dias de *D.grandiflora* foram maceradas em nitrogênio líquido, sendo o polvilho transferido para um tubo de 1,5 mL contendo 0,5 mL do reagente Concern Plant. A extração do RNA foi realizada mediante agitação em vortex seguida de incubação por 5 minutos a temperatura ambiente e centrifugação a 15.000 g por 2 minutos a mesma temperatura. Foram adicionados ao sobrenadante 0,1 mL de NaCl 0,5 M e 0,3 mL de clorofórmio, seguido de centrifugação a 12.000 g a 4° C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e misturada a um mesmo volume de isopropanol, permanecendo em incubação a temperatura ambiente por 10 minutos. Após centrifugação sob as mesmas condições anteriores o pelete foi lavado com 1 ml de etanol 70%, feito com água tratada com DEPC (dietil-pirocarbonato 0,01% v/v), sendo novamente centrifugado. O sobrenadante foi então cuidadosamente removido, e o precipitado

de RNA foi resolubilizado num volume adequado (10-30 µl) de água tratada com DEPC e armazenado a -80° C.

As amostras obtidas foram analisadas mediante eletroforese em gel de agarose (0,8% m/v) (SAMBROOK *et al.*, 1989) e através da medida da absorbância (1 unidade de absorbância a 260 nm corresponde a 50 µg de DNA cadeia dupla e 40 µg de RNA) (MURRAY & THOMPSON, 1980).

4.4. Síntese do cDNA

A síntese do DNA complementar (cDNA) se deu mediante uma reação de RT-PCR (Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reation). A reação consistiu em 12 µl de água tratada com DEPC (0,01% v/v), 0,1 µg do oligonucleotídeo Qt (5'-CCA GTC AGC AGA GTG ACG AGG ACT CGA GCT CAA GCT T₁₆-3') e 1µg de RNA total. Inicialmente a reação foi aquecida a 70° C por 10 minutos para a desnaturação de qualquer estrutura secundária de RNA, sendo em seguida resfriada em banho de gelo por 5 minutos. Procedeu-se então a adição de 4 µl de tampão 5X (first strand Promega), 2 µl de DTT 0,1 M, 1 µl de inibidor de ribonuclease (RNAsin 40 µg/µl, Promega), 1µl de DNTP (1mM de cada um) e 200 unidades de transcriptase reversa (MMLV – Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) (RNase H Minus, Promega). O volume final foi ajustado para 20µl, sendo então a reação incubada a 42° C durante 1 hora, seguida de incubação a 50° C por 10 minutos para inativar a enzima.

4.5. Clonagem do precursor da lectina de sementes de *Dioclea grandiflora*

Para a amplificação do gene do precursor da lectina de *D.grandiflora* foram utilizados iniciadores específicos desenhados com base nos dados obtidos por Nagano *et al.*, 2008. O oligonucleotídeo 5'-GCCATGGAATAGCAGATGAAAAT-3', correspondente à sequência inicial de 6 aminoácidos do precursor (SIADEN) acrescido de um sítio de restrição para a enzima *NcoI* (sublinhado), foi utilizado como iniciador direto, já o iniciador reverso (5'AAGCGGCCGC*TCATCGTCTTTAACTTAGAAG*-3') foi desenhado com base na

sequência final de 6 aminoácidos (SKLKTN) acrescida de um códon de parada de transcrição e de um sítio de restrição para a enzima *NotI*. Na reação de amplificação utilizou-se 1:10 do volume total da reação de RT-PCR, 10µM dos iniciadores direto e reverso, 1 unidade de *Platinum Taq* Polimerase e 10 mM de dNTPs. O protocolo de amplificação consistiu nas seguintes etapas: desnaturação do DNA a 94° C durante 4 minutos, seguido de 30 ciclos de amplificação (94° C durante 0,5 minutos, 50° C durante 0,5 minutos e 72° C durante 0,5 minutos) e um ciclo de extensão a 72° C durante 10 minutos. Os fragmentos amplificados foram separados mediante eletroforese em gel de agarose (2% m/v), purificados através do kit Perfect Prep Gel Clean Up (Eppendorf) e anelados ao plasmídeo pCR[®]2.1-TOPO (pTOPO) (Invitrogen) (figura 8). O plasmídeo contendo gene para a r-pro-DGL foi utilizado para transformar células de *E.coli*, linhagem DH5α, mediante eletroporação em um eletroporador Eppendorf modelo 2510. Os clones positivos, selecionados mediante crescimento em meio LB (Luria Bertani) contendo ampicilina (100 µg/ml), foram confirmados mediante PCR utilizando-se iniciadores específicos para o precursor da lectina de *D.grandiflora*. O plasmídeo recombinante foi extraído mediante Perfect Prep Mini (Eppendorf) e seqüenciado (sequenciador Applied Biosystems modelo 377 DNA) para comprovar a direção correta do inserto.

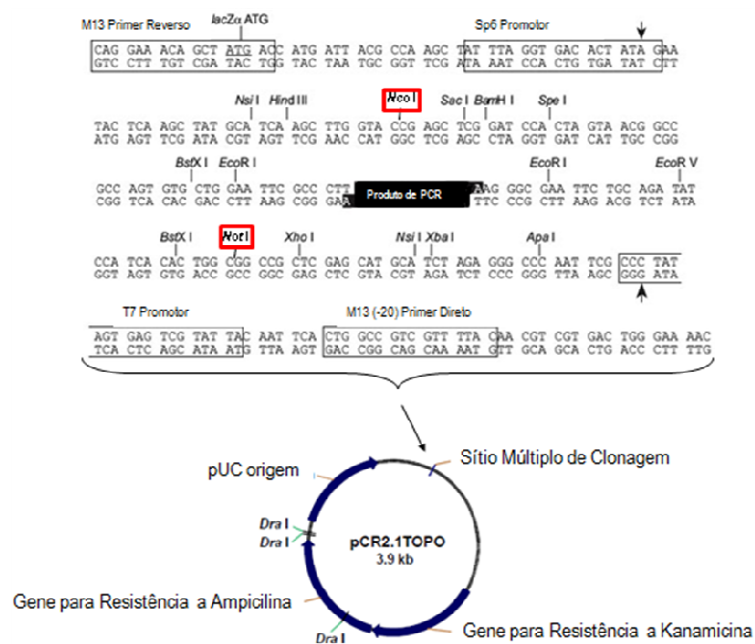


Figura 08. Mapa do plasmídeo de clonagem pTOPO.

4.6. Construção do Vetor de Expressão

Para a expressão da proteína recombinante foi escolhido o vetor pET32a (Invitrogen) (figura 9), selecionado com base nos ótimos resultados obtidos anteriormente na produção de lectinas recombinantes de Diocleinae (NAGANO *et al.*, 2008). Esse sistema de expressão origina uma proteína de fusão formada pela proteína alvo acrescida de uma cauda de histina (histag – 6 X histidina) e da proteína tioredoxina.

O DNA plasmidial foi obtido a partir de clones positivos de *E.coli*, crescidos em meio LB contendo 100µg/ml de ampicilina, utilizando-se o kit Perfect Prep Mini (Invitrogen). Inicialmente, o plasmídeo recombinante pTOPO::pro-DGL e o vetor de expressão pET32a foram ambos digeridos com as enzimas *NcoI* e *NotI* durante 12 horas a 37° C. Em seguida os produtos da digestão foram separados em gel de agarose 1,5%, sendo purificados apenas os fragmentos correspondentes ao inserto de interesse (r-pro-DGL) e ao vetor pET32a (com base nos seus respectivos pesos moleculares) por meio do kit Eppendorf Perfect Pre Gel Clean. Tais fragmentos foram então ligados com o auxílio da enzima T4-DNA ligase (Invitrogen) em uma reação a 13° C overnight, sendo em seguida utilizados para transformar por eletroporação células competentes de *E.coli* BL21 (DE3) para a posterior expressão da proteína de fusão.

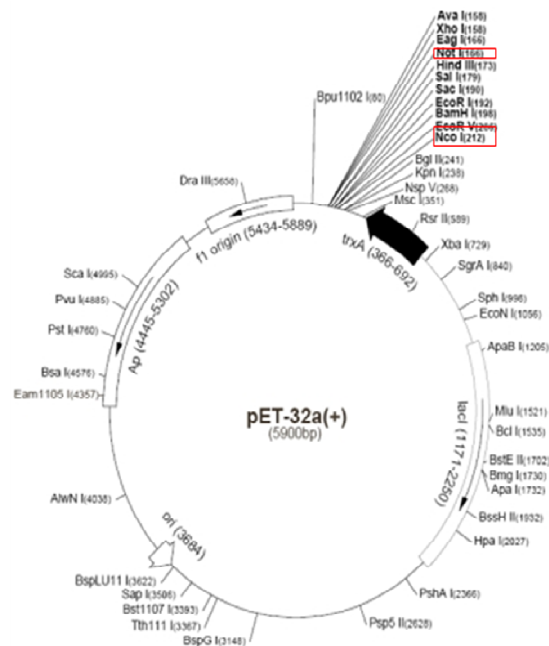


Figura 09. Mapa do plasmídeo de expressão pET32a. Os sítios para as enzimas de restrição utilizadas encontram-se assinalados.

4.7. Expressão Recombinante

Clones positivos de *E.coli* BL21 (DE3) transformados com o plasmídeo pET32a contendo a seqüência para a r-pro-DGL foram confirmados por PCR utilizando-se iniciadores específicos para o precursor da lectina de sementes de *D.grandiflora* (NAGANO *et al*, 2008). Posteriormente foi realizada uma análise de expressão, mediante SDS-PAGE (LAEMMILI, 1970) dos lisados celulares, para a escolha do melhor clone para indução. As bactérias transformadas foram cultivadas em meio LB (contendo 100 µg/ml de ampicilina) a 37° C sob agitação até ser atingida uma OD₆₀₀ entre 0,6-0,8, quando então foi adicionado ao meio o indutor isopropil-β-tiogalactosidase (IPTG) a uma concentração de 1 mM, permanecendo a cultura em incubação a 14° C por 24 horas. Posteriormente as células foram sedimentadas por centrifugação a 4000 g durante 10 minutos a 4° C, sendo em seguida ressuspensas em tampão PBS (fosfato de sódio 20 mM e cloreto de sódio 250 mM, pH 7,4) e lisadas por sonicação em banho de gelo, utilizando-se para isso pulsos de 50W por 20 segundos, durante 15 ciclos (40 segundos de intervalo entre cada ciclo) em um sonicador Bandelin *Sonopuls* HD2070. A separação das frações solúvel e insolúvel foi realizada mediante centrifugação a 12000g por 30 minutos a 4° C. O sobrenadante foi coletado (fração solúvel) e o sedimento (fração insolúvel) solubilizado em tampão PBS (pH 7,4) contendo uréia 8 M. Procedeu-se então a análise das frações por SDS-PAGE. Após as avaliações iniciais foram feitas induções maiores (como descrito anteriormente) para purificação em larga escala.

4.8. Purificação

A proteína de fusão (r-DGL-tioredoxina-His₆) expressa pelo plasmídeo pET32a foi purificada a partir dos lisados celulares dos clones positivos de *E.coli* BL21 (DE3) através de cromatografia de afinidade em coluna de níquel imobilizado (His-trap Crude FF 5ml) em um sistema Äkta Basic (Amersham Biosciences). A coluna foi previamente equilibrada com tampão PBS pH 7,4 contendo imidazol 10 mM (tampão de equilíbrio). As frações protéicas (solúvel e insolúvel) foram então filtradas (membrana com poro de 0,45 µm) e aplicadas a um fluxo constante de 1ml/minuto. Em seguida a coluna foi lavada com cinco volumes de tampão de equilíbrio e eluída com um gradiente linear de imidazol 0-500 mM durante a 15 minutos a um fluxo de 2ml/minuto (os tampões utilizados na cromatografia da fração insolúvel foram

acrescidos de uréia 8 M). O pico retido na coluna Histrap a partir da fração insolúvel foi subsequentemente submetido a um processo de *refolding*, aonde a uréia foi sendo progressivamente retirada mediante diálise, permitindo as proteínas assumir lentamente uma conformação adequada e permanecer em solução. Em seguida, a fração contendo a proteína de fusão foi dialisada contra tampão Tris-HCl 50 mM e NaCl 150 mM pH 8,0 e submetida a duas reações de digestão para a remoção da cauda de fusão. A primeira delas envolveu a enzima trombina e resultou na remoção parcial da porção tioredoxina-His₆ fusionada a r-pro-DGL. A digestão foi realizada a 20° C durante 16 horas, utilizando-se 0,2 unidades de enzima por miligrama de proteína. Para a remoção do restante da cauda foi utilizada a enzima enteroquinase. Desta vez a reação ocorreu durante 18 horas a 20° C, sendo utilizadas cinco unidades da enzima para cada miligrama da proteína de fusão. Essa sequência de digestões foi adotada com o intuito de aperfeiçoar a remoção da cauda de fusão.

Após cada passo de digestão a proteína recombinante foi isolada do restante da reação (enzimas e fragmentos da cauda de fusão) por cromatografia de afinidade em Sepharose-manose. A coluna foi previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM e NaCl 150 mM, pH 8,0 contendo CaCl₂ 2 mM e MnCl₂ 2 mM (tampão de equilíbrio), e subsequentemente eluída (após a absorbância a 280 nm haver atingido linha de base) com esse mesmo tampão adicionado de manose 100 mM. A fração retida, contendo a r-pro-DGL purificada, foi dialisada exaustivamente contra Tris 50 mM e NaCl 150 mM pH 8,0, para a remoção do açúcar, e concentrada por meio de filtros Amicon (Millipore) com poros de 10 kDa até uma concentração de 1 mg/ml. A partir dessa solução de proteína foram realizados ensaios de hemaglutinação e inibição, assim como análises por SDS-PAGE e espectrometria de massas.

4.9. Detecção da Atividade Hemaglutinante

Os testes para detecção de atividade hemaglutinante nas diferentes etapas de purificação foram realizados em placas de microtitulação, a partir de uma adaptação ao protocolo descrito por Moreira e Perrone (1967) como descrito a seguir:

As amostras, em duplas seriadas, foram diluídas (1:2, 1:4, 1:8...) em Tris-HCl 0,1 mol/L pH 7,6 contendo NaCl 0,15 mol/L. A 100 µL de cada diluição adicionou-se 100 µL de

uma suspensão de hemácias de coelho, normais ou tratadas com enzimas proteolíticas (papaína ou tripsina) a 2% em NaCl 0,15 mol/L. O ensaio foi incubado a 37°C por 30 minutos e, após esse período, deixado em repouso à temperatura ambiente por mais 30 minutos. A presença ou não de hemaglutinação foi então detectada macroscopicamente a olho nu.

Os títulos de hemaglutinação foram medidos em termos de Unidade Hemaglutinante (U.H.) como sendo o inverso da maior diluição ainda capaz de apresentar hemaglutinação visível.

4.9.1. Cálculo da Atividade Hemaglutinante Específica

Após a obtenção do título de hemaglutinação e da concentração de proteínas solúveis, a atividade específica foi calculada, com o objetivo de se monitorar as possíveis modificações na atividade da lectina em estudo.

O cálculo foi feito pela divisão do título de hemaglutinação (UH/mL) pela dosagem de proteínas solúveis (mgP/mL), cujo quociente foi expresso em UH/mgP (unidades de hemaglutinação por miligrama de proteína). Esses resultados poderão ser comparados, levando à escolha da melhor condição / fração purificadora ou concentradora da atividade hemaglutinante.

4.9.2. Especificidade por Carboidratos

A especificidade por carboidratos da pro-lectina recombinante de sementes de *D. grandiflora* foi determinada através de ensaios de inibição da atividade hemaglutinante por açúcares simples, os quais foram realizados segundo protocolo adaptado a partir daquele descrito por Ramos *et al.*, (1996).

Para tal propósito, 50 µL de soluções estoques, a uma concentração de 0,1 mol/L de cada carboidrato, foram diluídos serialmente em Tris-HCl 0,1 mol/L pH 7,6 contendo NaCl 0,15 mol/L. Em seguida, foi adicionada a cada tubo 50 µL de uma solução de lectina em uma concentração capaz de provocar uma aglutinação de 4 U.H. O ensaio foi então incubado a 37°C por 30 minutos, e, após isso, mantido em repouso à temperatura ambiente por mais

trinta minutos. Após este período, foram acrescentados 100 μL de uma suspensão a 2% de eritrócitos de coelho tripsinizados a todos os tubos do ensaio. A mistura foi novamente incubada a 37°C, durante 30 minutos, e depois, deixada em repouso à temperatura ambiente por mais 30 minutos. A inibição da atividade hemaglutinante pelos açúcares foi então determinada.

Para aqueles carboidratos que se mostraram capazes de inibir a atividade hemaglutinante foi determinada a concentração mínima inibitória (MIC), a qual corresponde a maior diluição, ou a menor concentração, do açúcar em que permaneceu a ausência de atividade hemaglutinante.

4.10. Espectrometria de Massa

Inicialmente foi realizada uma eletroforese unidimensional para a separação de quaisquer contaminantes que pudessem estar presentes na solução contendo a proteína de interesse. Foram aplicados a cada poço 20 μl solução de proteína a uma concentração de 1mg/ml (aproximadamente 20 μg). As bandas foram excisadas do gel de poliacrilamida em fragmentos de 1 mm e em seguida descoradas em solução de 50mM de bicarbonato de amônio contendo 50% de acetonitrila. As bandas descoradas foram desidratadas em acetonitrila e secas em fluxo de gás nitrogênio. O gel foi então reidratado com uma solução bicarbonato de amônio 50mM contendo tripsina (Promega) na proporção de 1:25 (enzima:proteína) e submetida a digestão a 37°C por 4h. Os peptídeos foram em seguida extraídos por agitação dos fragmentos de gel em solução de acetonitrila 50% com ácido fórmico 5%, sendo posteriormente concentrados em speedvac (Labconco). Os peptídeos produzidos foram isolados através de uma nanocoluna de fase reversa C18 (Waters nanoACQUITY UPLC BEH130 100mm x 75 μm , 1,7 μm tamanho de partícula) equilibrada com ácido fórmico 0,1%. A separação foi realizada com fluxo de 0,2 $\mu\text{L}/\text{min}$ em gradiente linear de 0-80% de acetonitrila em ácido fórmico 0,1% em 60 minutos. A cromatografia foi conectada a uma fonte nano eletrospray de um espectrômetro de massas híbrido quadrupolo/Mobilidade iônica com aceleração ortogonal - Tempo de Vôo (Synapt HDMS system-Waters Corp., Milford, USA). O espectrômetro de massas operou em modo positivo, utilizando a temperatura da fonte de 80° C e a energia do capilar ajustado em 3,5kV. A calibração do espectrômetro foi realizada com os íons resultantes da fragmentação do peptídeo [Glu1]

Fibrinopeptídeo ($M+H^+=1570, 6774$) operando com uma resolução de 10.000 e uma precisão de 10 ppm em modo V. Para realização do experimento de LC-MS/MS foi utilizada a função DDA (análise direta de dados) selecionando os íons precursores duplamente ou triplamente protonados, que foram fragmentados por dissociação induzida por colisão (CID) utilizando uma rampa de energia de colisão que variou de acordo com o estado de carga e a relação massa/carga do íon precursor. Foram coletados espectros de MS/MS de m/z 50 até m/z 3000. Os cromatogramas e espectros de massa foram coletados pelo programa Masslynx® (Waters). Os espectros de MS obtidos durante a cromatografia dos peptídeos e os espectros de MS/MS gerados a partir da fragmentação dos íons precursores selecionados foram processados e analisados utilizando o programa Proteinlynx® (Waters) a partir da busca pela massa dos íons precursores (PMF) e pelo padrão de fragmentação dos mesmos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Clonagem do Gene para a r-pro-DGL

Utilizando-se os primers desenhados com base no precursor da lectina de sementes de *D.grandiflora*, obteve-se um fragmento de aproximadamente 850 pb, tamanho adequado ao gene previamente sequenciado por Nagano *et al.* (2008). Posteriormente, o fragmento amplificado foi digerido com as enzimas *NcoI* e *NotI* (para as quais sítios de restrição haviam sido previamente adicionados por meio de PCR) o que possibilitou o anelamento subsequente do referido fragmento ao plasmídeo de clonagem pCR[®]2.1-TOPO de forma eficiente. O plasmídeo recombinante foi então utilizado para transformar células de *E.coli* DH5a mediante eletroporação. A transformação foi confirmada por PCR (figura 10) de clones positivos crescidos em LB Agar contendo 100 µg/ml de ampicilina. A correta inserção do gene foi confirmada através de sequenciamento, não havendo sido alterada a pauta de leitura nem constatada nenhum tipo de deleção.

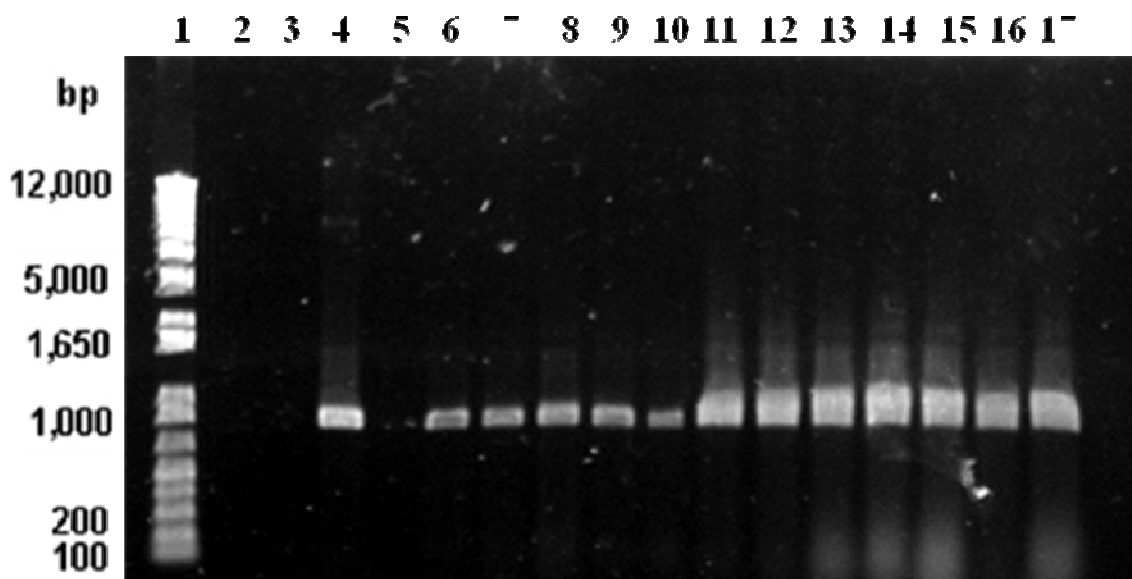


Figura 10. Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR a partir de clones positivos de *E.coli* DH5a transformados com o plasmídeo pTOPO contendo o gene para a r-pro-DGL. 1 - Marcador DNA Ladder. 3 - Controle Negativo. 4 - Controle Positivo. 6 a 17 - Clones positivos transformados com o plasmídeo pTOPO recombinante.

5.2. Expressão Recombinante e Purificação da r-pro-DGL

Após subclonar o gene para a r-pro-DGL no plasmídeo de expressão pET32a (figura 11) e de utilizar o mesmo para transformar células da linhagem de expressão *E.coli* BL21 (DE3), foi feita uma análise de expressão para a seleção do melhor clone para induções em larga escala da expressão da proteína recombinante (figura 12).

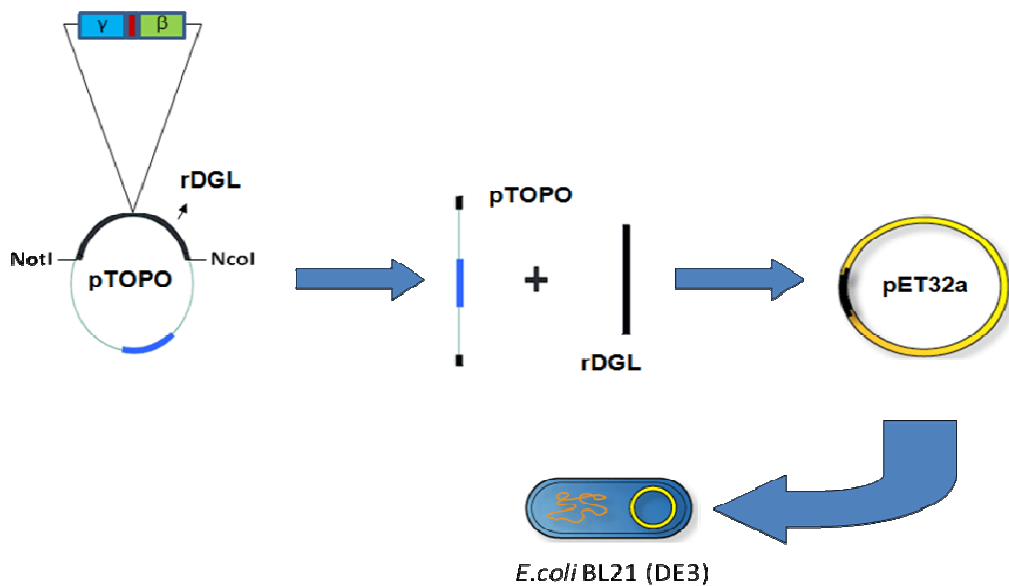


Figura 11. Subclonagem do gene para a r-pro-DGL no plasmídeo de expressão pET32a. Detalhe para os sítios de restrição para as enzimas *NotI* e *NcoI* nas extremidades 5' e 3' do gene, respectivamente.

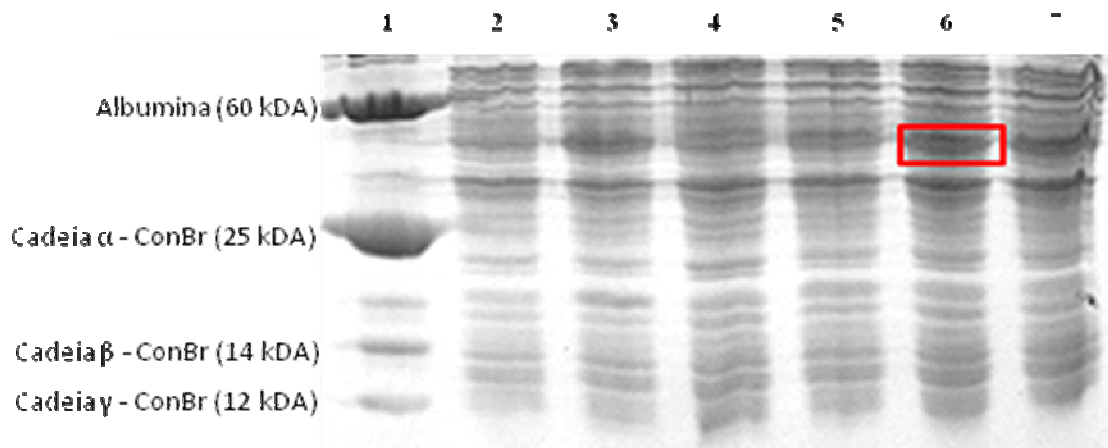


Figura 12. SDS-PAGE da análise da expressão de clones positivos de *E. coli* BL21 (DE3) transformados com o gene para a proteína de fusão r-pro-DGL-His6-tioredoxina. 1 - Marcador caseiro (albumina - 60 kDa, cadeias α - 25 kDa, β - 14 kDa e γ - 12 kDa da ConBr). 2 - Proteínas totais de células de *E. coli* BL21(DE3) não transformadas. 3 a 7 - Clones positivos induzidos com IPTG.

A expressão da r-pro-DGL foi obtida mediante indução por temperatura (14° C), sem a necessidade de adição do indutor IPTG, constatando-se sua distribuição uniforme nas frações solúvel e insolúvel (pelete). A proteína de fusão (Histag + tioredoxina + r-pro-DGL), expressa por meio do vetor pET32a, foi recuperada a partir da fração solúvel através de cromatografia em colunas contendo níquel imobilizado (Histrap) (figura 13) acopladas a HPLC (ÄKTA). A fração eluída apresentou um alto índice de agregação, não somente após a eluição, mas durante todo o processo, o que resultou na diminuição progressiva do rendimento. Tal característica pode ser atribuída à exposição de aminoácidos hidrofóbicos em decorrência da presença do peptídeo intermediário. Com o intuito de reduzir a taxa de agregação, o volume da fração eluída da coluna Histrap foi aumentado em cinco vezes com o mesmo tampão de eluição. Esse aumento permitiu uma maior proteção das cargas expostas e uma diminuição do contato entre os domínios hidrofóbicos. A amostra também foi periodicamente filtrada (entre os passos posteriores) em membrana com poros de 0,22 µm para a remoção de quaisquer agregados que viessem a ser formados.

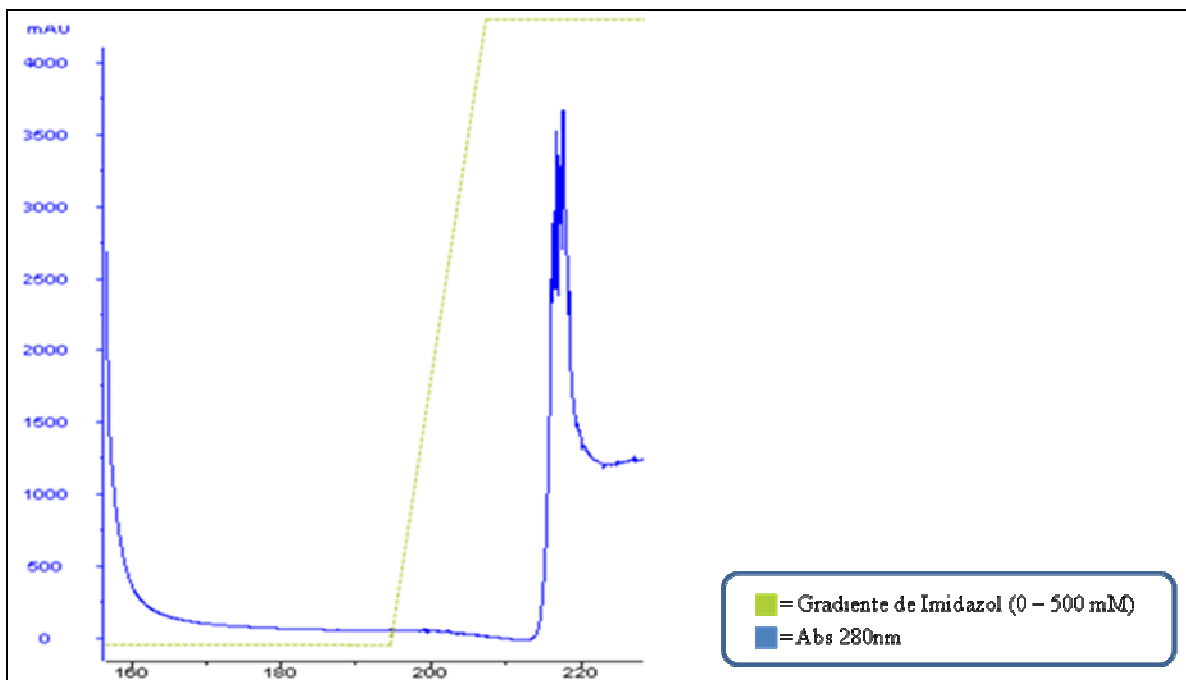


Figura 13. Cromatograma referente à aplicação da fração solúvel dos lisados de células de *E.coli* transformadas com o gene para a r-pro-DGL em coluna de níquel imobilizado (Histrap) de 5ml.

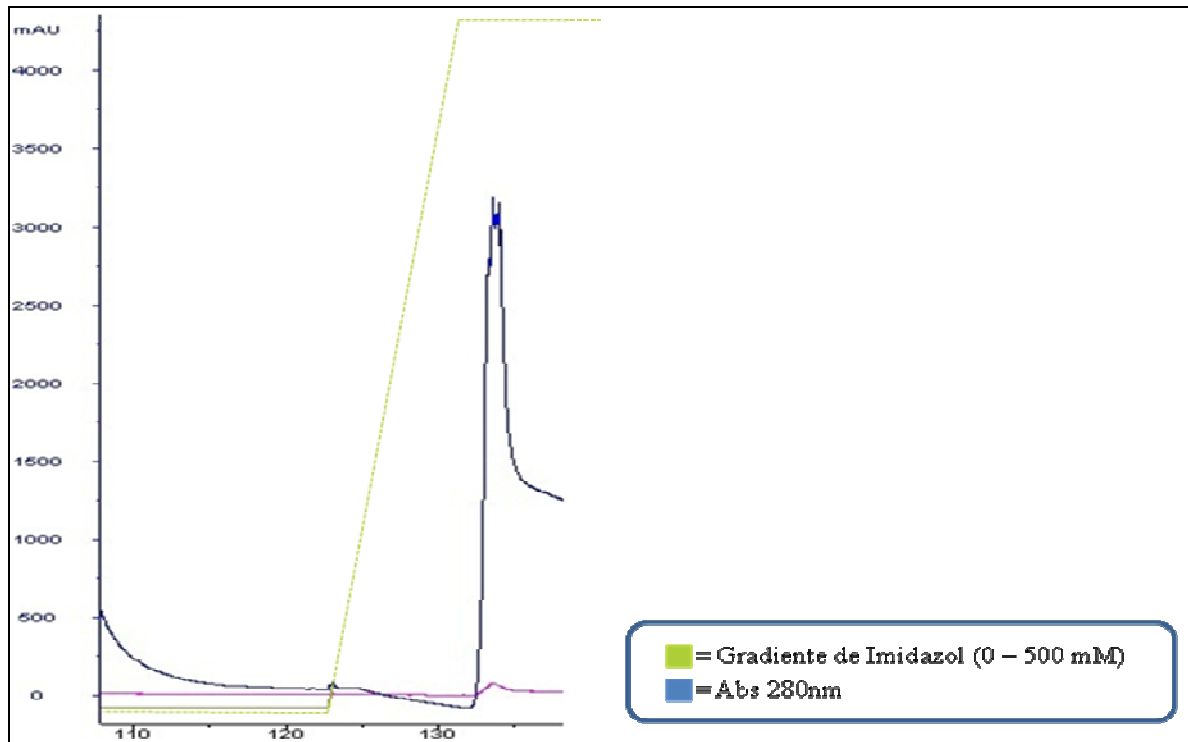


Figura 14. Cromatograma referente à aplicação da fração insolúvel dos lisados de células de *E.coli* transformadas com o gene para a r-pro-DGL (resolubilizada em tampão PBD contendo 8 M de uréia) em coluna de níquel imobilizado (Histrap) de 5ml.

A fração eluída foi subsequentemente dialisada contra o tampão Tris-HCl 50 mM e NaCl 150 mM pH 8,0 e digerida com o auxílio das enzimas trombina e enteroquinase, respectivamente, para a remoção do cauda de fusão.

Lectinas da subtribo Diocleinae são purificadas de forma clássica por meio de cromatografias em colunas de Sephadex, uma vez que apresentam afinidade por manose/glicose. Entretanto, resultados obtidos a partir dos ensaios de inibição da atividade hemaglutinante (descritos a seguir) mostraram que a lectina recombinante não apresentava afinidade por glicose, mas apenas uma baixa afinidade por manose. Dessa forma, o isolamento da r-pro-DGL durante a remoção da cauda de fusão foi realizado por meio de cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose-manose. Em decorrência do grande volume da amostra em comparação ao da coluna (60ml de amostra para 10ml de coluna), a aplicação teve de ser feita de forma cíclica com o auxílio de uma bomba peristáltica. A reaplicação da amostra gerou um perfil cromatográfico muito superior em comparação a aplicação direta (apesar de apresentar uma boa concentração protéica e uma atividade

hemaglutinante considerável.) (figuras 15 e 16), evidenciando a baixa afinidade da lectina recombinante pelo carboidrato.

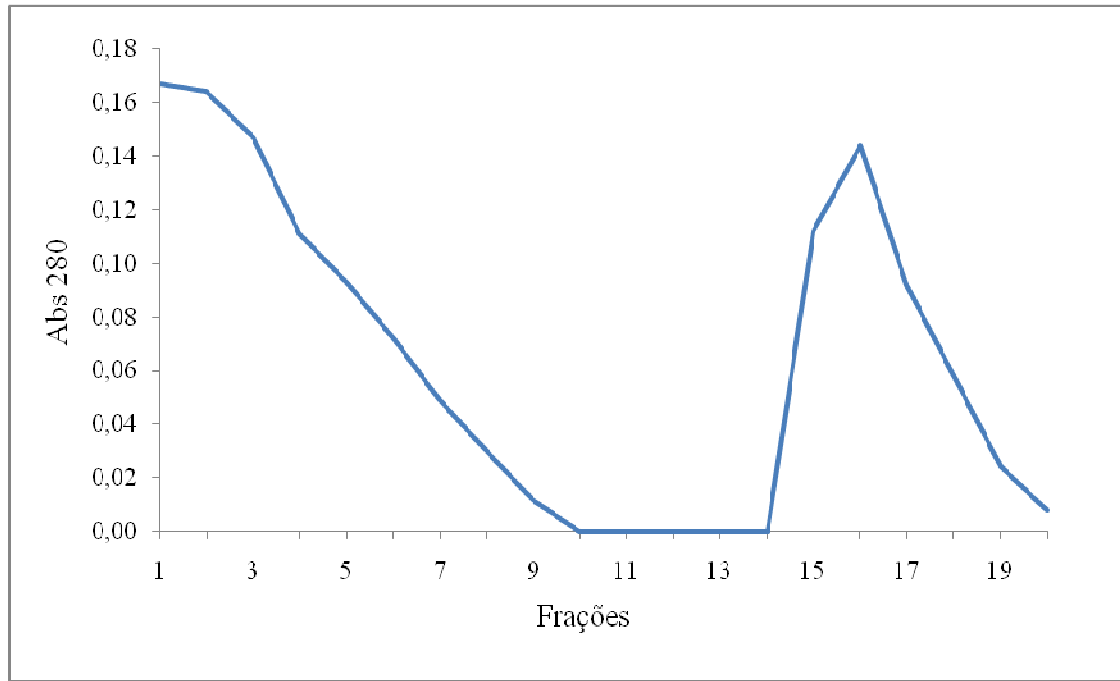


Figura 15. Perfil cromatográfico referente à aplicação direta sob fluxo contínuo da solução contendo a r-pro-DGL em coluna de Sepharose-manose.

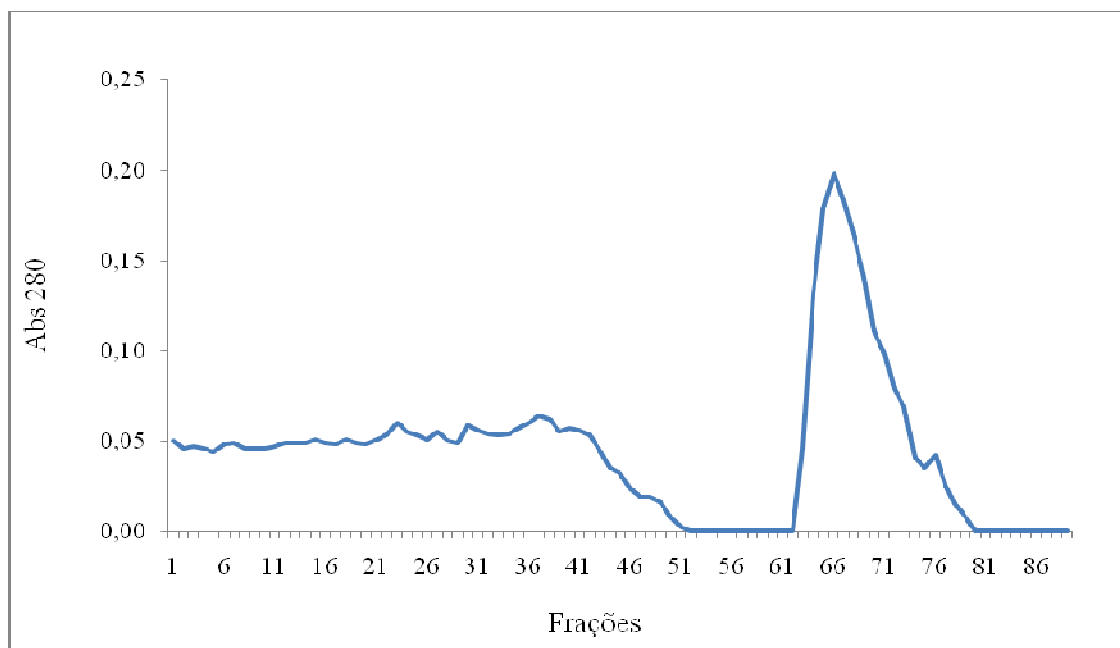


Figura 16. Perfil cromatográfico referente à aplicação cíclica da r-pro-DGL em coluna de Sepharose-manose após a remoção completa da cauda de fusão.

A utilização de forma sequencial das enzimas trombina e enteroquinase foi realizada com o intuito de promover a remoção completa da cauda de fusão. Apesar de ambas apresentarem sítios de clivagem dentro da sequência da cauda de fusão, a utilização isolada de uma delas produziria peptídeos de tamanho não satisfatório. A trombina apresenta uma alta especificidade, possuindo apenas um único sítio de clivagem dentro da sequência, entretanto, o mesmo localiza-se a 23 aminoácidos do N-terminal da sequência de interesse. Dessa forma, a digestão apenas pela trombina produz uma proteína recombinante acrescida de 23 aminoácidos, o que seria incompatível do ponto de vista científico em virtude da interferência que esse peptídeo adicional poderia causar a atividade da lectina recombinante. Em contrapartida, a enteroquinase é menos específica e apresenta dois sítios de clivagem dentro da cauda de fusão. Um deles situa-se três resíduos após o N-terminal da r-pro-DGL, enquanto o outro se localiza próximo ao N-terminal da cauda de fusão. A existência desses dois sítios causa um efeito denominado “double band” ou banda dupla, em decorrência da formação de dois fragmentos de tamanhos diferentes (LIEW *et al.*, 2005). Dessa forma, para obter um produto de tamanho adequado as enzimas foram utilizadas de forma sequencial, de modo que a digestão parcial com a trombina eliminasse o sítio de clivagem adicional da enteroquinase, permitindo que após a ação desta última fosse possível obter uma proteína recombinante livre da cauda de fusão.

A purificação da r-pro-DGL ocorreu de forma satisfatória, sendo obtida ao fim do processo uma proteína recombinante de peso molecular equivalente as pro-lectinas da subtribo Diocleinae (figura 17). O rendimento final da purificação foi de 5mg de proteína solúvel por litro de cultura induzida. Esse resultado pode ser considerado satisfatório se compararmos ao rendimento de trabalhos anteriores envolvendo a expressão de pro-lectinas de leguminosas, onde na maioria das vezes as proteínas recombinantes apresentaram um baixo rendimento ou foram expressas na forma insolúvel (tabela 3) (STREICHER & SHARON, 2003 apud NAGANO *et al.*, 2008)..

* Precusores contendo peptídeo sinal.

Tabela 3. Lectinas de leguminosas expressas e purificadas em diferentes sistemas heterólogos.

Espécie	Abreviação	Especificidade	Rendimento	Referência
<i>Bauhinia purpurea</i>	BPA	Gal	N.D.	KUSUI <i>et al.</i> , 1991
<i>Canavalia ensiformis</i>	Prepro ConA*	Man/Glc	250 g/250 ml	YAMAUCHI & MINAMIKAWA, 1990
	Prepro ConA		0,5-1 mg/l	MIN & JONES, 1992
	Pro ConA**		200 µg/ml	MIN <i>et al.</i> , 1992
	Cadeias γ e β		1-2 mg/l	MIN & JONES, 1994
	Prepro ConA		N.D.	DINCTURK <i>et al.</i> , 2001
<i>C. brasiliensis</i>	Prepro ConBr		30 mg/l	NOGUEIRA <i>et al.</i> , 2002
<i>Dolichus biflorus</i>	DBL	GalNAc	20 mg/l	CHAO <i>et al.</i> , 1994
<i>Erythrina corallodendron</i>	ECorL	Gal/GalNAc	4-7 mg/l	ARANGO <i>et al.</i> , 1992
<i>E. crystagalli</i>	ECL		200 mg/l	STANCOMBE, 2003
<i>Griffonia simplicifolia</i>	GS-II	GlcNAc	N.D.	ZHU <i>et al.</i> , 1996
<i>Phaseolus lunatus</i>	LBL	Gal/GalNAc	5 mg/l	JORDAN & GOLDSTEIN, 1994
<i>Maackia amurensis</i>	MAH	Neu5Ac2-3Gal 1-3 (Neu5Ac 2-6)GalNAc	N.D.	YIM <i>et al.</i> , 2001
<i>P. vulgaris</i>	PHA-L	Gal 1-4GlcNAc1-6 (Gal 1-4GlcNAc1-2)	0.4-1 mg/l	HOFFMAN & DONALDSON, 1987
<i>Pisum sativum</i>	PSL*	Man/Glc	2-5 mg/l	STRUBBS <i>et al.</i> , 1986;
	PSL**		20 mg/l	PRASTHOFER <i>et al.</i> , 1989
<i>Robinia pseudoacacia</i>	RBL	Gal/GalNAc	4 mg/400 ml	NISHIGUSHI <i>et al.</i> , 1997
<i>Glycine max</i>	SBA	Gal/GalNAc	100 µg/l	ADAR <i>et al.</i> , 1997
<i>Arachis hypogea</i>	PNA	Gal/GalNAc	12 µg/l	SHARMA & SUROLIA, 1994

** Precusores desprovidos de peptídeo sinal.

N.D. – Não determinado

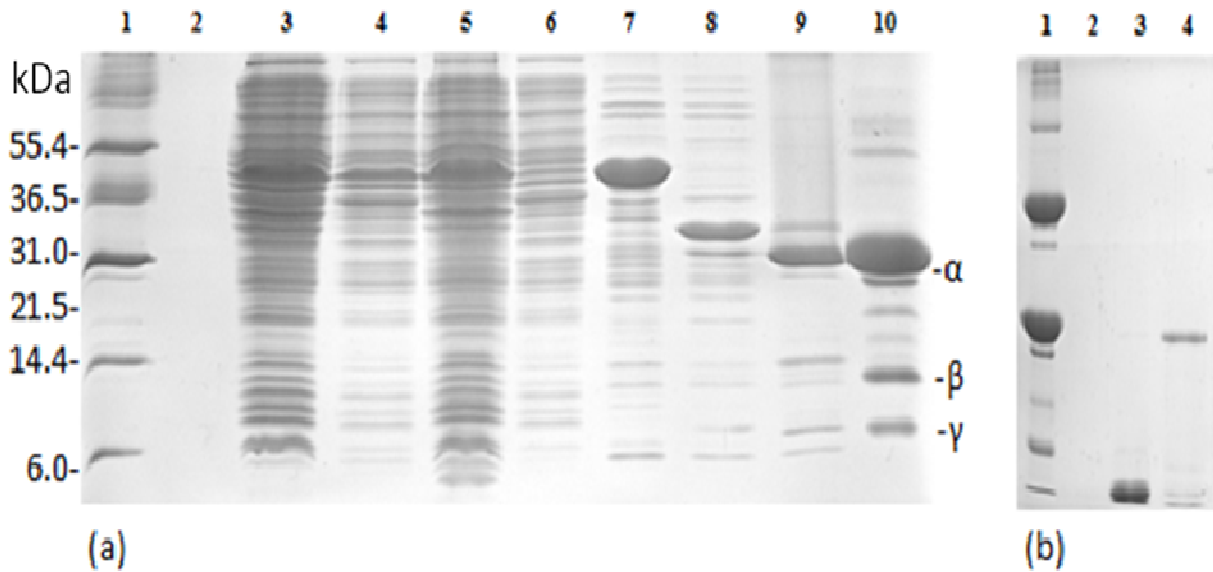


Figura 17. Passos sequenciais da purificação da r-pro-DGL. (a) 1 – Marcador (Marl 12; Invitrogen). 3 – Lisados celulares de *E.coli* BL21 (DE3) transformadas plasmídeo recombinante pET32a::r-pro-DGL-tioredoxina-Histag, 4 e 5 -100 μ g das proteínas presentes nas frações solúvel e insolúvel, respectivamente, dos lisados celulares de *E.coli* BL21 (DE3) expressando a proteína de fusão r-pro-DGL-tioredoxina-His6. 6 – Fração solúvel não-retida em cromatografia de afinidade em níquel (Histrap). 7 – Proteína de fusão r-pro-DGL-tioredoxina-His6 purificada em coluna Histrap. 8 – Produtos da digestão da proteína de fusão pela enzima trombina. 9 – Produtos da digestão pela enterokinase da proteína de fusão parcialmente digerida. 10 – ConBr madura isolada a partir de sementes, exibindo seu padrão típico de bandas: cadeia α - (25 kDa), cadeia β - (14 kDa) e cadeia γ - (12 kDa). (b) 1 – Mistura de proteínas de peso molecular conhecido (albumina e ConBr). 3 – Fração não-retida da cromatografia em Sepharose-manose após digestão com a enterokinase. 4 – R-pro-DGL purificada em cromatografia coluna de Sepharose-manose.

5.3. Ensaio de Hemaglutinação e Inibição

A funcionalidade da lectina recombinante foi analisada após cada passo de digestão através de ensaios de hemaglutinação, sendo constatado um aumento substancial na atividade da mesma após a remoção completa da cauda de fusão (tabela 4). Tal fato pode ser atribuído ao bloqueio parcial do sítio de ligação a carboidrato pela cauda, ou mesmo a alterações conformacionais causadas pela presença da mesma.

A r-pro-DGL apresentou maior atividade quando em contato com eritrócitos tratados com tripsina, sendo detectada aglutinação até uma diluição de 2^{26} (figura 18), o que confere a proteína uma atividade específica de 134.217.728.U.H/mg de proteína. Como foi dito anteriormente, não foi verificada inibição da atividade hemaglutinante por glicose, mas

apenas por altas concentrações de manose (25 mM) (figura 19). Tendo em vista a alta atividade da lectina, isso evidencia a ocorrência de modificações significativas no sítio de ligação a carboidrato, uma vez que a DGL silvestre tem sua atividade hemaglutinante inibida por concentrações de glicose e manose equivalentes a 15 mM (GUPTA *et al.*, 1996).

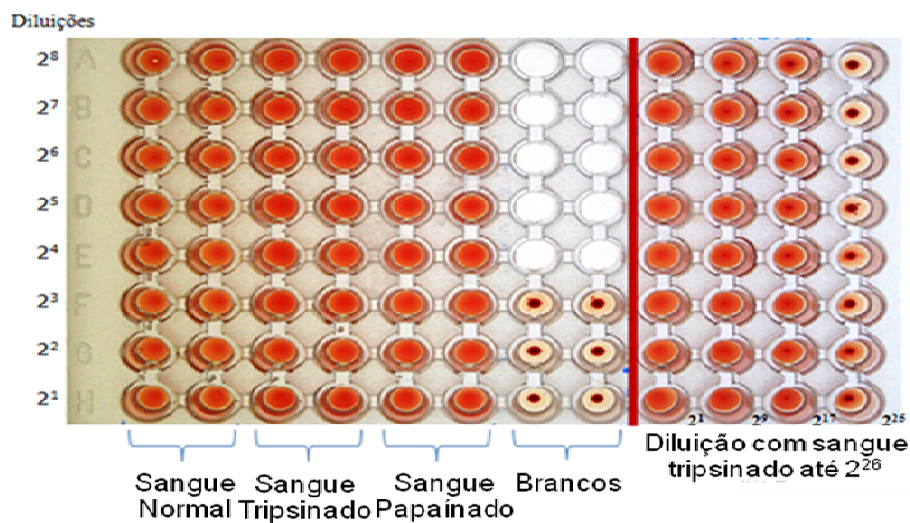
Tabela 4. Análise dos ensaios de hemaglutinação e inibição da r-pro-DGL.

Parâmetro	Cauda Parcialmente Removida	Cauda Completamente Removida
CM _A ^a Eritrócitos + Tripsina	25 µg/ml	$7,4 \times 10^{-6}$ µg/ml
CM _A ^a Eritrócitos + Papaina	25 µg/ml	1,9 µg/ml
CM _B ^b Glicose	ND	ND
CM _B ^b Manose	25 mM/ml	6,25 mM/ml
CM _B ^b Galactose	ND	ND
CM _B ^b Lactose	ND	ND

^a Concentração Mínima de r-pro-DGL (µg/ml) necessária para promover hemaglutinação (MAC).

^b Concentração mínima de açúcar necessária para inibir (µg/mM) a atividade hemaglutinante (MIC).

ND – Não detectada



Concentração: 0,5mg/ml Atividade Especifica: 134.217.728 U.H.

Figura 18. Ensaio hemaglutinante da r-pro-DGL.

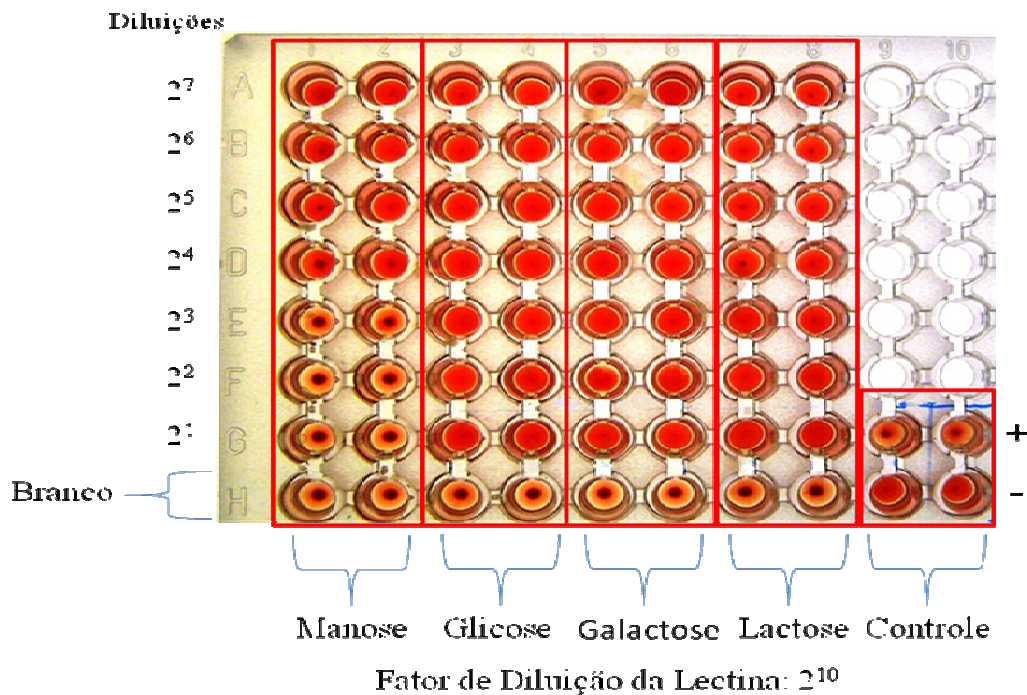


Figura 19. Ensaio de inibição da atividade hemaglutinante da r-pro-DGL pelos açúcares manose, glicose, galactose e lactose.

5.4. Determinação da Sequência Primária da r-pro-DGL por Espectrometria de Massa

A fim de identificar a identidade sequencial da proteína recombinante, foi feita uma análise por espectrometria de massas. A metodologia para determinar a sequência aminoacídica envolveu a digestão inicial da proteína com tripsina, originando peptídeos de diferentes tamanhos. Esses fragmentos foram subsequentemente fracionados por cromatografia líquida, e em seguida analisados.

Os resultados foram então comparados contra um banco de dados de sequências de lectinas de Diocleinae (contendo informações referentes aos fragmentos gerados a partir da digestão hipotética dessas proteínas por tripsina). Essa busca permitiu a detecção de uma similaridade de mais de 90%, comprovando a correta síntese da lectina recombinante (figuras 20 e 21 e tabela 5).

```

1 AMASIADENS LHFSFHKFSQ NPKDLILQGD AFTDSDGNLQ LTKVSSSGDP QGNSVGRALF 60
      |-----T1-----| |-----T2-----| |-----
61 YAPVHIWEKS AVVASFDATF TFLIKSPDRE PADGITFFIA NTDTSIPSGS GGRLGLFPD 120
      T3-----| |-----T4-----| |-----T5-----|
121 ANIVKNSTTL DFNAAYNADT IVAVELDYP NTDIGDPNYP HIGIDIKSIR SKSTARWNMQ 180
      |-----T6-----
181 TGKVGTVHIS YNSVAKRLSA VVSYSGSSST TVSYDVLNN VLPEWVRVGL SATTGLYKET 240
      --| |-----T7-----| |-----T8-----
241 NTILSWSFTS KLKTN
      -----|

```

Figura 20. Mapa peptídico da r-pro-DGL após digestão por tripsina.

```

pro-DGL      LIVVSRVSSSIADENSLHFSFHKFSQNPKDLILQGD AFTDSDGNLQLTKVSSSGDPQGNS 60
r-pro-DGL    -----AMASIADENSLHFSFHKFSQNPKDLILQGD AFTDSDGNLQLTKVSSSGDPQGNS 54
      . :*****

pro-DGL      VGRALFYAPVHIWEKS AVVASFDATFTFLIKSPDRE PADGITFFIAN TDT SIPSGSGGRL 120
r-pro-DGL    VGRALFYAPVHIWEKS AVVASFDATFTFLIKSPDRE PADGITFFIAN TDT SIPSGSGGRL 114
      *****

pro-DGL      LGLFPDANIVKNSTTLDFNAAYNADT IVAVELDYPNTDIGDPNYPHIGIDIKSIRSKST 180
r-pro-DGL    LGLFPDANIVKNSTTLDFNAAYNADT IVAVELDYPNTDIGDPNYPHIGIDIKSIRSKST 174
      *****

pro-DGL      ARWNMQTGKVGTVHISYNSVAKRLSAVVSYSGSSSTTVSYDVLNNVLPEWVRVGLSATT 240
r-pro-DGL    ARWNMQTGKVGTVHISYNSVAKRLSAVVSYSGSSSTTVSYDVLNNVLPEWVRVGLSATT 234
      *****

pro-DGL      GLYKETNTILSWSFTSKLKTN 261
r-pro-DGL    GLYKETNTILSWSFTSKLKTN 255
      *****

```

Figura 21. Alinhamento realizado pelo programa ClustalW entre as seqüências da pro-lectina silvestre de sementes de *D.grandiflora* e a pro-lectina recombinante expressa em *E.coli*.

Tabela 5. Sequências dos peptídeos trípticos da r-pro-DGL.

Peptídeo	Massa	Sequência
F1	2163.0696 Da	²⁴ DLILQGDAFT DSDGNLQLTK ⁴²
F2	1345.6119 Da	¹³ VSSSGDPQGN SVGR ⁵⁷
F3	1472.757 Da	⁸ ALFYAPVHIW EK ⁶⁹
F4	1715.8453 Da	⁰ SAVV ASFDATFTFL IK ⁸⁵
F5	2409.1353 Da	⁰ EPAD GITFFIANTD TSIPSGSGGR ¹¹³
F6	863.36957 Da	⁷⁷ W N MQTGK ¹⁸³
F7	1529.815 Da	⁸⁴ VGTVHISYNS VAK ¹⁹⁶
F8	2603.3347 Da	²⁸ VGLSATTGLYKETNTILSWSFTSK ²⁵¹

5.5. Análise das Alterações Pós-Traducionais

Comparando sequências e estruturas de lectinas pertencentes a diferentes tribos de leguminosas (figuras 21 e 22) foi possível detectar um grau considerável de similaridade, o que evidencia uma relação evolutiva íntima. Essa similaridade esta de acordo com a conservação estrutural existente entre as lectinas de leguminosas, mesmo entre as submetidas à permuta circular.

BOWLES em 1986 afirmou que tais moléculas deveriam ser consideradas como domínios únicos devido ao seu processo de enovelamento contínuo, decorrente da frequente ocorrência de fitas adjacentes constituídas por porções extensamente separadas da sequência linear de aminoácidos. Essa interpretação restringe o grau de rearranjo tridimensional dessas moléculas em consequência do processamento pós-traducional, tendo como efeito um alto grau similaridade entre proteínas as maduras e seus precursores (BOWLES *et al.*,1986).

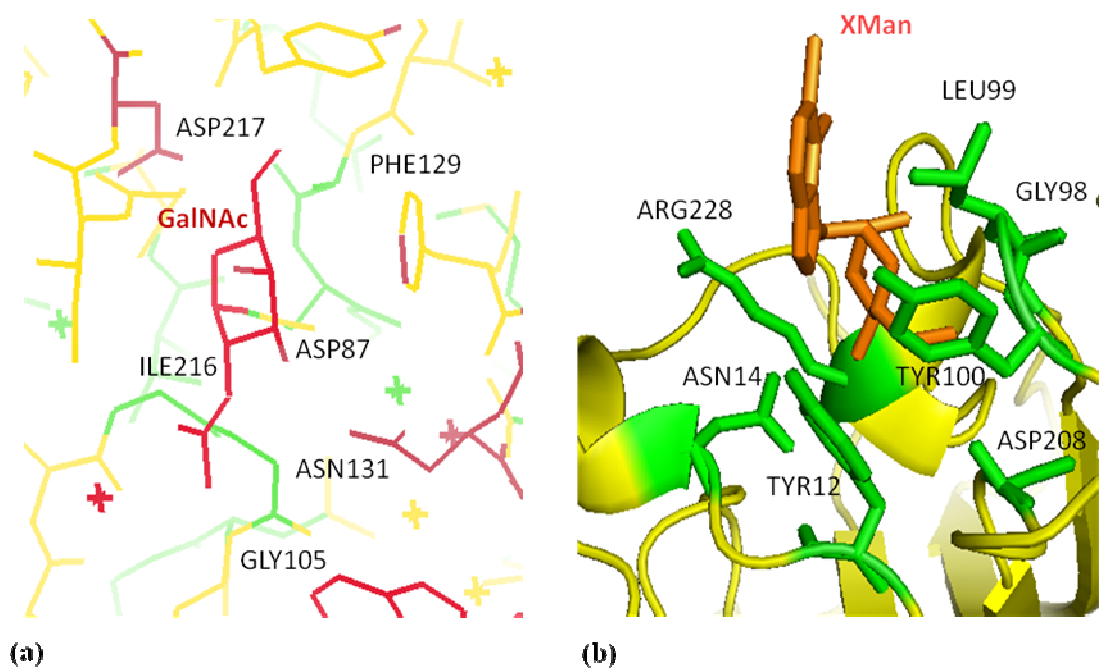


Figura 23. Estrutura tridimensional dos sítios de ligação a carboidrato das lectinas da casca de *R.pseudoacacia* (a) (numero de acesso no PDB: 1FNY) e da lectina madura (cadeia α) de sementes de *D.grandiflora* (b) (numero de acesso no PDB: 2JEC), complexadas a GalNAc e XMan, respectivamente. Resíduos envolvidos no reconhecimento específico de carboidratos: ASP87, ASP217, ILE216, GLY105, PHE129, ASN131 na RPbAI, e TYR12, ASN14, GLY98, LEU, TYR100, ASP208, ARG228 na DGL madura.

A funcionalidade dos precursores das lectinas de leguminosas tem sido tema de diversos trabalhos e discussões ao longo dos anos, restando ainda alguns aspectos a serem esclarecidos a respeito do ponto exato onde as lectinas adquirem sua capacidade de reconhecimento específico de carboidratos. Primeiramente, determinou-se que as lectinas tornavam-se ativas após a clivagem proteolítica dos precursores, o que deveria ser acompanhado por alterações conformacionais que gerariam o sítio de ligação da lectina madura (BOWLES *et al.*, 1986; CHRISPEELS, 1986). Posteriormente, outros trabalhos

passaram a relatar como sendo a deglicosilação do precursor o passo chave na aquisição da capacidade de ligação (MARCUS & BOWLES, 1988; MIN & JONES, 1992; SHELDON & BOWLES, 1992), o que logo em seguida foi provado ser insuficiente para esse fim (RAMIS *et al.*, 2001).

Trabalhos anteriores reportam como sendo a topologia do sítio de ligação o principal fator na determinação da afinidade a carboidratos, fator não relacionado apenas ao conteúdo de aminoácidos, mas também dependente do tamanho e da conformação das alças (loops) adjacentes. Apesar de apresentarem estruturas e posições relativamente conservadas, variações existentes na estrutura dessas alças podem causar impedimentos estéricos à ligação de mono ou oligossacarídeos normalmente não reconhecidos pelos sítios de ligação. Surpreendentemente, o padrão de pontes de hidrogênio estabelecido não demonstra ser um fator determinante no processo de reconhecimento (LORIS *et al.*, 1998). Van Damme *et al.* destacaram esse aspecto ao comparar lectinas de *Sophora japonica*, as quais apresentam uma alta similaridade (80%) mas possuem afinidades por diferentes carboidratos.

De acordo com esses dados podemos prever que o sítio de ligação a carboidrato da r-pro-DGL foi quase completamente reestruturado, frente à inversão de suas cadeias e em decorrência da presença do peptídeo intermediário de 15 aminoácidos. Utilizando o programa easyMODELLER foi gerado um modelo tridimensional da r-pro-DGL, utilizando como base as estruturas das lectinas de *D.grandiflora* (DGL), *Robinia pseudoacacia* e *Pterocarpus angolensis*. As lectinas de *R.pseudoacacia* e *P.angolensis* foram selecionadas com base na similaridade de sequência em relação ao precursor da DGL, apresentando ainda a mesma disposição de cadeias. O modelo gerado possibilitou analisar possíveis alterações na estrutura da lectina recombinante e em seu sítio de ligação a carboidrato (figura 23).



Figura 24. Modelo tridimensional da r-pro-DGL gerado pelo programa easyMODELLER com base nas lectinas de *D.grandiflora*, *R.pseudoacacia* e *P.angolensis*. O sítio de ligação a carboidrato (determinado com base na localização deste em outras lectinas de leguminosas) encontra-se assinalado por um círculo vermelho, e as alças envolvidas na estruturação do mesmo estão indicadas por setas. A presença do peptídeo intermediário (assinalado em laranja) induz a deformações em uma dessas alças, alterando a especificidade fina da lectina.

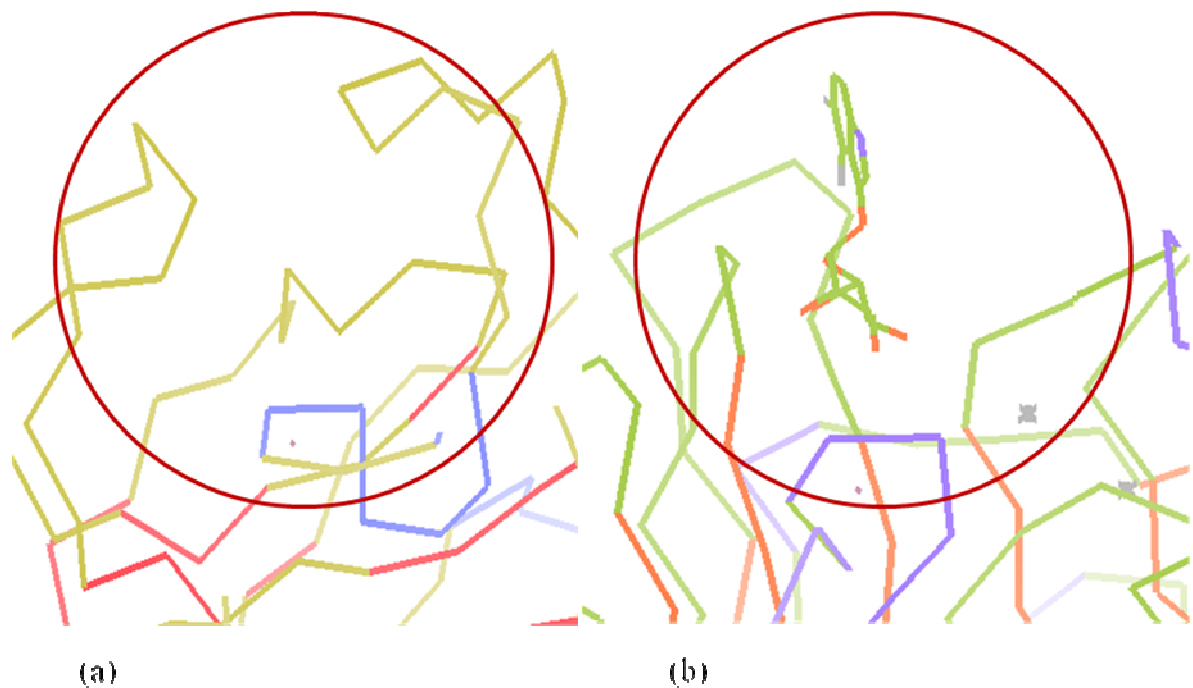


Figura 25. Possíveis alterações estruturais causadas às alças adjacentes ao sítio de ligação da r-pro-DGL (a) em comparação à DGL madura (b). A topologia do sítio de ligação da lectina silvestre apresenta-se bem diferenciada em relação a sua contraparte recombinante (assinalada por círculos vermelhos).

De acordo com o modelo gerado (figura 24), as modificações mais prováveis envolvem alterações na conformação das alças adjacentes ao sítio de ligação a carboidrato, o que é esperado, tendo em vista que o peptídeo intermediário insere-se exatamente na base de uma dessas alças, deformando-a. Tal rearranjo estaria diretamente relacionado com a alteração de especificidade apresentada pela lectina recombinante. Outro fator importante consiste na presença do próprio peptídeo intermediário. A grande tendência apresentada pelas lectinas de leguminosas em manter sua estrutura conservada (motivo “jellyroll”) faz com que esse fragmento se disponha de maneira amorfa, não constituindo estrutura secundária. Da mesma forma, alguns de seus aminoácidos hidrofóbicos acabam por se expor ao solvente, servindo como ponto de ancoragem entre os monômeros, e entre estes e outras moléculas (figura 25). Esse fato explicaria a alta taxa de agregação apresentada durante o processo de purificação, assim como a presença de contaminantes. Entretanto, essas alterações estruturais não impedem a oligomerização da pro-lectina, uma vez que apenas dímeros e tetrâmeros são capazes de estabelecer ligações cruzadas entre células, o que foi comprovado nos ensaios de atividade hemaglutinante.

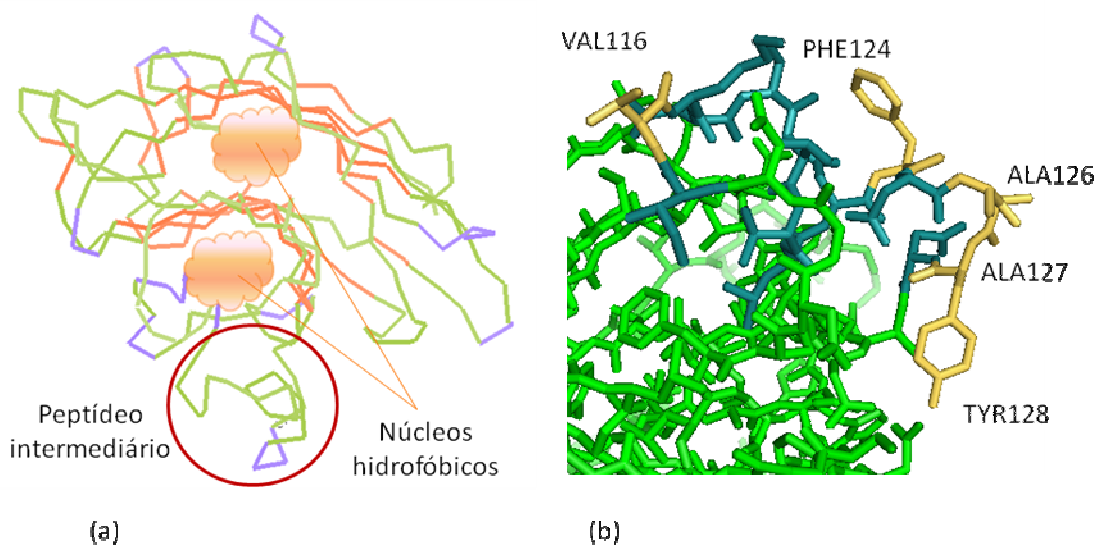


Figura 26. (a) Disposição do peptídeo intermediário no modelo gerado para a r-pro-DGL. (b) Exposição das cadeias laterais de aminoácidos hidrofóbicos (resíduos em amarelo) no peptídeo intermediário (em verde escuro).

Dessa forma, torna-se difícil prever com clareza a afinidade específica da lectina recombinante, entretanto, podemos confirmar que o processamento pós-traducional não atua de forma exclusiva na determinação dessa especificidade. Essa afirmativa é corroborada pelo

fato da pro-lectina não ter apresentado uma inversão da sua afinidade específica (de glicose/manose para galactose), mas apenas uma redução significativa na sua capacidade de ligar manose, sendo ao mesmo tempo incapaz de reconhecer especificamente glicose ou galactose.

Foi obtida de forma recombinante a expressão de uma pro-lectina de sementes de *D.grandiflora* (r-pro-DGL) com uma alta atividade (134.217.728 U.H./mg), de massa aparente (25 kDa) e sequência idênticas ao precursor natural. Diferentemente de sua contraparte silvestre a r-pro-DGL não reconheceu especificamente glicose, sendo apenas inibida por manose (C.M.I. de 15 mM), fator gerado em decorrência de possíveis alterações na estrutura do sítio de ligação a carboidrato. Entretanto, os dados obtidos sugerem também que o processamento pós-traducional peculiar da subtribo não atua de forma decisiva na determinação da afinidade específica dessas proteínas, uma vez que a r-pro-DGL não apresentou afinidade por galactose ou lactose, demonstrando ser a topologia do sítio de ligação, bem como a conformação das alças que os estruturam, os principais fatores determinantes da especificidade a monossacarídeos. Assim, pode-se afirmar que precursores de lectinas na subtribo Diocleinae apresentam-se ativos enquanto deglicosilados, não havendo necessidade de reações de transpeptidação para a estruturação do sítio de ligação a carboidrato, sendo ainda capazes de formar oligômeros e estabelecer ligações cruzadas entre membranas celulares.

3D Lectin Data Bank on World Wide Web URL:<http://www.cermav.cnrs.fr/databank/lectines>.

ADAR, R.; STREICHER, H.; ROZENBLATT, S.; SHARON, N. Synthesis of soybean agglutinin in bacterial and mammalian cells. **Eur. J. Biochem.** 249: 684–689, 1997.

AINOUZ, I. L.; MOREIRA, R. A.; CAMPOS, F. A. P.; RICHARDSON, M.; BEGBIE, R.; STEWART, J. C.; WATT, W. B. & PUSZTAI, A. The isolation and amino acid sequence of the beta and gamma subunits of the lectin from the seeds of *Dioclea grandiflora*. **Phytochemistry**. 26:435-1440, 1987.

ANDRADE, J.L; ARRUDA, S.; BARBOSA, T.; PAIM, L.; RAMOS, M.V.; CAVADA, B.S.; BARRAL-NETTO, M. Lectin-Induced Nitric Oxide Production. **Cellular Immunology**. 194, 98–102. 1999.

ARANGO, R.; ADAR, R.; ROZENBLATT, S.; SHARON, N. Expression of *Erythrina corallodendron* lectin in *Escherichia coli*. **Eur. J. Biochem.** 205: 575–581, 1992.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **J Mol Biol.** 215 (3): 403–410, 1990.

BALZARINI, J., NEYTS, J., SCHOLS, D., HOSOYA, M., VAN DAMME, E.J., PEUMANS, W.J., DE CLERCQ, E. . The mannose specific plant lectins from *Cymbidium hybrid* and *Epipactis helleborine* and the (N-acetylglucosamine)n-specific plant lectin from *Urtica dioica* are and selective inhibitors of human immunodeficiency virus and cytomegalovirus replication in vitro. **Antiviral Res.** 18(2): 191-207, 1992.

BALZARINI, J., SCHOLS, D., NEYTS, J., VAN DAMME, E.J., PEUMANS, W.J., DE CLERCQ, E. Alpha-(1-3)- and alpha-(1-6)-D-mannose-specific plant lectins are markedly inhibitory to human immunodeficiency virus and cytomegalovirus infections in vitro. **Antimicrob Angents Chemother.** 35(3): 410-416, 1991.

BANERJEE, R.; DAS, K.; RAVISHANKAR, R.; SUGUNA, K.; SUROLIA, A. Conformation, protein-carbohydrate interactions and novel subunit association in the refined peanut lectin-lactose complex. **J.Mol.Biol.** 259:281-196. 1996.

BASU, P. S.; MAJHI, R.; BATABYAL, S. K. Lectin and serum-PSA interaction as a screening test for prostate cancer. **Clinical Biochemistry** 36: 373-376, 2003.

BOUCKAERT, J.; DEWALLEF, Y.; POORTMANS, F.; WYNS, L.; LORIS, R. Structural dissection of the conformational pathways of de- and re-metallization of concanavalin A. **J. Biol. Chem.** 275: 19778-19787. 2000.

- BOUCKAERT, J.; LORIS, R.; POORTMANS, F.; WYNS, L. Crystallographic of metal-free concanavalin A at 2.5 Å resolution. **Protein Struct. Funct. Genet.** 23:510-524. 1995.
- BOWLES, D.J., MARCUS, S.E., PAPPIN, D.J.C., FINDLAY, J.B.C., ELIOPOULOS, E., MAYCOX, P.R., and BURGESS, R. Posttranslational Processing of Concanavalin A Precursors in Jackbean Cotyledons. **The Journal of Cell Biology.** 102: 1284-1297, 1986.
- BOWLES, D.J., PAPPIN, D.J. Traffic and assembly of concanavalin A. **Trends Biochem Sci.** 13(2): 60-64, 1988.
- BOYD, W.C., SHAPLEIGH, E. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). **Science.** 119: 419, 1954.
- BRANCO, A. T.; BERNABÉ, R. B.; FERREIRA, B. S.; OLIVEIRA, M. V. V.; GARCIA, A. B.; SOUZA-FILHO, G. A. Expression and purification recombinant lectin from rice (*Oryza sativa* L.). **Protein Expression & Purification** 33: 34-38, 2004.
- BREWER, C.F., DAM, T.K. Binding and cross-linking properties of galectins, **Biochim. Biophys. Acta** 1572: 255– 262, 2002.
- BREWER, C.F.; BROWN, R.D.; KOENIG, S.H. Stoichiometry of manganese and calcium ion binding to concanavalin A. **Biochemistry** 22: 3691-3702. 1983.
- BRINDA, K.V.; MITRA, N.; SUROLIA, A.; VISHVESHWARA, S. Determinants of quaternary association in legume lectins. **Protein Science.** 13: 1735-1749, 2006.
- CARRINGTON, D.M., AUFFRET, A., HANKE, D.E. Polypeptide ligation occurs during post-translational modification of concanavalin A. **Nature.** 313:64-67, 1985.
- CARUSO, C. S. Clonagem, expressão e caracterização de proteínas recombinantes de *Xylella fastidiosa*. 2007. Tese (Doutorado em Ciências, área Química Analítica). Instituto de Química de São Carlos , Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.
- CAVADA, B. S., MORENO, F. B. B., ROCHA, B. A. M. da, AZEVEDO JR, W. F. de, CASTELLÓN, R. E. R., GOERSCH, G. V., NAGANO, C. S., SOUZA, E. P. de, NASCIMENTO, K. S., RADIS-BAPTISTA, G., DELATORRE, P., LEROY, Y., TOYAMA, M. H., PINTO, V. P. T., SAMPAIO, A. H., BARETTINO, D., DEBRAY, H., CALVETE, J. J. & SANZ, L. cDNA cloning and 1.75 Å crystal structure determination of PPL2, an endochitinase and Nacetylglucosaminebinding hemagglutinin from *Parkia platycephala* seeds. **FEBS Journal.** 273: 3962–3974, 2006.

CAVADA, B. S.; SANTOS, C. F.; GRANGEIRO, T. B.; NUNES, E. P.; SALES, P. V. P.; RAMOS, R. L.; DE SOUSA, F. A. M.; CRISOSTOMO, C. V.; CALVETE, J. J. Purification and characterization of a lectin from seeds of *Vatairea macrocarpa* Duke. **Phytochemistry** 49: 675-680, 1998.

CAVADA, B.S., BARBOSA, T., GRANGEIRO, T.B., BARRAL-NETO, M. Revisiting proteus: Do minor changes in lectins matter in biological activity? Lessons from and potencial biotechnological uses of Diocleinae subtribe lectins. **Current Protein and peptide Science**. 2: 133-135, 2001.

CAVADA, B.S.; RAMOS, M.V.; CORDEIRO, E.F.; GRANGEIRO, T.B.; OLIVEIRA, J.T.A.; URANO DE CARVALHO, A.F.F.; MOREIRA, R.A. Purification and partial characterization of a lectin from dioclea virgata benth seeds. **R. Bras. Fisiol. Veg.**, 8(1):37-42. 1996.

CHAO. Q.; CASALONGUE, C., QUINN, J.M.; ETZLER, M.E. Expression and partial characterization of *Dolichos biflorus* seed lectin in *Escherichia coli*. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 313: 346-350.

CHOI, J. H.; LEE, S. Y. Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. **Appl Microbiol Biotechnol**. 64: 625–635. 2004.

CHRISPEELS, M.J., HARTL, P.M., STURMA, FAYE, L. Characterisation of the endoplasmic reticulum-associated precursor of concanavalin A. **J. Biol.Chem.** 261 (22): 10021-10024, 1986.

CLAUDE, S. D.; AGNÈS, G. M.; CATALINA, R.; NADINE, P.; MARIE-CHRISTINE, K. M.; JEAN-MARC, N.; LOÏC, F.; VÉRONIQUE, G. Targeting of proConA to the Plant Vacuole depends on its Nine Amino-acid C-terminal Propeptide. **Plant and Cell Physiology**. 46:1603-1612, 2005.

YAMAUCHI, D. & MINAMIKAWA, T. Structure of the gene encoding concanavalin A from *Canavalia gladiata* and its expression in *Escherichia coli* cells. **FEBS Lett.** 260, 127 (1990).

DAM, T.K.; OSCARSON, S.; BREWER, C.F. Thermodynamics of binding of the core trimannoside of asparagine-linked carbohydrates and deoxy analogs to *Dioclea grandiflora* lectin. **J Biol Chem**. Dec 4; 273(49):32812-7. 1998.

DOWN, R.E., GATEHOUSE, A.M.R., HAMILTON, W.D.O., GATEHOUSE, J.A. Snowdrop lectin inhibits development and decreases fecundity of the glasshouse potato aphid (*Aulacorthum solani*) when administered *in vitro* and *via* transgenic plants both in laboratory and glasshouse trials. **J Insect Physiol**. 42: 1035–45, 1996.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Chloroplast DNA phylogeny of the Papilionoid legume tribe Phaseoleae. **Syst. Bot.** **18**, 309–327, 1993.

DUTTA, I., MAJUMDER, P., SAHA, P., RAY, K., DAS, S. Constitutive and phloem specific expression of *Allium sativum* leaf agglutinin (ASAL) to engineer aphid (*Lipaphis erysimi*) resistance in transgenic Indian mustard (*Brassica juncea*). **Plant Science**. 169: 996–1007, 2005.

ELGAVISH, S., SANAN, B. Lectin-Carbohydrate interactions: different folds, common recognition principles. **TIBS**. 22: 462-467, 1997.

ESWAR, N.; MARTI-RENO, M. A.; WEBB, B.; MADHUSUDHAN, M. S.; ERAMIAN, D.; SHEN, M.; PIEPER, U.; SALL, A. Comparative Protein Structure Modeling With MODELLER. **Current Protocols in Bioinformatics**. 15, 5.6.1-5.6.30, 2006.

ETZLER, M. E. Plant lectins. **Carbohydrates in Chemistry and Biology**. Part II Biology of Saccharides. ERNST, B.; HART, G. W.; SINAÏ, P. (Eds). **WILEY-VCH: Weinheim**. 4: 535-548., 2000

FRITSCH, S.E.F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. **Cold Spring Harbor**, NY. 1989.

GABIUS, H.J. Animal lectins. **Eur. J. Biochem**. 243: 543–76, 1997.

GABIUS, H.J., ANDRE, S., KALTNER, H., SIEBERT, H.C., The sugar code: functional lectinomics, **Biochim. Biophys. Acta** 1572: 165– 177, 2002.

GABIUS, H.-J., GABIUS, S. Glycoscience. Status and Perspectives. **ISBN**. 1997

GABOR, F.; BOGNER, E., WEISSENBOECK, A., WIRTH, M. The lectin-cell interaction and its implications to intestinal lectin-mediated drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews** 56: 459-480, 2004.

GALLEGO DEL SOL, F.; NAGANO, C.S.; MORENO, F.B.M.B.; SAMPAIO, A.H.; GRANGEIRO, T.B.; CAVADA, B.S; CALVETE, J.J. Diocleinae lectins: clues to delineate structure/function correlations. **Methods in Proteome and Protein Analysis**. 32: 81–91, 2004.

GALLEGO DEL SOL, F.; NAGANO, C. S.; CAVADA, B. S.; CALVETE, J. J. The first crystal structure of a Mimosoideae lectin reveals a novel quaternary arrangement of a widespread domain. **J Mol. Biol**. 353: 574–583, 2005.

GLICK, G.D., TOOGOOD, P.L., WILEY, D.C., SKEHEL, J.J., KNOWLES, J.R. Ligand recognition by influenza virus. The binding of divalent sialosides. **J. Biol. Chem.** 266(35): 23660-23669, 1991.

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

GRANGEIRO, T.B.; FREIRE FILHO, F.; CAJAZEIRAS, J.B.; RAMOS, M.V.; SALES, F.J.M.; CAVADA, B.S. Efeito de lectinas vegetais sobre o crescimento e desenvolvimento de insetos. **Leitura Entomológica**. 286: 87-139, 1999b.

GRANGEIRO, T.B.; MONTENEGRO DE SALES, F. J.; FREIRE FILHO, F.R.; CAJAZEIRAS, J.B.; RAMOS, M.V.; CAVADA, B.S. Lectinas de leguminosas da subtribo *Diocleinae*: proteínas com atividades inseticida e probiótica. **Leitura Entomológica**. 286: 207-246, 1999a.

GUPTA, D.; OSCARSON, S.; RAJU, T.S.; STANLEY, P.; TOONE, E.J.; BREWER, C.F. A comparison of the fine saccharide-binding specificity of *Dioclea grandiflora* lectin and concanavalin A. **Eur. J. Biochem.** 242, 320-326. 1996.

GUPTA, N.; SRIVASTAVA, P. S. Purification and characterization of a lectin from seeds and cotyledonary callus of *Zizyphus mauritiana*. **Plant Cell Reports** 17: 552-556, 1998.

HALMELRYCK, T.W.; LORIS, R.; BOUCKAERT, J.; WINS, L. Structural features of the legume lectins. **Trends Glycosc. Glycotechn.** 10 (55): 349-360. 1998.

HARDMAN, K.D.; AINSWORTH, C.F. Structure of Concanavalin A at 2.4Å resolutions. **Biochemistry**. 11 (26): 4910-4919. 1972.

HERMAN, E.M., SHANNON, L.M., CHRISPPEELS, M.J. Concanavalin A is synthesized as a glycoprotein precursor. **Planta**, 165: 23-29, 1985.

TAKASE, H.; WATANABE, A.; YOSHIZAWA, Y.; KITAMI, M.; SATO, R. Identification and comparative analysis of three novel C-type lectins from the silkworm with functional implications in pathogen recognition. **Developmental and Comparative Immunology**. 33: 789-800, 2009.

HOFFMAN, L.M., DONALDSON, D.D. Synthesis of mitogenic phytohemagglutinin-L in *Escherichia coli*. **Biotechnology**. 5: 157-160, 1987.

HOLANDA, M.L., MELO, V.M.M., SILVA, L.M.C.M., AMORIM, R.C.N., PEREIRA, M.G and BENEVIDES, N.M.B. Differential activity of a lectin from *Solieria filiformis* against

human pathogenic bacteria. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 38: 1769-1773, 2005.

IMBERTY, A., PEREZ, S. Structure, conformation, and dynamics of bioactive oligosaccharides: theoretical approaches and experimental validations. **Chem. Rev.** 100: 4567–4588, 2000.

IMBERTY, A., WIMMEROVA, M., MITCHELL, E.P., GILBOA-GARBER, N. Structures of the lectins from *Pseudomonas aeruginosa*: insights into molecular basis for host glycan recognition. **Microbes Infect.** 6: 222-229, 2004.

JORDAN, E.T.; GOLDSTEIN, I. J. The sequence of a second member of the lima bean lectin gene family and the expression and characterization of recombinant lectin in *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.** 269, 7674-7681, 1994.

KAVANAGH, T.A.; FERGUSON, I.K. Pollen morphology and taxonomy of the subtribe Diocleinae (Leguminosae: Papilionoideae: Phaseoleae). **Review of Palaeobotany and Palynology.** 32:317-367.1981.

KAWAGISHI, H.; TAKAGI, J.; TAIRA, T.; MURATA, T.; USUI, T. Purification and characterization of a lectin from the mushroom *Mycophotodermis aitchisonii*. **Phytochemistry.** 56: 53-58, 2001.

KEITEL, T.; SIMON, O.; BORRIS, R.; HAINEMANN, U. Synthesis of 4-methylumbelliferyl- β -d-glucan oligosaccharides as specific chromophoric substrates of (1-3),(1-4)- β -d-glucan 4-glucanohydrolases. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 90: 5287-5291. 1993.

KILPATRICK, D.C. Animal lectins: a historical introduction and overview. **Biochim. Biophys. Acta.** 1572: 187– 197, 2002.

KOCOUREK, J., HOREJSI, V. A note on the recent discussion on the definition of the term “lectin”. **Lectins–Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry.** 3: 3–6, 1983.

KONOZY, E. H. E.; BERNARDES, E. S.; ROSA, C.; FACA, V.; GREENE, L. J.; WARD, R. J. Isolation, purification, and physicochemical characterization of a D-galactose-binding lectin from seeds of *Erythrina speciosa*. **Archives of Biochemistry and Biophysics.** 410: 222-229, 2003.

KUNSTFELD, R.; PETZELBAUER, P. A unique case of a benign disseminated angioproliferation combining features of Kaposi's sarcoma and diffuse dermal angioendotheliomatosis. **Journal of the American Academy of Dermatology** 45: 601-605, 2001.

KUSUI, K.; YAMAMOTO, K.; KONAMI, Y.; OSAWA, T. cDNA cloning and expression of *Bauhinia purpurea* lectin. **Journal Biochemistry**. 109: 899-903, 1991.

LACKEY, J.A. TRIBE 19. PHASEOLEAE DC. (1825). POLHILL, R.M.; RAVEN, P.H., Editors. **Advances in Legume Systematics**. 1: 301–327, 1981.

LAEMMLI, U. K., Cleavage of structural proteun during the assembly of the bactetiophage t4. **Nature**. 227: 680-685, 1970.

LANDSTEINER, K. & RAUBITSCHKE, H. Beobachtungen über Hämolyse und Hämagglutination. **Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. Abt. 1: Orig.** 45: 660–667, 1907.

LANDSTEINER, K., VAN DER SCHEER, J. On the specificity of serological reactions with simple chemical compounds (inhibition reactions), **J Exp Med**. 54: 295–305, 1931.

LEE, J.; T. HYMOWITZ. A molecular phylogenetic study of the subtribe Glycininae (Leguminosae) derived from the chloroplast DNA *rps16* intron sequences. **American Journal of Botany**. 88:2064–2073, 2001.

LIEW, O.W., CHONG, J.P.C., YANDLE, T.G., BRENNAN, S.O. Preparation of recombinant thioredoxin fused N-terminal proCNP: Analysis of enterokinase cleavage products reveals new enterokinase cleavage sites. **Protein Expression and Purification**. 41: 332–340, 2005.

LIS, H., SHARON, N. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. **Chem. Rev.** 98: 637–674, 1998.

LORIS , R., HAMELRYCK, T., BOUCKAERT, J., WYNS, L., Legume lectin structure. **Biochim. Biophys. Acta**. 1383: 9 – 36, 1998.

LORIS R.; VAN WALLE, I.; DE GREVE, H.; BEECKMANS, S.; DEBOECK, F.; WYNS, L.; BOUCKAERT, J. Structural basis of oligomannose recognition by *Pterocarpus angolensis* seed lectin. **J.Mol. Biol.** 335(5): 1227-1240. 2004.

LORIS, L., HALMERYCK, T., BOUCKAERT, J., WYNS, L. Legume Lectin Structure. **Biochim. Biophys. Acta**. 1383: 9-36, 1998.

LORIS, R. Principles of structures of animal and plant lectins **Biochim. Biophys Acta**. 1572: 198– 208, 2002.

LORIS, R. Principles of structures of animal and plant lectins. **Biochim. Biophys. Acta.** 1572: 198-208, 2002.

MACIEL, E. V. M., ARAUJO-FILHO, V. S., NAKAZAWA, M., GOMES, Y. M., COELHO, L. C. B. B., CORREIA, M. T. S. Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. **Biologicals** 32: 57-60, 2004.

MARTINEZ, M.; CORDOBA, F. Isolation of fully active and stable corn coleoptile lectins. **Preparative Biochemistry and Biotechnology.** 30: 199-208, 2000.

MATTEI, R., LEITE, J.R., TUFIK, S. A study of the pharmacological actions of *Dioclea grandiflora* Martius ex Benth. **Sao Paulo Med J.** 113(1): 687-92, 1995.

MEDEIROS, A.; BIANCHI, S., CALVETTE, J.J.; BALTER, H., BAY, S., ROBLES, A., CANTACUZENE, D., NIMTZ, Z., ALZARI, P.M., OSINAGA, E. Biochemical and functional characterization of the Tn-specific lectin from *Salvia sclarea* seeds. **Eur. J. Biochem.** 207 (5): 1434-40, 2000.

MERGULHÃO, F.J.M.; SUMMERSB, D.K.; MONTEIROA, G.A. Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*. **Biotechnology Advances** 23.177–202. 2005.

MIN W., JONES, D.H. In vitro splicing of concanavalin A is catalyzed by an asparaginil endopeptidase. **Nat Struct. Biol.** 1(8): 502-504, 1994.

MIN, A.P., JONES, D.H. Stability and detection of recombinant pre-pro-concanavalin A after cytoplasmatic expression in *Escherichia coli*. **FEBS Lett.** 301-318, 1992.

MIN, W.; DUNN, D.J.; JONES, D.H. Non-glycosilated recombinant pro-concanavalin A is active without polypeptide cleavage. **Embo. J.** 11(4): 1303-1307.1992.

MIN, W.; JONES, D.H. In vitro splicing of concanavalin A is catalyzed by asparaginyl endopeptidase. **Nat Struct Biol.** 1(8):502-504. 1994.

MIN, W.; JONES, D.H. Satability and detection of recombinant pre-pro-concanavalin A after cytoplasmatic expression in *Escherichia coli*. **FEBS Lett.** 301:315-318. 1992.

MISHRA, V.; SHARMA, R. S.; YADAV, S.; BABU, C. R.; SINGH, T. Purification and characterization of four isoforms of *Himalayan mistletoe* ribosome-inactivating protein from *Viscum album* having unique sugar affinity. **Archives of Biochemistry and Biophysics.** 423: 288-301, 2004.

MITCHELL, E., HOULES, C., SUDAKEVITZ, D., WIMMEROVA, M., GAUTIER, C., PÉREZ, S., WU, A.M., GILBOA-GARBER, N. and IMBERTY, A. Structural basis for oligosaccharide-mediated adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* in the lungs of cystic fibrosis patients. **Nature Structural Biology**. 9: 918-921, 2002.

MOREIRA, R. A., AINOUS, I. L., OLIVEIRA, J. T. A. & CAVADA, B. S. Plant Lectins Chemical and Biological Aspects. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. 86: 211-218, 1991.

MOREIRA, R. A.; CASTELO-BRANCO, C. C.; MONTEIRO, A. C. O.; TAVARES R. O.; BELTRAMINI, L. M. Isolation and partial characterization of a lectin from *Artocarpus incisa* L. seeds. **Phytochemistry** 47: 1183-1188, 1998.

MOREIRA, R.A.; BARROS, A.C.H.; STEWART, J.C.; PUSZTAI, A. Isolation and characterization of a lectin from the seeds of *Dioclea grandiflora* (Mart.). **Planta**, 158:63-69, 1983.

MORENO, F.B.M.B., OLIVEIRA, T.M., MARTIL, D.E., VIÇOTI, M.M., BEZERRA, A., ABREGO, J.R.B., CAVADA, B.S., AZEVEDO-JR, W.F. Identification of a new quaternary association for legume lectins. **Journal of Structural Biology**. 161: 133–143, 2008.

MURDOCK, L.L., HUESING, J.E., NIELSEN, S.S., PRATT, R.C., SHADE, R.E. Biological effects of plant lectins on the cowpea weevil. **Phytochemistry**. 29: 85–9, 1990.

MURRAY, M.G., THOMPSON, W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**. 8: 4321-4325, 1980.

MURRAY, M.G.; THOMPSON, W.F. Rapid isolation of high molecular plant Dna. **Nucleic Acids Research** 8: 4321-4325. 1980.

NAEEM, A.; KHAN, R. H.; VIKRAM, H.; AKIF, M. Purification of *Cajanus cajan* root lectin and its interaction with rhizobial lipopolysaccharide as studied by different spectroscopic techniques. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 396: 99-105, 2001.

NAGANO, C. S.; CALVETE, J. J.; BARETTINO, D.; PEREZ, A.; CAVADA, B. S.; SANZ, L.. Insights into the structural basis of the pH-dependent dimer–tetramer equilibrium through crystallographic analysis of recombinant *Diocleinae* lectins. **Biochemistry Journal**. 409: 417–428, 2008.

NASIA, A.; PICARIELLOB, G.; FERRANTI, P. Proteomic approaches to study structure, functions and toxicity of legume seeds lectins. Perspectives for the assessment of food quality and safety. **Journal of proteomics** 72. 527–538. 2009.

Nishiguchi, M.; Yoshida, K.; Sumizono, T.; Tazaki, K. Studies by site-directed mutagenesis of the carbohydrate-binding properties of a bark lectin from *Robinia pseudoacacia*. **FEBS Lett.** 403:294–298, 1997.

NOGUEIRA, N.A.; GRANGEIRO, M.B.; CUNHA, R.M.; RAMOS, M.V.; ALVES, M.A.; TEIXEIRA, E.H.; BARRAL-NETTO, M.; CALVETE, J.J.; CAVADA B.S.; GRANGEIRO, T.B. Expression and purification of the recombinant ConBr (*Canavalia brasiliensis lectin*) produced in *Escherichia coli*. **Protein Pet Lett.** 9(1):59-66. 2002.

PEUMANS, W.J., VAN DAMME, J.M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiol.** 109: 347–352, 1995.

PRASTHOFER, T.; PHILLIPS, S. R.; SUDDATH, F. L.; ENGLER, J. A. Design, expression, and crystallization of recombinant lectin from the garden pea (*Pisum sativum*). **J. Biol. Chem.** 264: 6793-6796, 1989.

QURESHI, I.A., DASH, P.K., SRIVASTAVA, P.S. Koundal KR. Isolation and characterization of a lectin gene from seeds of chickpea (*Cicerarietinum L.*). **DNA Seq.** 18: 196–202, 2007.

RABIJNS, A.; VERBOVEN, C.; ROUGÉ, P.; BARRE, A.; VAN DAMME, E.J.M.; PEUMANS, W.J.; DE RANTER, C.J. Structure of a Legume Lectin From the Bark of *Robinia pseudoacacia* and Its Complex With N-Acetylgalactosamine. **Protein. Struct. Funct. Genet.** 44:470–478. 2001.

RAMIS, C., GOMORD, V., LEROUGE, P., FAYE, L. 2001. Deglycosylation is necessary but not sufficient for activation of proconcanavalin A. **Journal of Experimental Botany.** 52, 911-917, 2001.

REGO, E. J. L.; CARVALHO, D. D.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; NOVELLO, J. C. Lectins from seeds of *Crotalaria pallida* (smooth rattlebox). **Phytochemistry** 60: 441-446, 2002.

RICHARDSON, M.; CAMPOS, F. D. A. P.; MOREIRA, R. A.; AINOUS, I. L.; BEGBIE, R.; WATT, W. B.; PUSZTAI, A. The complete amino acid sequence of the major α -subunit of the lectin from the seeds of *Dioclea grandiflora* (Mart). **Eur. J. Biochem.** 4: 101-111, 1984.

RIPOLL, C.; FAVERY, B.; LECOMTE, P.; VAN DAMME, E.; PEUMANS, W.; ABA, W.; JOUANIN, L. Evaluation of the ability of lectin from snowdrop (*Galanthus nivalis*) to protect plants against root-knot nematodes. **Plant Science.** 164: 517-523, 2003.

RODRIGUES, J. S.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; COELHO, L. C. B. B.; COUVREUR, P.; PONCHEL, G.; GREF, R. Novel core (polyester)-shell(polysaccharide) nanoparticles:

protein loading and surface modification with lectins. **Journal of Controlled Release** 92: 103-112, 2003.

ROUGÉ, P.; RICHARDSON, M.; RANFAING, P.; YARWOOD, A.; CAVADA, B.S. Single and two-chain legume lectins as phylogenetic markers of speciation. **Biochemical and Systematic Ecology** 15(3):341-348. 1987.

RUDIGER, H. and GABIUS, H.J. Plant lectins: Occurrence, biochemistry, functions and applications. **Glycoconjugate Journal**. 18, 589–613, 2001.

RUDIGER, H. On the physiological role of plant lectins. **BioScience**. 34: 95–99 ,1984.

RUDIGER, H. Structure and function of plant lectins. **Glycosciences: Status and Perspectives**. 415–38, 1997.

SACCHETTINI, J.C., BAUM, L.G, BREWER, C.F. Multivalent protein– carbohydrate interactions. A new paradigm for supermolecular assembly and signal transduction. **Biochemistry**. 40: 3009–3015, 2001.

SANTOS, A.F.S., ARGOLO, A.C.C., COELHO, L.C.B.B., PAIVA, P.M.G. Detection of water soluble lectin and antioxidant component from *Moringa oleifera* seeds. **Water Research**. 39: 975–980, 2005.

SANZ-APARICIO, J., HERMOSO, J. GRANGEIRO, T. B., CALVETE, J. J. & CAVADA, B. S. The cristal structure of *Canavalia brasilienses* lectin suggests a 111 correlation between its quaternary conformation and its distinct biological propeties for an Concanavalin A. **FEBS Lett**. 405: 114-118, 1997.

SCHEGGIA, C., PRISCO, A.E., DEY, P.M, DALEO, G.R., PONT LEZICA, R. Alteration of lectin pattern in potato tuber by virus X. **Plant Sci**. 58: 9–14, 1988.

SHANNON, L.M., HANKINS, C.N., STROSBERG, A.D. Enzymatic phytohemagglutinins: Their relation to ‘classic’ legume phytohemagglutinins. **Lectins—Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**. 1: 81–91, 1981.

SHARMA, V., SUROLIA, A. Analyses of carbohydrate recognition by legume lectins: size of the combining site loops and their primar specificity. **J.Mol.Biol**. 267, 433-445, 1997.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology** 14: 53-62, 2004.

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

SHARON.; LIS, H. Lectins. London-New York: Chapman and Hall, 126. 1989.

SHELDON, P.S., BOWLES, D.J. (1992). The glycoprotein precursor of concanavalin A is converted to an active lectin by deglycosilation. **Embo. J.** 11(4): 1297-301

SHELDON, P.S., KEEN, J.N., BOWLES, D.J. Post-translational peptide bond formation during concanavalin A processing in vitro. **Biochem J.** 320:865-870, 1996.

SINGH, D.D., SAIKRISHNAN K., KUMAR P., SUROLIA, A., SEKAR, K., VIJAVAN M. Unusual sugar specificity of banana lectin *Musa paradisiaca* and its probable evolutionary origin. Crystallographic and modeling studies. **Glycobiology.** 15(10): 1025-1032, 2005.

SINGH, P., BHAGLAL, P., BHULLAR, S. Wheat germ agglutinin (WGA) gene expression and ABA accumulation in the developing embryos of wheat (*Triticum aestivum*) in response to drought. **Plant Growth Regulation.** 30: 145–50, 2000.

SINHA, S.; GUPTA, G.; VIJAYAN, M.; SUROLIA, A. Subunit assembly of plant lectins. **Current Opinion in Structural Biology.** 17:498–505. 2007.

SØRENSEN, H.P.; MORTENSEN, K.K. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. **Microbial Cell Factories** , 4:1. 2005(b).

SØRENSEN, H.P.; MORTENSEN, K.K.. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology** 115 . 113–128. 2005(a).

STANCOMBE, P.R.; ALEXANDER, F.C.G.; LING, R.; MATHENSON, M.A.; CHONE, C.C.; CHADDOCK, J.A. Isolation of the gene and large-scale expression and purification of recombinant *Erythrina cristagalli* lectin. **Protein expression and purification.** 30:283-292. 2003.

STILLMARK, H. Ueber Ricin, ein giftiges Ferment aus den Samen von *Ricinuscomm.*L. und einigen anderen Euphorbiaceen. **Schnakenburg's Buchdruckerei, Dorpat**, 1888.

STREICHER, H.R.G.; SHARON, N. Recombinant Plant Lectins and Their Mutants. **Methods in enzymology.** 363: 47-77, 2003.

STRUBBS, M.E.; CARVER, J.P.; DUNN, R.J. Production of pea lectin in *Escherichia coli*. **J.Biol.Chem.** 261: 6141-6144, 1986.

SUMMER, J.B. The globulins of the jack bean, *Canavalia ensiformis*, **J Biol Chem.** 37, 137–42, 1919.

SUMMER, J.B., HOWELL, S.F. The identification of the hemagglutinin of the Jack bean with concanavalin A. **J Bacteriol.** 32, 227–37, 1936.

TAIPALENSUU, J., ERIKSSON, S., RASK, L. The myrosinase-binding protein from *Brassica napus* seeds possesses lectin activity and has a highly similar vegetatively expressed wound-inducible counterpart. **Eur J Biochem.** 250: 680–8, 1997.

TAKASE, H., WATANABE, A., YOSHIKAWA, Y., KITAMI, M., SATO, R. Identification and comparative analysis of three novel C-type lectins from the silkworm with functional implications in pathogen recognition. **Developmental and Comparative Immunology.** 33: 789–800, 2009.

VAN DAMME, E.J.M., BARRE, A., ROUGÉ, P., PEUMANS, W.J. Molecular cloning of the bark and seed lectin from the Japanese pagoda tree (*Sophora japonica*). **Plant Molecular Biology.** 33: 523–536, 1997.

VAN DAMME, E.J.M., PEUMANS, W.J., BARRE, A., ROUGÉ, P. Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological role. **Crit. Rev. Plant Sci.** 17: 575–692, 1998.

VAN EIJSDEN, R.R., DÍAZ, C.L., DE PATER, B.S., KIJNE, J.W. Sugar-binding activity of pea (*Pisum sativum*) lectin is essential for heterologous infection of transgenic white clover hairy roots by *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. **Plant Mol Biol.** 29: 431–439, 1995.

VARELA, E.S.; LIMA, J.P.; GALDINO, A.S.; PINTO, L.D.A.S.; BEZERRA, W.M.; NUNES, E.P.; ALVES, M.A.; GRANGEIRO, T.B. Relationships in subtribe Diocleinae (Leguminosae; Papilionoideae) inferred from internal transcribed spacer sequences from nuclear ribosomal DNA. **Phytochemistry.** 65(1):59-69. 2004.

VARELA, P.F.; ROMERO, A.; SANZ, L.; ROMAO, M.J.; TÖPFER-PETERSEN, E.; CALVETE, J.J.. The 2.4 Å resolution crystal structure of boar seminal plasma PSP-I/PSP-II: a zona pellucida-binding glycoprotein heterodimer of the spermadhesin family built by a CUB domain architecture. **J. Mol. Biol.** 274, 635-649. 1997

VASCONCELOS, I. M, OLIVEIRA, J. T. A. Antinutritional properties of plant lectins. **Toxicon.** 44: 385–403, 2004.

VIJAVAN, M.; CHANDRA, N. Lectins. **Current opinion in structural biology.** 9,707-714, 1999.

WANG, H., NG, T.B., OOI. VEC: Lectins from mushrooms. **Mycol Res.**

WEIS, W.I.; DRICKAMER, K. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. **Annu Rev Biochem.** 65:441-73. 1996.

WIERZBA-ARABSKA, E., MORAWIECKA, B. Purification and properties of lectin from potato tubers and leaves; interaction with acid phosphatase from potato tubers. **Acta Biochim Polon.** 34: 407–420,1987.

YIM, M.; ONO, T.; IRIMURA, T. Mutated plant lectin library useful to identify different cells. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 98, 2222–2225, 2001.

YOUNG, N.M.; OOMEN, R.P. Analysis of sequence variation among legume lectins. A ring of hypervariable residues forms the perimeter of the carbohydrate-binding site. **J. Mol.Biol.** 228 (3): 924-34. 1992.

YUE, T. and HAAB, B.B. Microarrays in Glycoproteomics Research. **Clin Lab Med.** 29: 15–29, 2009.

YUWANG, Z., ZHANG, K., SUN, X., TANG, K. and ZHANG, J.. Enhancement of resistance to aphids by introducing the snowdrop lectin gene *gna* into maize plants. **J. Biosci.** 30(5): 627–638, 2005.

ZHU, K., HUESING, J.B., SHADE, R.E., BRESSAN, R.A., HASEGAWA, P.M., MURDOCK, L.L. An insecticidal N-acetylglucosamine-specific lectin gene from *Griffonia simplicifolia* (Leguminosae). **Plant Physiol.** 110: 195–202, 1996.