



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**JUCILENE PEREIRA DE SOUSA**

**ANÁLISES ESTRUTURAIS DA LECTINA DE *Canavalia maritima* COMPLEXADA  
COM AUXINAS NATURAIS E SINTÉTICAS**

**FORTALEZA**

**2022**

JUCILENE PEREIRA DE SOUSA

ANÁLISES ESTRUTURAIS DA LECTINA DE *Canavalia maritima* COMPLEXADA  
COM AUXINAS NATURAIS E SINTÉTICAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientador: Bruno Anderson Matias da Rocha

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- S697a Sousa, Jucilene Pereira de.  
Análises estruturais da lectina de *Canavalia maritima* complexada com auxinas naturais e sintéticas / Jucilene Pereira de Sousa. – 2022.  
79 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2022.  
Orientação: Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha.
1. Ácido indol-3-butírico. 2. 2,4-diclorofenoxiacético. 3. Fitohormônio. 4. Lectinas de leguminosas. 5. Cristalografia de raios X. I. Título.

CDD 572

---

JUCILENE PEREIRA DE SOUSA

ANÁLISES ESTRUTURAIS DA LECTINA DE *Canavalia maritima* COMPLEXADA  
COM AUXINAS NATURAIS E SINTÉTICAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientador: Bruno Anderson Matias da Rocha

Aprovada em: 10/06/2022.

BANCA EXAMINADORA

---

Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dr. Claudener Souza Teixeira  
Universidade Federal do Cariri (UFCA)

---

Dr. Geancarlo Zanatta  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dr. Eduardo Henrique Salviano Bezerra  
Centro Nacional de Pesquisas em Energia e Materiais (CNPEN)

---

Dr. Bruno Lopes de Sousa  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Dedico este trabalho aos meus pais,  
Juscelino e Gorete. Vocês são minha fonte  
inesgotável de força e amor.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela força e esperança, pois nos momentos mais difíceis ele que me salvou e me manteve firme para seguir em frente.

Aos meus amados pais, Juscelino e Gorete, por sempre me reerguerem mesmo sem saberem, pois uma palavra deles ou a presença reergue minha força de uma maneira incrível. E, por sempre, me apoiarem e acreditarem em mim. Vocês são minha maior definição de amor e cuidado. Amo vocês!

Aos meus irmãos: Janaína pela cumplicidade, apoio e ombro amigo, você é essencial em minha vida. Dilma por acreditar no meu potencial e ser sempre apoio. Vocês estão sempre comigo, mesmo com toda distância física. Sempre estão me apoiando, ajudando e sendo parceiras. Aos meus irmãos Janailson e Jucedy pelo amor, força e confiança que vocês sempre me dão. Ter vocês, em minha vida, é sinônimo de fortaleza.

Aos meus amados sobrinhos Pedro e Gabriel por me darem amor de uma forma tão singela e única. E, também, por nossos momentos de carinho e descontração. A leveza e o amor que vocês acrescentam em minha vida é de uma maneira indescritível.

Aos meus avós maternos Vovô Nivaldo (*in memoriam*) e Vóiza (Luiza) e meus avós paternos Vovô Paulino (*in memoriam*) e Vómira (*in memoriam*). “Penso em vocês, vejo o amor”.

À todos os meus familiares como um todo por serem amor e se fazerem presente em minha vida.

Aos amigos da graduação que estão comigo até hoje Rayza, Leandro, Rhay, Raíssa e Dayse. Eu amo vocês demais!

À Rayza, em especial, por ser conexão, ser palavra acalento, ser parceira e sempre se fazer presente mesmo com toda distância, dividindo dores, alegrias e sendo força. Presente de Deus em minha vida.

À Renally por ter me recepcionado tão bem em Fortaleza quando iniciei o doutorado. Por ter dividido tantos momentos comigo e por ter sido apoio.

Ao Carlos Jr. pela amizade, força, amor, apoio e parceria. Nossos momentos de descontração foram essenciais.

Às minhas amigas do mestrado que continuam comigo. Marcinha que é luz em minha vida, parceria, amizade, riso e amor. Anna Ju que é conversa longa, parceria, amizade, amor e loucura. Vocês são demais minhas garotas!

Aos amigos de laboratório que estiveram comigo em momentos diferentes no doutorado sempre me apoiando, ajudando e dividindo momentos, em especial: Will, Misrael, Danilo, Matheus, Pedro, Gabriel, Léo, Roberta, Dayara, Handerson, Wallady, Vanessa, Germana e Fábio.

À Will o primeiro amigo que fiz na Bioquímica. Me recepcionou divinamente bem e me ensinou, desde o início, inúmeras formas de como caminhar nessa jornada do doutoramento, seja como passar nas disciplinas ou realizar experimentos. Sua amizade tornou minha caminhada mais leve e agradável.

À Misrael o amigo que obtive na minha jornada no laboratório e de disciplinas, e que tanto me ajudou na condução desse trabalho. Amizade essa que transcendeu os muros da academia e trouxe leveza e apoio à minha vida.

Ao Eduardo pelos momentos de descontração, ensinamentos, apoio e amizade. Você foi essencial para realização desse trabalho. Um amigo que levarei para vida. O carinho e gratidão são enormes.

Aos amigos do departamento Karol, Nadine, Mayara, Pacheco e Vicente por dividirem essa caminhada árdua comigo e por me salvarem em tantos momentos.

Ao Laboratório de Biocristalografia em nome do professor Bruno e ao Grupo de Biotecnologia Molecular e Estrutural em nome do professor André, tão importantes para realização desse trabalho.

Ao Laboratório de Biotecnologia Marinha, em especial, ao Celso Nagano, Renata e Rômulo por toda parceria e apoio.

Aos tantos laboratórios, em geral, que realizei experimentos ou pedi reagentes.

Ao CNPEM pela estrutura tão fundamental para realização desse trabalho.

Ao meu orientador Bruno por todo apoio dado para a condução desse trabalho, durante à caminhada do doutorado, por confiar em meu trabalho e por todos os ensinamentos.

À todos os professores (as) que ministraram disciplina e que contribuíram para minha formação.

Aos membros da banca examinadora por terem aceitado o convite e que tanto contribuíram com o trabalho: Claudener Teixeira, Geancarlo Zanatta, Eduardo Salviano e Bruno Lopes.

Ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e à Universidade Federal do Ceará por toda estrutura. Um salve à universidade pública!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior (CAPES) pelo financiamento da bolsa de doutorado.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e encerramento desta importante etapa de minha vida.



*“Ouço o que a natureza  
Reza penso que o tempo transforma  
Forma de nos conectar com o que brilha  
Ilha que agora chamamos de casa  
Asa”*

**(Tó Brandileone/Leo Bianchini/  
Vinicius Calderoni)**

*“Onde o sonho estiver, estarei...”*  
**(Pedro Altério/Vinicius Calderoni)**

## RESUMO

As auxinas são uma classe de fitohormônios que estão incluídas em uma variedade de processos de crescimento e desenvolvimento de plantas. Esses processos incluem divisão celular, crescimento celular e diferenciação celular, que são a base de muitos tipos de organogênese e respostas de crescimento. As auxinas naturais são compostas por moléculas aromáticas com porções de ácido carboxílico como o ácido indol-3-acético (AIA) e o ácido indol-3-butírico (AIB) e ainda existem alguns reguladores de crescimento sintéticos com atividade tipo auxina como o 2,4-ácido diclorofenoxiacético (2,4-D). Dito isto, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a interação da lectina de *Canavalia maritima* (ConM) com os fitohormônios AIB e 2,4-D e determinar o sítio de ligação das auxinas. Para atingir esses objetivos, a ConM foi co-cristalizada com AIB e 2,4-D e as estruturas resolvidas em uma resolução de 1,8 e 1,6 Å, respectivamente. O sítio de interação de ConM com as auxinas é conservado, AIB formou ligação de hidrogênio com Asn131 e interações de van der Waals com Thr49 e 2,4-D formou ligações de hidrogênio com Thr49/Ser110 e interações de van der Waals com Thr49/Asn131. Embora AIB e 2,4-D se liguem no mesmo sítio de ligação em ConM em comparação com AIA em ConM e ConBr, suas orientações são diferentes, diferindo brevemente em relação ao tipo de ligação, distância e resíduos de aminoácidos envolvidos. Comparando AIA complexado com ConM/ConBr com as auxinas em estudo, todas se ligam ao resíduo de aminoácido Asn131. Apenas AIA liga-se ao resíduo de aminoácido Ser108 e apenas 2,4-D liga-se a Ser110. Adicionalmente, todos os complexos foram estabilizados por interações de van der Waals ou ligações de hidrogênio com Thr49, exceto ConM/AIA. A alta similaridade entre as sequências de lectinas de *Canavalia* nos permite afirmar a conservação do sítio de ligação da auxina neste grupo de lectinas. A diferença entre as interações descritas no trabalho pode ser evidência da diferente capacidade de modular as concentrações de auxinas disponíveis nos estágios iniciais de desenvolvimento, da ação recíproca sobre a expressão ou síntese de lectinas e/ou proteínas relacionadas à síntese de auxinas na planta.

**Palavras-chave:** ácido indol-3-butírico; 2,4-diclorofenoxiacético; fitohormônio; lectinas de leguminosas; cristalografia de raios X.

## ABSTRACT

Auxins are a class of phytohormones that are included in a range of plant growth and development processes. These processes include cell division, cell growth, and cell differentiation, which underlie many types of organogenesis and growth responses. Natural auxins are composed of aromatic molecules with carboxylic acid moieties such as indole-3-acetic acid (IAA) and indole-3-butyric acid (IBA) and there are still some synthetic growth regulators with auxin-like activity such as 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). Considering that legume lectins are also involved plant growth and development, the objective of this work was to characterize the interaction of *Canavalia maritima* (ConM) lectin with the phytohormones IBA and 2,4-D, which will completely describe the auxin binding site in these proteins. To achieve these goals, ConM lectin was co-crystallized with IBA and 2,4-D and solved at a 1.8 and 1.6 Å resolution, respectively. The site of interaction of ConM with the auxins is conserved, IBA formed hydrogen bond with Asn131 and established van der Waals interactions with Thr49 and 2,4-D formed hydrogen bonds with Thr49/Ser110 and van der waals interactions with Thr49/Asn131. Although IBA and 2,4-D bind at the same binding site in ConM compared to IAA in ConM and ConBr, their orientations are different. Comparing IAA complexed with ConM and ConBr, all bind to the amino acid residue Asn131. IAA complexes bind to amino acid residue Ser108. On the other hand, only 2,4-D is bound to residue Ser110. Additionally, all complexes were stabilized by van der Waals interactions or hydrogen bonds with Thr49, except ConM/IAA. It is also important to highlight that the positions of IBA and 2,4-D were very similar, however they differed briefly in relation to the type of bond, distance and amino acid residues involved. The high similarity between the sequences of *Canavalia* lectins allow us to affirm the conservation of the auxin binding site in this group of lectins. The difference between the interactions described in the work may be evidence of the different ability to modulate the concentrations of auxins available in the early stages of development, of the reciprocal action on the expression or synthesis of lectins and/or proteins related to the synthesis of auxins in the plant.

**Keywords:** Indole-3-butyric acid; 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; phytohormone; legume lectins; x-ray crystallography.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação esquemática das classes de lectinas vegetais.....	16
Figura 2 – Diagrama da topologia das dobras de lectinas de leguminosas.....	20
Figura 3 – Interfaces da ConA.....	22
Figura 4 – <i>Canavalia maritima</i> em seu habitat natural: (a) esteiras densas crescendo na praia, (b) inflorescência, (c) vagem verde e (d) sementes ejetadas das vagens.....	23
Figura 5 – Maturação de conA por permutação circular.....	26
Figura 6 – Representação do monômero de ConM com destaque para o sítio de reconhecimento de carboidrato com ligação ao dissacarídeo maltose.....	29
Figura 7 – Estrutura de auxinas naturais e sintéticas.....	38

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Visão geral das famílias de lectinas de plantas.....	17
Tabela 2 – Estruturas da lectina de <i>Canavalia maritima</i> depositadas no <i>Protein Data Bank</i> .....	28

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>15</b>
<b>2.1</b>	<b>Lectinas.....</b>	<b>15</b>
<b>2.2</b>	<b>Lectinas de leguminosas.....</b>	<b>19</b>
<b>2.3</b>	<b>Canavalia maritima.....</b>	<b>22</b>
<b>2.3.1</b>	<b><i>Síntese das lectinas da subtribo Diocleinae.....</i></b>	<b>24</b>
<b>2.3.2</b>	<b><i>Caracterização estrutural da lectina de Canavalia maritima.....</i></b>	<b>27</b>
<b>2.3.3</b>	<b><i>Atividades biológicas da lectina de Canavalia maritima.....</i></b>	<b>30</b>
<b>2.4</b>	<b>Auxinas.....</b>	<b>35</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>40</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo Geral.....</b>	<b>40</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos Específicos.....</b>	<b>40</b>
<b>4</b>	<b>ARTIGO DA TESE.....</b>	<b>41</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>68</b>
	<b>APÊNDICE A – ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE DA ConM.....</b>	<b>74</b>
	<b>APÊNDICE B – PERFIL ELETROFORÉTICO DA ConM.....</b>	<b>76</b>
	<b>APÊNDICE C – QUALIDADE ESTEREOQUÍMICA DAS ESTRUTURAS...</b>	<b>78</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Por muito tempo, as lectinas foram denominadas hemaglutininas, devido à sua capacidade de aglutinar as hemácias. Atualmente, este conceito é apenas usado quando a especificidade é desconhecida (LAGARDA-DIAZ; GUZMAN-PARTIDA; VAZQUEZ-MORENO, 2017). Sua capacidade de reconhecer seletivamente e se ligar reversivelmente a mono ou oligossacarídeos específicos é a principal característica dessas proteínas. Além disso, para serem definidas como lectinas, as proteínas com domínio de ligação a carboidratos não devem apresentar atividade enzimática em relação aos açúcares reconhecidos e não devem pertencer à família das imunoglobulinas (BELLANDE *et al.*, 2017; VAN DAMME, 2021). Essas proteínas são distribuídas de forma ubíqua na natureza, sendo encontradas em plantas, fungos, vírus, bactérias e animais (INGALE; HIVRALE, 2013).

Em plantas, as leguminosas apresentam-se como uma rica fonte de lectinas com altos níveis nas sementes em comparação com outros tecidos (INGALE; HIVRALE, 2013; LORIS *et al.*, 1998; VAN DAMME, 2021). A grande abundância e facilidade de purificação contribuiu para que as pesquisas com lectinas se concentrassem mais efetivamente no estudo das lectinas de leguminosas por várias décadas, perfazendo-se assim o grupo mais estudado (SHARON; LIS, 2002; VAN DAMME, 2021). Outra importante razão adicional para o interesse por essa família de lectinas é devida sua semelhança estrutural com as lectinas de outras fontes, como as galectinas de animais (SHARON; LIS, 2002).

Desde o descobrimento dessa classe de proteínas, os cientistas ficaram intrigados com seus potenciais papéis. Com o avanço das pesquisas científicas viu-se que a maioria das lectinas vegetais podem não apenas desempenhar um papel na própria planta, como estoque de nitrogênio ou fator de reconhecimento específico, mas também com a propriedade de interagir com glicoconjugados de outros organismos, interferindo com o funcionamento normal desse organismo (PEUMANS; VAN DAMME, 1995a). Entretanto, seu papel fisiológico em relação à planta ainda não é bem compreendido, apesar do amplo conhecimento sobre a expressão gênica, síntese e estrutura das lectinas. Uma ênfase maior é dada aos eventos que ocorrem fora da célula vegetal, especialmente pelas lectinas de leguminosas, uma vez que se ligam de maneira mais eficaz a oligossacarídeos que não estão presentes nas plantas (HOFF; BRILL; HIRSCH, 2009).

A lectina de *Canavalia maritima* (ConM), especificamente, faz parte da família das lectinas de leguminosas com especificidade pelos açúcares D-glicose/D-manose, as quais apresentam alta homologia. Apesar de serem altamente homólogas, uma função comum não pode ser atribuída a elas, uma vez que parâmetros individuais como especificidades de carboidratos, localização e tempo de aparecimento diferem. Portanto, toda descrição de uma função requer evidências claras que não podem ser substituídas por considerações de analogia. Sendo assim, as principais hipóteses nesta área são divididas em dois grupos: um em que a lectina se liga a ligantes de fontes exógenas, como agressores ou simbiontes animais, fúngicos ou bacterianos, e outro em que uma lectina interage com ligantes da planta (RUDIGER; GABIUS, 2001). Em relação a interação de lectina com ligantes da própria planta, mais especificamente as auxinas, a primeira estrutura com auxinas foi determinada por Delatorre *et al.* (2013) a partir da interação de ConM com AIA e mais recentemente foi publicado também ConBr complexado com este fitohormônio (SALES, 2019), levantando a hipótese de que a interação da lectina com diferentes formas de AIA é uma estratégia para tornar o fitohormônio indisponível para a célula, para assim proteger as radículas de sua atividade inibitória. Nesse sentido, este estudo tem como objetivo investigar a interação da ConM com os hormônios AIB e 2,4-D a partir de ensaios estruturais, que irão descrever completamente o sítio de ligação da auxina nestas proteínas e contribuir para o aprofundamento da discussão sobre a interação de lectinas com hormônios vegetais.



## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Lectinas


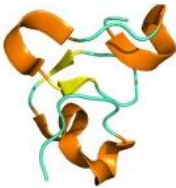

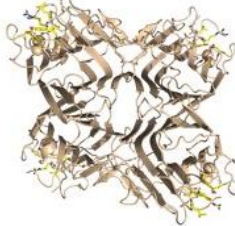

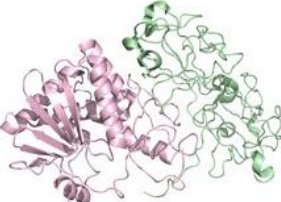

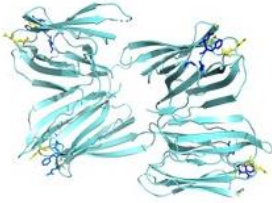

A pesquisa de lectinas em plantas começou há mais de 130 anos. Desde então, muitos bioquímicos e biólogos moleculares ficaram intrigados com esse grupo específico de proteínas de ligação a carboidratos (TSANEVA; VAN DAMME, 2020). Por muito tempo, as lectinas foram denominadas hemaglutininas, devido à sua capacidade de aglutinar as hemácias. Atualmente, este conceito é apenas usado quando a especificidade é desconhecida (LAGARDA-DIAZ; GUZMAN-PARTIDA; VAZQUEZ-MORENO, 2017). Sua capacidade de reconhecer seletivamente e se ligar reversivelmente a mono ou oligossacarídeos específicos é a principal característica dessas proteínas. Além disso, para serem definidas como lectinas, as proteínas com domínio de ligação a carboidratos não devem apresentar atividade enzimática em relação aos açúcares reconhecidos e não devem pertencer à família das imunoglobulinas (BELLANDE *et al.*, 2017; VAN DAMME, 2021). As lectinas são distribuídas universalmente na natureza, sendo estabelecidas em plantas, fungos, vírus, bactérias e animais (INGALE; HIVRALE, 2013).

A especificidade por carboidratos e suas estruturas quaternárias são bastante variáveis, influenciando no tipo de alvo de cada proteína. A existência de sítios de ligação para carboidratos específicos, principal característica das lectinas, é, sem dúvida, um fator importante para determinar sua atividade e futuras aplicações com base em suas propriedades. São proteínas solúveis ou de membrana, presentes tanto dentro como fora das células. Os carboidratos, os ligantes potenciais das lectinas, pertencem a um grande grupo de moléculas com enorme diversidade e complexidade de estruturas. Eles também existem na superfície da célula ou dentro das células. Na matriz extracelular, eles formam grandes redes complexas de polissacarídeos e proteoglicanos (BELLANDE *et al.*, 2017).

As interações proteína-carboidrato são parte das vias de sinalização mais eficientes que ocorrem dentro dos organismos vivos ou entre os organismos vivos e seu ambiente. As lectinas são proteínas que se especializaram no reconhecimento específico de carboidratos durante a evolução de todos os organismos vivos e apresentam uma grande variedade de domínios de ligação a carboidratos, cada um com um ou mais locais de ligação a carboidratos que reconhecem especificamente açúcares simples ou mais complexos (BARRE; BOURNE; DAMME, 2019).

Dito isto, as lectinas podem ser subdivididas em merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas de acordo com sua estrutura geral, Figura 1. As *merolectinas* consistem exclusivamente em um único domínio de ligação a carboidratos, sendo monovalentes e incapazes de precipitar glicoconjugados ou aglutinar células. Um exemplo desse grupo é a heveína, uma proteína do látex de ligação à quitina da árvore de borracha *Hevea brasiliensis*.

**Figura 1** – Representação esquemática das classes de lectinas vegetais

 <p style="text-align: center;"><b>Merolectina</b></p>	 <p style="text-align: right;"><b>Heveína (1Q8B)</b></p>
 <p style="text-align: center;"><b>Hololectina</b></p>	 <p style="text-align: right;"><b>ConM (2CWM)</b></p>
 <p style="text-align: center;"><b>Quimerolectina</b></p>	 <p style="text-align: right;"><b>Ricina (2AAI)</b></p>
 <p style="text-align: center;"><b>Superlectina</b></p>	 <p style="text-align: right;"><b>Lectina de banana (3MIT)</b></p>
 <p style="text-align: center;"> <span style="margin-right: 40px;"><b>lectina</b></span> <span style="margin-right: 40px;"><b>DRC I</b></span> <span style="margin-right: 40px;"><b>DRC II</b></span> <span><b>Sítio catalítico</b></span> </p>	

**Nota:** Representação de lectinas para cada uma das classes: merolectina, hololectina, quimerolectina e superlectina representadas pela heveína (*Hevea brasiliensis*), ConM (*Canavalia maritima*), ricina (*Ricinus communis*) e lectina de banana (*Musa acuminata*), respectivamente. Fonte: (VAN DAMME et al., 1998).

O segundo grupo compreende as *hololectinas* que consistem exclusivamente em domínios de ligação a carboidratos, entretanto pelo ao menos dois desses domínios são idênticos ou muito semelhantes. Logo, as lectinas desse grupo são di ou multivalentes, podendo aglutinar células e/ou precipitar glicoconjugados, compreendendo a maioria das lectinas de plantas. As *quimerolectinas* são proteínas de "fusão" consistindo de um domínio de ligação de carboidrato em conjunto com um domínio não relacionado, o qual pode apresentar atividade catalítica bem definida ou alguma outra atividade biológica, atuando de forma independente ao domínio de ligação a carboidratos. As quimerolectinas podem ainda se comportar como merolectinas ou hololectinas dependendo do número de locais de ligação a carboidratos (PEUMANS; VAN DAMME, 1998). Um exemplo desse grupo é a ricina (*Ricinus communis*) a qual é uma Proteína Inativadora de Ribossomos (RIP) tipo II, sendo constituída por um domínio RIP (~32 kDa, designado de cadeia A) ligado a um domínio lectínico (~34 kDa designado de cadeia B) com afinidade por galactose/N-acetilgalactosamina ligados por pontes dissulfetos (LORD; ROBERTS; ROBERTUS, 1994). Enquanto que o grupo das *superlectinas* compreende ao menos dois domínios diferentes de ligação à carboidratos, podendo-se assim reconhecer açúcares estruturalmente diferentes (PEUMANS; VAN DAMME, 1998).

As lectinas de plantas podem ainda ser classificadas em 12 famílias de acordo com a sequência de aminoácidos e estrutura tridimensional (TSANEVA; VAN DAMME, 2020). Conforme Tabela 1, pode-se ver o detalhamento das famílias em relação ao ligante sacarídico típico, localização na célula, bem como o tipo de estrutura tridimensional. Dentre as famílias apresentadas, será dada ênfase as lectinas de leguminosas na sessão posterior.

**Tabela 1** – Visão geral das famílias de lectinas de plantas. (continua)

	<b>Ligantes sacarídeos</b>	<b>Localização celular</b>	<b>Estrutura tridimensional</b>
Lectina <i>Agaricus bisporus</i> (ABA)	GlcNAc/GalNAc, galactose, antígeno T	Núcleo, citoplasma	$\beta$ -sanduíche
Amarantina	GalNAc, antígeno T	Núcleo, citoplasma	$\beta$ -trevo
Aglutinina relacionada à quitinase (CRA)	N-glicanos de alta manose	Vacúolo, ligado à membrana	TIM barril
Cianovirina	Manose, N-glicanos de alta manose	Núcleo	Folha $\beta$ de fita tripla e grampo $\beta$

**Tabela 1 – Visão geral das famílias de lectinas de plantas. (conclusão)**

	<b>Ligantes sacarídeos</b>	<b>Localização celular</b>	<b>Estrutura tridimensional</b>
Lectina de <i>Euonymus europaeus</i> (EUL)	Galactosídeos, N-glicanos com alto teor de manose	Núcleo, citoplasma	ND
Lectina de <i>Galanthus nivalis</i> (GNA)	Manose, oligossacarídeos de manose, N-glicanos de alta manose	Vacúolo, núcleo, citoplasma ou ligado à membrana	$\beta$ -prisma
Heveína	Quitina, (GlcNAc) <sub>n</sub> , ácido siálico	Vacúolo	Motivo estrutural comum de 30-43 resíduos, rico em glicina e cisteína em posições altamente conservadas, organizado em torno de um núcleo de quatro dissulfeto
Jacalina	Manose/N-glicano de alta manose ou galactose/N-glicano complexo	Núcleo, citoplasma e vacúolo	$\beta$ -prisma
Lectina de leguminosa	Manose/glicose, Galactose/GalNAc, (GlcNAc) <sub>n</sub> , fucose, ácido siálico, high manose e N-glicanos complexos	Vacúolo, núcleo, citoplasma ou ligado à membrana	$\beta$ -sanduíche
LysM	Quitina, (GlcNAc) <sub>n</sub> , peptidoglicano	Vacúolo, núcleo, citoplasma ou membrana ligada	estrutura $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$
Lectina de <i>Nicotiana tabacum</i> (Nictaba)	(GlcNAc) <sub>n</sub> , alta manose e N-glicanos complexos	Núcleo, citoplasma	ND
Ricina-B	Galactose/GalNAc, Galactose sialilada/GalNAc	Vacúolo, núcleo, citoplasma	$\beta$ -trevo

**Nota:** ND - não definido. **Fonte:** TSANEVA; VAN DAMME (2020).

Para lidar com a complexidade dos carboidratos, as lectinas exibem arranjos moleculares variados, permitindo diversidade e seletividade para o reconhecimento do açúcar. Os locais de ligação das lectinas contêm resíduos polares que formam ligações de hidrogênio com os grupos hidroxila altamente abundantes dos açúcares. Portanto, redes extensas de ligações de hidrogênio surgem e desempenham um papel fundamental na especificidade do ligante. As cadeias laterais aromáticas de resíduos de triptofano, tirosina e fenilalanina também desempenham papéis críticos ao empilhar a face hidrofóbica dos açúcares. A maioria delas são proteínas secretoras direcionadas para o vacúolo, onde se acumulam em grandes quantidades nas sementes, ou para a parede celular e a membrana plasmática. A

riqueza de informações fornecidas pelo sequenciamento genômico de várias espécies de plantas, estudos de transcriptômica e proteômica, bem como abordagens de genética reversa, foram inestimáveis para descrever o complemento total de lectinas em muitas espécies de plantas e para compreender suas funções ((BELLANDE *et al.*, 2017).

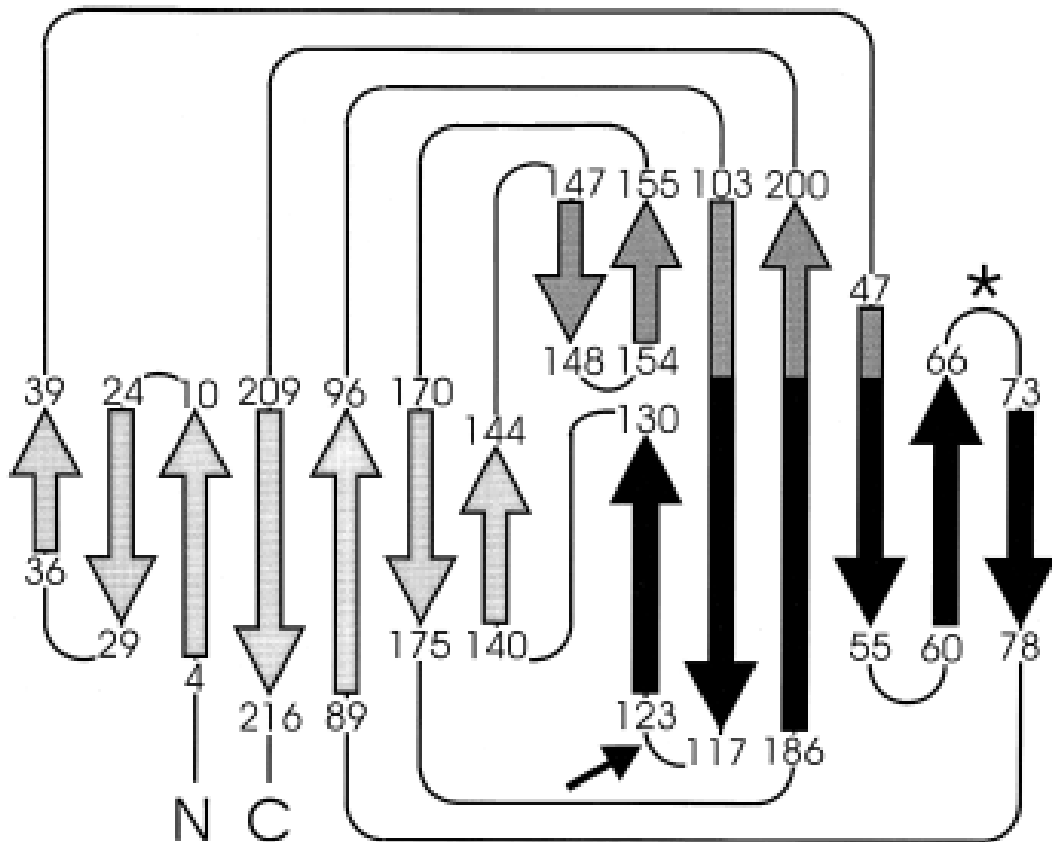
## 2.2 Lectinas de leguminosas

As leguminosas apresentam-se como uma rica fonte de lectinas com altos níveis nas sementes em comparação com outros tecidos (GAUTAM *et al.*, 2018; INGALE; HIVRALE, 2013; LORIS *et al.*, 1998; VAN DAMME, 2021). Nesse sentido, as pesquisas com lectinas se concentraram mais efetivamente no estudo das lectinas de leguminosas por várias décadas, perfazendo-se assim o grupo mais estudado (SHARON; LIS, 2002; VAN DAMME, 2021). Outra importante razão adicional para o interesse por essa família de lectinas é devida sua semelhança estrutural com as lectinas de outras fontes, como as galectinas de animais (SHARON; LIS, 2002).

A análise dos monômeros de lectina de leguminosas revela alta similaridade na sequência, bem como na estrutura, com apenas pequenas variações no comprimento dos laços e fios (LAGARDA-DIAZ; GUZMAN-PARTIDA; VAZQUEZ-MORENO, 2017). As estruturas primárias das lectinas desta família exibem cerca de 20% de aminoácidos invariantes e 20% de aminoácidos semelhantes. Os resíduos de aminoácidos conservados compreendem muitos dos participantes das ligações de hidrogênio ou interações hidrofóbicas com monossacarídeos mantidos nos locais de ligação, bem como quase todos os resíduos que coordenam os íons metálicos (SHARON; LIS, 2002).

Dentre as lectinas de leguminosas, a ConA foi a primeira lectina a ser isolada (SUMNER; HOWELL, 1936), sequenciada (CUNNINGHAM *et al.*, 1975; WANG *et al.*, 1975) e a ter sua estrutura tridimensional determinada por cristalografia de raios X com resolução de 2,4 Å, código do PDB 3CNA (HARDMAN; AINSWORTH, 1972). Essa lectina foi isolada das sementes de *Canavalia ensiformis*, também conhecida como feijão-de-porco. Esta proteína foi bastante estudada bioquimicamente e estruturalmente, tornando-a a lectina vegetal mais caracterizada até o momento.

**Figura 2** – Diagrama da topologia das dobras de lectinas de leguminosas.



**Nota:** A folha traseira com 6 fios está representada na cor preta, a folha frontal de 7 fios na cor cinza claro e a folha pequena de 5 fios do topo em cinza escuro. Fonte: Loris *et al.* (1998).

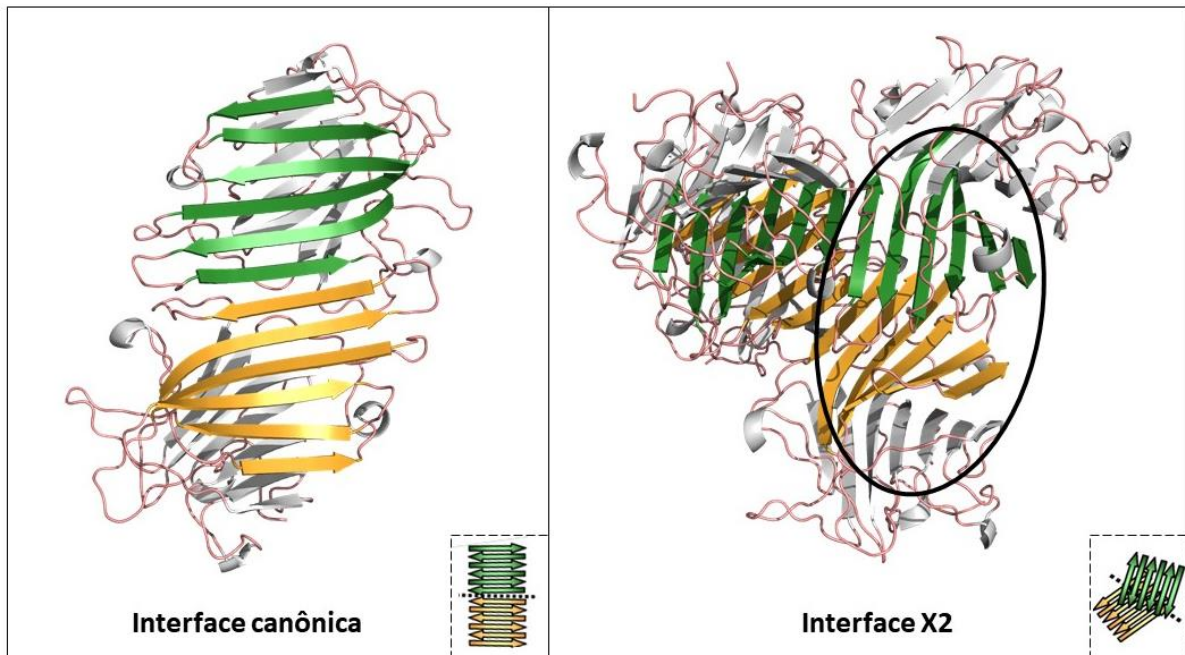
A arquitetura do monômero de lectina, Figura 2, é geralmente descrita como consistindo de três folhas: uma folha traseira plana de seis fios, uma folha frontal curva de sete fios e uma folha menor no topo de cinco fios (folha S), a qual desempenha um papel importante em manter as duas folhas maiores juntas (BANERJEE *et al.*, 1996; LORIS *et al.*, 1998; RUDIGER; GABIUS, 2001). Essa arquitetura caracteriza o motivo *Jelly roll*, o qual foi descrito pela primeira vez para ConA (SINHA *et al.*, 2007). Em geral, as estruturas monoméricas exibem esse motivo descrito como um sanduíche de 25-30 kDa contendo um domínio de reconhecimento a carboidratos (DRC) e sítios de ligação à metais por cátions divalentes como cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e manganês ( $\text{Mn}^{2+}$ ) (LAGARDA-DIAZ; GUZMAN-PARTIDA; VAZQUEZ-MORENO, 2017). O cálcio e o manganês estão separados por 4,25 Å e estão próximos (9-13 Å) do sítio de ligação de carboidratos (SHARON; LIS, 2002). Se a ConA desmetalizada precisar ser reconstituída, a ligação do manganês deve preceder a ligação dos íons de cálcio. A presença desses íons é essencial para o dobramento correto e arranjos internos do

local de ligação do carboidrato para reduzir o custo entrópico, restringindo a mobilidade para o contato do ligante orquestrado. Os íons metálicos não participam diretamente da interação com o ligante, como é o caso das lectinas animais do tipo C (RUDIGER; GABIUS, 2001).

Sabe-se que as lectinas de leguminosas existem principalmente como dímeros ou tetrâmeros constituídos por dímeros, apresentando diferenças consideráveis em suas associações quaternárias e modos de organização de monômeros na associação dimérica/tetramérica (BRINDA; MITRA; SUROLIA, 2004; MORENO *et al.*, 2006). Normalmente, os tetrâmeros de lectinas de leguminosas são essencialmente dímeros de dímeros e os diferentes modos de tetramerização são uma consequência da combinação diversa de interfaces diméricas vistas nessas estruturas quaternárias (MORENO *et al.*, 2006). A oligomerização nessas lectinas diméricas ou tetraméricas é mediada principalmente pelas interações da folha  $\beta$  posterior plana de seis fios entre as diferentes subunidades para produzir sete tipos diferentes de interfaces. Em ConA observa-se duas interfaces: uma interface canônica encontrada no dímero e a interface X2 a qual é encontrada em sua forma tetramérica, conforme Figura 3 (SINHA *et al.*, 2007).

O primeiro ou o único passo na associação de suas subunidades é a dimerização. Em conA, a dimerização envolve o alinhamento lado a lado antiparalelo de duas folhas  $\beta$  planas levando à formação de uma folha  $\beta$  contígua de 12 fios, seis de cada subunidade, denominada de interface canônica (Figura 3). A folha traseira de seis fitas está relacionada por um eixo de rotação duplo cristalográfico a seis fitas adicionais da segunda subunidade por ligações de hidrogênio (BANERJEE *et al.*, 1996). Com base em sua estrutura quaternária, as lectinas de leguminosas são tradicionalmente subdivididas em duas categorias: um grupo consiste em lectinas com subunidades idênticas ou quase idênticas, enquanto a outra categoria é caracterizada por diferentes tipos de subunidades. A ConA, por sua vez, apresenta sua estrutura quaternária na forma de um tetrâmero com todas as subunidades idênticas, cada uma contendo uma única cadeia polipeptídica de 237 resíduos de aminoácidos. As estruturas lembram cúpulas achatadas em forma de sino contendo uma bolsa rasa em seu ápice que forma o local de ligação de carboidratos. A parte inferior da bolsa contém locais de ligação para íons metálicos bivalentes (RUDIGER; GABIUS, 2001).

**Figura 3 – Interfaces da ConA.**



**Nota:** Na parte esquerda da figura está representada a dimerização da ConA com suas 6 fitas de cada monômero da folha traseira representadas para o monômero 1 na cor verde e para o monômero 2 na cor laranja, sequencialmente exibindo 12 fitas dispostas. Essa dimerização é caracterizada como interface canônica (PDB 1CVN). Na parte direita está representado o tetrâmero de ConA em que os dímeros se associam com suas folhas  $\beta$  posteriores caracterizada como interface X2 (destaque dessa associação dos dímeros no círculo alongado preto). No lado direito, na parte inferior de cada imagem, apresentam-se figuras esquemáticas para as duas interfaces abordadas (SINHA *et al.*, 2007).

Por serem facilmente obtidas na forma purificada e apresentarem uma incrível variedade de especificidade à açúcares, essas lectinas são eminentemente adequadas para estudar a ligação de proteínas à carboidratos. As percepções fundamentais obtidas a partir do estudo dessas lectinas têm sido amplamente aplicadas a lectinas de outras famílias (SHARON; LIS, 2002), representando um ponto crucial no estudo da base molecular das interações proteína-carboidratos, podendo interagir de forma não covalente com os carboidratos, de maneira reversível e altamente específica. A maioria das lectinas se liga a mono- e oligossacarídeos; no entanto, lectinas descobertas mais recentemente mostram especificidade para açúcares complexos e glicoproteínas (LAGARDA-DIAZ; GUZMAN-PARTIDA; VAZQUEZ-MORENO, 2017).

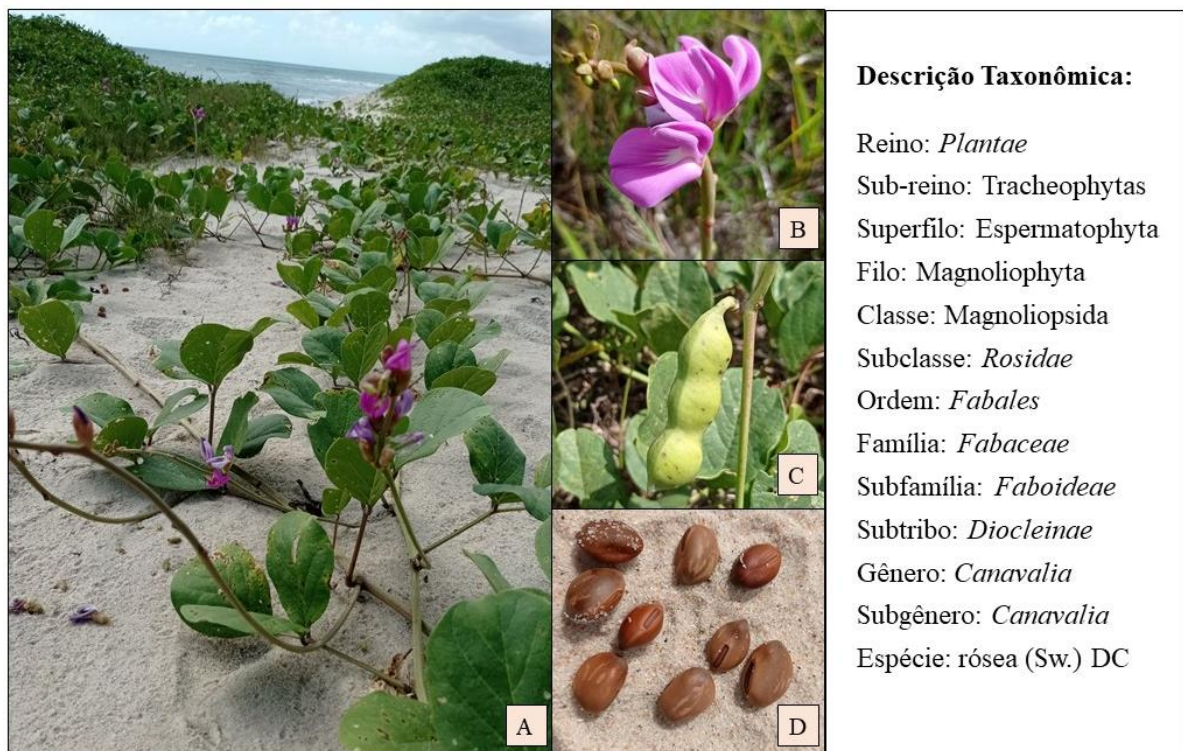
### 2.3 *Canavalia maritima*

O gênero *Canavalia* compreende cerca de 60 espécies, tendo uma distribuição pantropical, com concentração na região neotropical apresentando cerca de 37 espécies. Um dos gêneros mais comuns é a *Canavalia maritima* (Aubl.), espécie



panropical, a qual é sinônimo com *Canavalia rósea*, *Canavalia apiculata* (Piper), *Canavalia arenicola* (Piper), *Canavalia obtusifolia* (Lam.), *Dolichos emarginatus* (Jacq.), *Dolichos roseus* (Sw.) e *Dolichos maritimus* (Aubl.), do latim *maritimus* significa “pertencente ao mar” (MENDOZA-GONZÁLEZ; MARTÍNEZ; LITHGOW, 2014). No Brasil é popularmente conhecida como feijão-da-praia. Essa espécie é amplamente distribuída no litoral e foi encontrada em praias do litoral cearense (Figura 4).

**Figura 4** – *Canavalia maritima* em seu habitat natural: (a) esteiras densas crescendo na praia, (b) inflorescência, (c) vagem verde e (d) sementes ejetadas das vagens.



**Nota:** Fotos da autora em Praia de Tabuba, Caucaia, Ceará, Brasil. Descrição taxonômica de acordo com Mendoza-González, Martínez e Lithgow (2014).

É uma espécie que tem o hábito rasteiro do tipo trepadeira pertencente à família das leguminosas. Os caules são grossos e carnudos e crescem até 10 m ou mais de comprimento e cerca de 2,5 cm de diâmetro, podendo ser lenhosos na parte da base. Essas trepadeiras rastejantes escalam dunas ou vegetação à medida que se expandem para o interior a partir da praia. As flores são rosa-púrpura e são produzidas durante todo o ano, mas principalmente durante o verão (MENDOZA-GONZÁLEZ; MARTÍNEZ; LITHGOW, 2014). As vagens, que são produzidas no final do período

chuvoso, são planas e têm cerca de 10-15 cm de comprimento e 2,5 cm de largura, possuindo cerca de seis sementes por vagem. O peso médio da semente varia de 0,5 a 0,65 g com comprimento médio de 1,4 cm, desta o peso médio dos cotilédones é 0,35 g e do tegumento é de 0,15 g (ARUN; SRIDHAR, 2004).

A leguminosa, em questão, possui uma grande importância econômica e ambiental. Essas plantas proporcionam proteção costeira, uma vez que são comumente usadas para prevenir a erosão do solo, pois a densa cobertura diminui o impacto das ondas de tempestade, as raízes unem o substrato e evitam que a areia se mova, bem como o rápido crescimento da planta permite que ela cubra as dunas mais móveis. Esses atributos proporcionam redução no impacto direto do vento e das ondas na praia (SRIDHAR; SEENA, 2006). O feijão-da-praia é utilizado, ainda, como adubo verde na Índia (D’CUNHA; SRIDHAR, 2011). As sementes ao serem fervidas ou torradas, para a remoção de toxinas, são comestíveis e suas flores frescas ou secas podem ser usadas como enfeites e para aromatizar ambientes (SRIDHAR; SEENA, 2006). Diferentes partes da planta apresentam propriedades medicinais e seu uso pode trazer benefícios para a saúde (MENDOZA-GONZÁLEZ; MARTÍNEZ; LITHGOW, 2014). Em termos de composição das sementes (g/100g) grande parte é constituída por carboidrato  $50,5 \text{ g} \pm 0,53$  seguida de proteínas  $29,3 \text{ g} \pm 0,6$  (ARUN *et al.*, 2003). Dentre as proteínas que constituem as proteínas totais encontradas nas sementes, foi isolada por cromatografia de afinidade utilizando Sephadex® G-50 a lectina denominada de Concanavalina M (ConM) a qual é objeto de estudo deste trabalho. Serão apresentadas, em seguida, a síntese dessa proteína pertencente à subtribo *diocleinae*, bem como sua caracterização estrutural e atividades biológicas.

### **2.3.1 Síntese das lectinas da subtribo *Diocleinae***

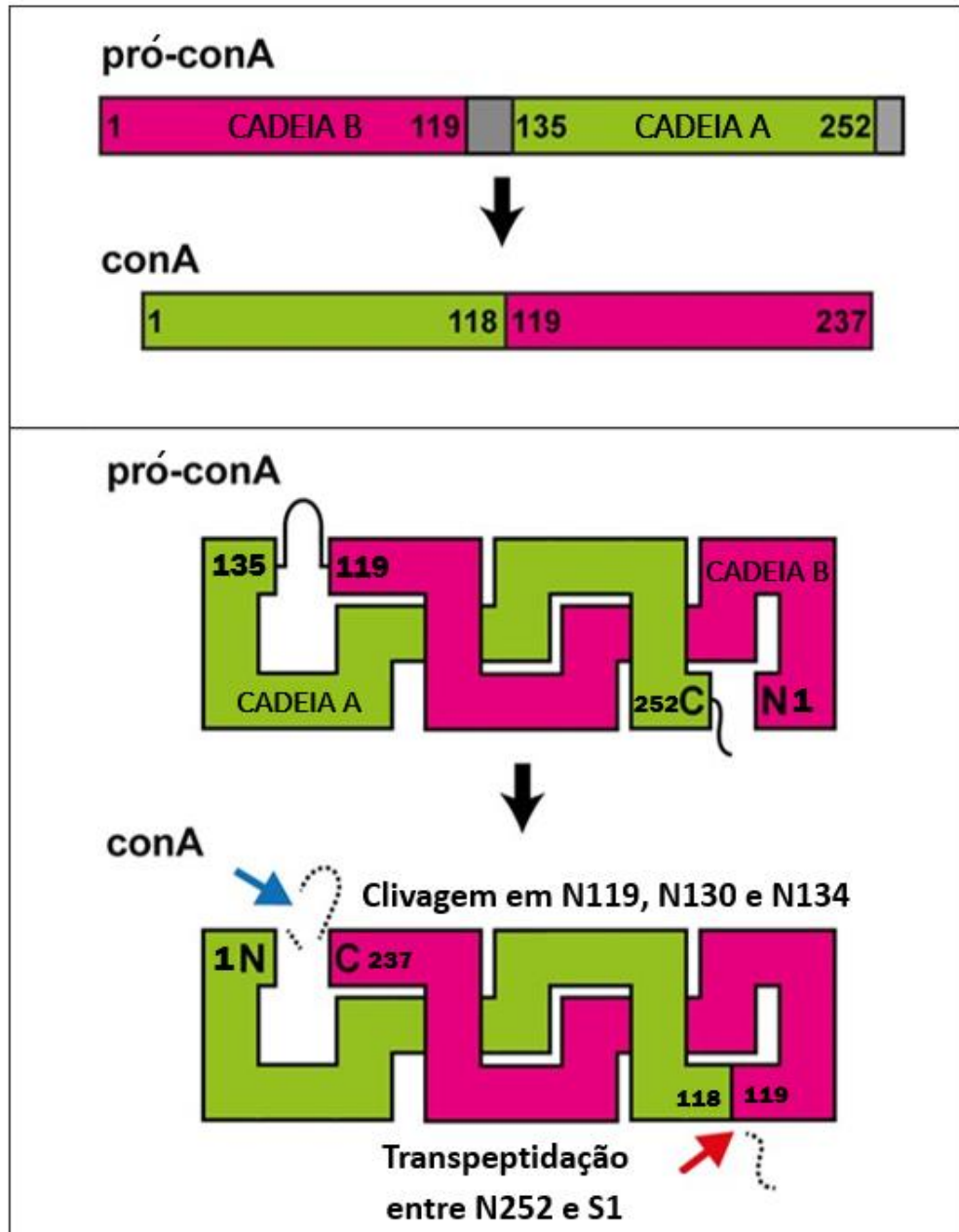
A conA foi descoberta há pouco mais de 100 anos, apesar disso só agora temos uma estrutura para o pró-conA, precursor da conA madura, permitindo-se entender como a permutação circular de pró-conA afeta essa proteína. Não é viável extrair pró-conA das sementes de feijão-de-porco, pois pró-conA é rapidamente convertido em conA. A alta semelhança da estrutura de pró-conA recombinante, obtida pelos pesquisadores, com a de conA indica que pró-conA recombinante se dobra na conformação correta no sistema de expressão de *E. coli*. Para garantir a maior consistência possível entre a preparação de pró-conA e conA, pró-conA

recombinante foi dialisada no mesmo tampão em que o pó comercial de conA foi dissolvido (NONIS *et al.*, 2021).

A biossíntese de conA envolve uma série de clivagens e uma reação de transpeptidação no lado carboxílico de resíduos de asparagina, resultando em permutação circular. De um modo geral, as lectinas da subtribo *Diocleinae* são sintetizadas no retículo endoplasmático como pré-pró-lectinas atuando como precursores glicosilados, utilizaremos aqui como exemplo a conA, a qual é a lectina da subtribo melhor caracterizada até o momento. A pré-pró-conA é composta, por sua vez, por um peptídeo sinal de vinte e nove resíduos de aminoácidos na região N-terminal, por duas cadeias peptídicas B (resíduos 1-119) e A (resíduos 135-252), um segmento glicosilado no centro de sua estrutura de quinze resíduos de aminoácidos (V<sup>120</sup>IRNSTTIDFNAAAYN<sup>134</sup> com glicosilação no resíduo N123), e um peptídeo de nove resíduos de aminoácidos na região C-terminal. Durante o transporte da pré-pró-conA para o lúmen do retículo endoplasmático ocorre a remoção do peptídeo sinal dando origem a pró-conA (CARRINGTON; AUFFRET; HANKE, 1985; NONIS *et al.*, 2021).

O glicano ligado a região N-terminal inibe a atividade de ligação a carboidratos por pré-pró-conA no retículo endoplasmático e parece ser necessário para o transporte de pró-conA para fora do retículo endoplasmático (FAYE; CHRISPEELS, 1987). De acordo com alguns autores, a lectina madura e ativa não é glicosilada, pois essa glicosilação inibiria a atividade de ligação a carboidrato da lectina (SHARON, 2007). Uma forma de ConA sem atividade é encontrada ao longo do crescimento da semente, mas desaparece na maturação (CARRINGTON; AUFFRET; HANKE, 1985). Logo, a deglicosilação é uma modificação necessária para que a pró-conA adquira a capacidade de se ligar a carboidratos (RAMIS *et al.*, 2001). Vale salientar que a permutação circular não tem efeito na ligação e especificidade de carboidrato, esse fato foi corroborado com a análise ITC feita por Nonis e colaboradores (2021) que não mostrou diferença na constante de associação entre pró-conA e conA quando analisada com metil- $\alpha$ -D-manose. Além do mais, foi demonstrado que a permutação circular de conA aumenta a estabilidade térmica e de pH sem afetar a ligação *in vitro* ao carboidrato metil- $\alpha$ -D-manose. O pH ótimo para permutação circular de conA por CeAEP1 (endopeptidase recombinante asparaginil de feijão-de-porco) está entre pH 5 e 6, com maior eficiência próxima a pH 5.

**Figura 5 –** Maturação de conA por permutação circular.



**Nota:** Durante a maturação, o resíduo 1 da metade N-terminal (cadeia B) de pró-conA torna-se o resíduo 119 da metade C-terminal de conA e o resíduo 135 torna-se o resíduo 1 de conA. Os segmentos cinzas em pró-conA são clivados durante a maturação. A clivagem das ligações peptídicas (seta azul) e formação de ligações peptídicas, ou seja, transpeptidação (seta vermelha) dentro de pró-conA são necessárias para produzir conA. Todos os eventos de clivagem e transpeptidação ocorrem no lado carboxílico dos resíduos de asparagina. **Fonte:** Adaptado de Nonis *et al.* (2021).

No complexo de golgi, a pró-conA sofre uma quebra proteolítica perdendo o segmento glicosilado ligado ao N123 no centro de sua estrutura e dividindo a cadeia principal em duas cadeias B e A. As duas cadeias são então religadas em locais diferentes, logo a cadeia A que antes estava na região N-terminal é religada na B

havendo inversão entre as regiões N e C-terminal, originando-se assim uma única cadeia  $\alpha$  madura, Figura 5 (CARRINGTON; AUFFRET; HANKE, 1985). Durante a maturação, o resíduo 1 da metade N-terminal (cadeia B) de pró-conA torna-se o resíduo 119 da metade C-terminal de conA e o resíduo 135 (cadeia A) torna-se o resíduo 1 de conA na região N-terminal (NONIS *et al.*, 2021).

### **2.3.2 Caracterização estrutural da lectina de *Canavalia maritima***

A sequência da ConM sugerida inicialmente mostrava 90 % de similaridade com a ConA (PEREZ *et al.*, 1991). Gadelha e colaboradores (2005) corrigiram alguns resíduos a partir da análise das diferenças entre a sequência de aminoácidos e a densidade eletrônica, resultando em um aumento de similaridade para 98 %. Os resíduos alterados com base na densidade eletrônica foram V17, S53, M129, T134, S144, P164, S165, G169, T187, T190, A196 e P202, os quais foram substituídos por I17, I53, V129, S134, G144, S164, S169, P165, V187, S190, T196 e S202, respectivamente. Logo, relataram que apenas cinco resíduos de aminoácidos são diferentes entre as sequências de ConA (D58, A70, M129, E192 e P202) e ConM (G58, G70, S129, D192 e S202). Essas diferenças nesses resíduos representam algumas alterações particulares, como a substituição de P202 por S202 a qual causa alterações conformacionais no local de ligação do carboidrato. Esse resíduo apesar de não estar diretamente relacionado ao DRC propicia um deslocamento da Tyr12 para dentro do DRC, o que lhe confere um aumento significativo na capacidade de ConM se ligar à dissacarídeos (GADELHA *et al.*, 2005). Uma base para a atividade biológica diferente é a variabilidade na estrutura primária.

Os resíduos de aminoácidos que em ConA estão envolvidos no local de ligação de carboidratos (Tyr12, Asn14, Leu99, Tyr100, Asp208 e Arg228), local de ligação de metal (Glu8, Asp10, Tyr12, Asn14, Asp19, His24, Val32, Ser34, Asp208 e Arg228) e cavidade hidrofóbica (Tyr54, Leu81, Leu85, Val89, Val91, Phe111, Ser113, Val179, Ile181, Phe191, Phe212 e Ile214) são completamente conservados nas estruturas primárias de outras lectinas da subtribo *Diocleinae* (CAVADA *et al.*, 2001). Dentre esses resíduos, há uma região de "loop" (97-102) em que se acredita ser a região que determina a especificidade por monossacarídeos das lectinas de leguminosas, podendo ser específicas à glicose/manose ou galactose (LORIS *et al.*, 1998).

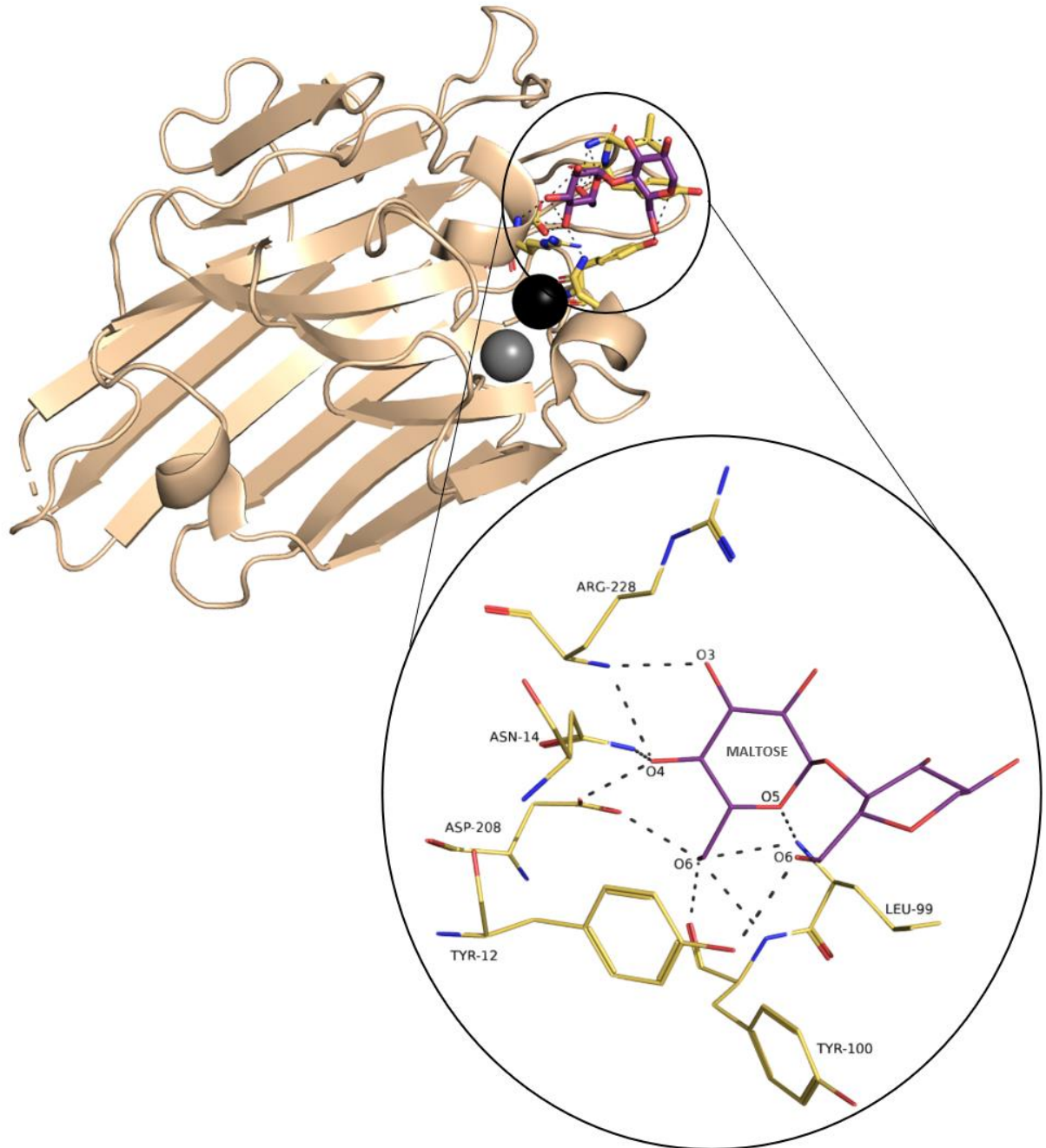
A ligação do íon metálico  $\text{Ca}^{2+}$  conduz a isomerização trans-para-cis da ligação peptídica Ala207–Asp208, que é conservada em todas as estruturas cristalinas de lectinas de leguminosas conhecidas. Esta ligação cis-peptídeo contribui para a estabilização da bolsa de ligação, orientando as posições dos resíduos Asn14 e Arg228. Cada um dos íons metálicos é coordenado por quatro cadeias laterais de aminoácidos e duas moléculas de água: Glu8, Asp10, Asp19 e His24 com  $\text{Mn}^{2+}$ ; e Asp10, Tyr12, Asn14 e Asp19 com  $\text{Ca}^{2+}$ . No caso do íon  $\text{Ca}^{2+}$ , uma das moléculas de água forma uma ponte entre o metal e o grupo carbonil da cadeia principal do Asp208, estabilizando assim a ligação incomum cis-peptídeo Ala207-Asp208 (GADELHA *et al.*, 2005).

**Tabela 2** – Estruturas da lectina de *Canavalia maritima* depositadas no *Protein Data Bank*.

<b>Código PDB</b>	<b>pH</b>	<b>T (K)</b>	<b>Complexo</b>	<b>Resolução (Å)</b>	<b>Data</b>
2CWM	7,5	293	NO	1,95	2006
2CYF	7,5	293	Maltose	1,8	2006
2CY6	7,5	293	Trealose	2,0	2006
2OW4	8,0	293	man1-2man-OMe	1,6	2007
2P37	7,0	293	man1-3man-OMe	2,1	2007
2P34	7,0	293	man1-4man-OMe	2,1	2008
3SNM	8,5	293	Indole-3-Acetic Acid	2,15	2012
4I30	8,5	293	cocristalizado com ácido gama-aminobutírico (GABA) e embebido com adenina	1,89	2012
4DPN	7,5	293	Resveratrol	2,55	2013
4TYS	-	291	dinucleotídeo	3,25	2015
4TZD	-	291	interleucina-1 beta	3,20	2015
5BYN	-	293	selenoaminoácido sintético	2,65	2015

A ConM tem um total de 12 estruturas depositadas no PDB até o ano de 2015, complexadas com diferentes moléculas químicas como pode ser consultado a partir da Tabela 2. Dentre elas, destacamos a estrutura complexada com o carboidrato maltose (2CYF) com resolução de 1,8 Å. A lectina em questão apresenta 25,5 kDa com 237 resíduos de aminoácidos por monômero, já em seu estado tetramérico constitui uma massa molecular de 102 kDa calculada por espectrometria de massa e ultracentrifugação. Essa proteína assumiu uma oligomerização biológica tetramérica e formou um dímero na célula unitária do cristal.

**Figura 6** – Representação do monômero de ConM com destaque para o sítio de reconhecimento de carboidrato com ligação ao dissacarídeo maltose.



**Nota:** Monômero de ConM na cor trigo com representação dos íons metálicos cálcio (preto) e manganês (cinza) em formato de esferas. Ampliação do sítio de reconhecimento de carboidratos composto pelos resíduos ARG-228, ASN-14, ASP-208, TYR-12, TYR-100 e LEU-99. Os resíduos interagem aos oxigênios O-3, O-4, O-5 e O-6 do dissacarídeo maltose. O resíduo de glicose externo O-6 em maltose interage com Tyr12 (2CYF). **Fonte:** Adaptado de Delatorre *et al.* (2006).

O sítio de ligação de carboidratos da ConM exibe uma rede de nove ligações de hidrogênio conectando os átomos de oxigênio da maltose O-3, O-4, O-5 e O-6 a Asn14, Leu99, Tyr100, Asp208 e Arg228. O resíduo de glicose externo O-6 em maltose interage com Tyr12 (Figura 6). A afinidade de ConM para dissacarídeos pode

ser explicada pela ligação entre Tyr12 e a segunda porção de carboidrato. Embora as interações entre os dissacarídeos e a proteína estejam concentradas em uma das duas porções de açúcar, a ligação recorrente à segunda porção é responsável pela redução da concentração de carboidratos necessária para formar o complexo de cristal, uma vez que estabiliza a interação na superfície da proteína, construindo um local estendido de ligação a carboidratos (DELATORRE *et al.*, 2006).

### **2.3.3 Atividades biológicas da lectina de *Canavalia maritima***

As plantas são de primordial importância no ecossistema global. Devido ao seu aparato fotossintético, conversão de energia luminosa em energia química por meio da assimilação redutiva do dióxido de carbono, são capazes de coletar e armazenar energia solar. Praticamente quase todas as outras formas de vida na Terra dependem das moléculas orgânicas que elas sintetizam, tornando-as alvos favoritos de uma grande variedade de parasitas e predadores, nisso as plantas devem se defender contra seus inimigos potenciais (PEUMANS; VAN DAMME, 1995b).

Desde o descobrimento das lectinas, os cientistas ficaram intrigados com seus potenciais papéis. Com o avanço das pesquisas científicas viu-se que a maioria das lectinas vegetais podem não apenas desempenhar um papel na própria planta, por exemplo, como um estoque de nitrogênio ou como um fator de reconhecimento específico, mas também com a propriedade de interagir com glicoconjugados de outros organismos, interferindo com o funcionamento normal desse organismo. Logo, essa associação de lectinas com as partes da planta que são mais suscetíveis ao ataque de organismos estranhos também é um argumento para um papel protetor. Embora toda a planta esteja exposta a uma ameaça contínua de pragas e doenças, alguns tecidos ou órgãos precisam de proteção extra, como sementes e órgãos de armazenamento em repouso, os quais são os mais atraentes para parasitas e predadores. (PEUMANS; VAN DAMME, 1995a). Como mencionado anteriormente, as sementes de leguminosas são uma rica fonte dessas proteínas (CARRINGTON; AUFFRET; HANKE, 1985).

As plantas não possuem um sistema imunológico para defesa contra vírus e microrganismos patogênicos, bem como sua imobilidade não pode evitar ou escapar de um ataque de predadores. Sendo assim, no curso da evolução desenvolveram mecanismos de defesa que são considerados como ativos e passivos. Um exemplo



de mecanismo de defesa ativo é a reação de hipersensibilidade caracterizada por uma necrose rápida e localizada no local da infecção. Esses organismos apresentam uma infinidade de sistemas de defesa passivos como barreiras físicas e adaptações morfológicas, como paredes celulares espessas, tegumentos de sementes e espinhos atuando como obstáculos para a penetração de patógenos. Outros sistemas de defesa passivos são baseados em adaptações bioquímicas como o acúmulo de saponinas, alcaloides e compostos fenólicos, bem como proteínas tóxicas. Logo, a maioria das lectinas vegetais são proteínas de armazenamento que, além disso, têm um papel potencialmente defensivo caso a planta seja atacada (PEUMANS; VAN DAMME, 1995b). Desde que a planta ou a semente não sejam atacadas, as lectinas se comportam como proteínas de armazenamento genuínas cumprindo um papel endógeno.

Apesar do amplo conhecimento sobre a biologia molecular e estrutura das lectinas, seu papel fisiológico em relação à planta ainda não é bem compreendido. Uma ênfase maior é dada aos eventos que ocorrem fora da célula vegetal, especialmente pelas lectinas de leguminosas, uma vez que se ligam de maneira mais eficaz a oligossacarídeos que não estão presentes nas plantas (HOFF; BRILL; HIRSCH, 2009). Sendo assim, pode-se destacar algumas atividades biológicas envolvendo lectinas como a atividade anticâncer, uma vez que a transformação maligna está intimamente associada a glicanos alterados da superfície celular. Nesse sentido, as lectinas podem representar uma ferramenta valiosa para o diagnóstico do câncer e serem desenvolvidas para uso em terapias anticâncer. Mazalovska e colaboradores destacaram algumas proteínas com esse efeito podendo induzir vias apoptóticas e autofágicas nas células malignas. Os extratos de visco são amplamente aplicados no tratamento do câncer na Europa, com propriedades antineoplásicas e indutoras de apoptose, bem como características imunoestimulatórias e antiangiogênicas. Apesar das características anticâncer das lectinas, existem poucas desvantagens que dificultam seu desenvolvimento para a terapia do câncer, (MAZALOVSKA; KOUOKAM, 2020). Lectinas podem ser utilizadas ainda para isolar glicoproteínas a partir de cromatografia de afinidade, um exemplo é a ConA (WU *et al.*, 2019). Nesse trabalho de revisão, os autores descrevem as inúmeras atividades biológicas já reportadas para as lectinas de plantas. Além das citadas, relataram sobre atividades antivirais, anti-insetos, antiparasíticas, antibacterianas, bem como

aplicações avançadas como tipagem sanguínea, produção de vacinas e delivery de drogas (MISHRA *et al.*, 2019).

Como o foco desse estudo é acerca da ConM, apresenta-se em seguida as atividades já reportadas para essa proteína. Apesar das lectinas de leguminosas serem altamente homólogas, uma função comum não pode ser atribuída a elas, uma vez que parâmetros individuais como especificidades de carboidratos, localização e tempo de aparecimento diferem. Portanto, toda descrição de uma função requer evidências claras que não podem ser substituídas por considerações de analogia. As principais linhas de ideias atuais nesta área são divididas em dois grupos: um em que a lectina se liga a ligantes de fontes estranhas, como agressores ou simbioses animais, fúngicos ou bacterianos, e outro em que uma lectina interage com ligantes da planta (RUDIGER; GABIUS, 2001).

Gomes e colaboradores analisaram a capacidade de liberar histamina de células peritoniais de mastócitos de ratos a partir de diferentes espécies de lectinas, dentre elas a ConM, comparando-as com a ConA. Assim como ConA, as lectinas de *C. brasiliensis* (ConBr), *D. rostrata* e *D. virgata* apresentaram potência e eficácia suficientes para serem utilizadas em estudos de liberação de histamina, enquanto que as lectinas ConM e de *D. guianensis* apresentaram menor potência e eficácia. As lectinas de *D. grandiflora*, *C. bonariensis* e *C. floribunda* produziram um nível muito baixo de liberação de histamina. Embora as lectinas estudadas pertençam à mesma tribo e apresentem alto grau de homologia (80-90%) com relação às suas estruturas primárias, diferiram fortemente em potência e eficácia quanto à liberação histamínica. Essas diferenças podem ser explicadas por diferentes sítios de afinidade que se ligam aos alvos que desencadeiam os efeitos biológicos, sugerindo que lectinas com propriedades físico-químicas muito semelhantes podem atuar de forma diferente em relação ao mesmo sistema biológico, provavelmente devido a diferenças na especificidade dos açúcares (GOMES *et al.*, 1994).

A ConM tem efeito relaxante na aorta de ratos por meio da ativação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), responsável pela formação do óxido nítrico (NO). Esse efeito é três vezes maior que o de ConA (GADELHA *et al.*, 2005). ConA inibiu 100% o crescimento de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguis* na concentração de 125 µg/mL, enquanto que ConM foi incapaz de inibir na mesma concentração. Por outro lado, ConM a 100 µg/mL inibiu significativamente a formação de biofilme de *S.*

*mutans* e *S. sanguis*, enquanto ConA foi incapaz de inibir em qualquer concentração testada (BEZERRA *et al.*, 2007).

ConM, ConBr e CGL foram analisadas quanto ao efeito vasodilatador em modelos de ratos com edema de pata e aorta isolada. O edema induzido por CGL e ConBr envolve infiltrado celular, enquanto que o de ConM é exclusivamente osmótico. A atividade de CGL e ConBr foi revertida por seus açúcares específicos. Diferentes respostas inflamatórias e vaso relaxantes foram relatadas, sendo a principal diferença encontrada para ConM em atividade ou potência. A comparação das estruturas primárias aponta que ConM difere de ConBr em cinco resíduos (Val129/Met129, Asp151/Glu151, Glu155/Arg155, Asp192/Glu192 e Ser202/Pro202) e de CGL em apenas três (Ser21/Asn21, Val129/Met129 e Ser202/Pro202). Dentre eles, apenas Ser202 pode ser relacionado ao sítio de ligação de carboidratos (DELATORRE *et al.* 2006; BEZERRA *et al.* 2007) e a substituição do Pro202 por Ser202 em ConM, foi relatada como sendo responsável pelo aumento significativo na capacidade de ligação de carboidratos, resultando em diferenças na atividade relaxante comparado às lectinas com o resíduo Pro202 (DELATORRE *et al.*, 2006; GADELHA *et al.*, 2005).

A ação inibitória e antibiofilme de lectinas da subtribo *Diocleinae* (ConA, ConBr, ConM, CGL e ConBol) contra *Streptococcus mutans* e *Streptococcus oralis* foi investigada. Os ensaios de inibição do crescimento bacteriano revelaram que *S. mutans* foi inibido por ConBol, ConBr e ConM, enquanto ConA e CGL estimularam o crescimento de *S. mutans* quando comparados ao controle. Vale ressaltar, que o sítio de ligação de carboidratos dessas lectinas é bastante semelhante e diverge ligeiramente de ConA e CGL. Essa divergência está ligada especialmente às distâncias entre as cadeias laterais de aminoácidos que compõem o DRC, principalmente na redução da profundidade do local (Arg228-Tyr12 e Arg228-Asn14) e da abertura (Tyr100-Tyr12 e Tyr12-Tyr14) do sítio. A abertura e profundidade permitem distinguir o grupo inibitório formado por ConBol, ConBr e ConM e o grupo estimulador composto por ConA e CGL em ações contra *S. mutans* nas concentrações e nas condições estabelecidas. Para *S. oralis* todas as lectinas, exceto ConA, tiveram efeito estimulador na mesma concentração (500 µg/mL). A preferência de ConBol, ConBr e ConM para se ligar e inibir especificamente *S. mutans* pode ser explicada pela redução do sítio primário de ligação a carboidratos, aumentando-se assim a especificidade por epítomos específicos de carboidratos. Essas substâncias podem ser utilizadas como uma nova possibilidade de terapia

biotecnológica para pacientes com alto número de estreptococos, agindo como um tratamento biológico, indicando um novo caminho para a prevenção da cárie, uma vez que as espécies testadas estão entre as espécies bacterianas detectadas na cavidade, sendo associadas as cáries (CAVALCANTE *et al.*, 2011).

A partir do estudo de avaliação da atividade anti-inflamatória das lectinas ConM, ConBr e CGL por administração intravenosa em ratos não sensibilizados e sensibilizados, pode-se verificar que ConM e CGL têm propriedade anti-inflamatória, principalmente em eventos celulares mediados por prostaglandina E<sub>2</sub>, óxido nítrico e TNF- $\alpha$  em ratos não sensibilizados. No entanto, apenas ConM é anti-inflamatório em ratos sensibilizados. A propriedade anti-inflamatória do CGL envolve o domínio da lectina, uma vez que ao ser injetada junto com o seu açúcar ligante o efeito anti-inflamatório foi alterado. Enquanto que, o efeito anti-inflamatório de ConM sugere ser por um mecanismo independente do DRC, reforçando a peculiaridade da proteína em relação às diferenças em seus resíduos de aminoácidos (PINTO *et al.*, 2013). Ambas proteínas seguiram o perfil de respostas para *Diocleinae* na inflamação, anti-inflamatórias por aplicação sistêmica e inflamatórias por administração local (ASSREUY *et al.*, 2009), com exceção da ConBr que não apresentou efeito anti-inflamatório.

A atividade antiproliferativa das lectinas ConBr, ConM, DLasiL (*Dioclea lasiocarpa*) e DSclerL (*Dioclea sclerocarpa*) em relação a uma variedade de linhas de células de câncer de mama (MCF-7), ovário (A2780), pulmão (A549) e próstata (P53) humano foi investigada. Em geral, todas as lectinas mostraram potente atividade anticâncer em relação ao A2780, A549 e linhas celulares P53, com valores de IC<sub>50</sub> na faixa nanomolar variando de 52 a 529. Vale destacar que a ConM, especificamente, exibiu os valores mais baixos de IC<sub>50</sub> de 67 $\pm$ 2 e 62 $\pm$ 40 para A2780 e A549, respectivamente (GONDIM *et al.*, 2017).

É sabido que o Brasil constitui uma das maiores biodiversidades do mundo, nisso tem-se buscado cada vez mais novos produtos extraídos da flora brasileira com potencial para tratar, por exemplo, doenças infecciosas. Nesse estudo, foi investigado o potencial de lectinas de leguminosas e algas extraídas e purificadas da flora do Nordeste brasileiro contra um arsenal de diferentes tipos de vírus. Verificou-se que as lectinas de leguminosas provavelmente bloqueiam a adsorção do vírus na etapa de infecção, presumivelmente por ligação a gp120/gp41, glicoproteínas do envelope do HIV-1, sugerindo que essas glicoproteínas de superfície sejam os alvos antivirais para

as lectinas. As lectinas de algas foram menos eficazes no bloqueio da atividade do HIV-1. Essas diferenças notáveis entre as lectinas de algas e de leguminosas ilustram as diferentes propriedades de reconhecimento seletivo das lectinas, além do mais apresentam-se em forma monomérica e tetramérica, respectivamente. Essa diferença estrutural pode proporcionar maior grau de interação as lectinas tetraméricas com seus glicanos alvo em comparação com as lectinas monoméricas. Em especial, ConM exibiu alta atividade contra os vírus da influenza com valores de  $CE_{50}$  entre 0,2 e 1,5 nM. Entretanto, foi notado um alto grau de seletividade em relação ao vírus da gripe A (subtipo H3N2) com atividade cerca de 50 vezes maior do que a gripe A (subtipo H1N1) (GONDIM *et al.*, 2018).

Em suma, vários fatores podem contribuir para essas diferenças nas atividades: como a oligomerização dependente do pH que algumas dessas lectinas apresentam e a posição relativa do sítio de ligação do carboidrato (WAH *et al.*, 2001), bem como pequenas alterações nos resíduos localizados em posições-chave em relação à associação quaternária (BRINDA; MITRA; SUROLIA, 2004).

## 2.4 Auxinas

Assim como os animais, as plantas utilizam diversos sinais químicos extracelulares para a comunicação entre células, conhecidos como hormônios, que atuam sobre o desenvolvimento e o crescimento do organismo. As auxinas, por sua vez, fazem parte de uma classe de hormônios vegetais que estão incluídos em uma gama de processos de crescimento e desenvolvimento de plantas. Esses processos incluem divisão celular, crescimento celular e diferenciação celular, os quais são a base de muitos tipos de organogênese e respostas de crescimento (LEYSER, 2018). O termo auxina é derivado da palavra grega *auxein*, que tem como significado “crescer” (FRICK; STRADER, 2018).

As auxinas de ocorrência natural são compostas por moléculas aromáticas com frações de ácido carboxílico: ácido indol-3-acético (AIA), ácido indol-3-butírico (AIB), ácido 4-cloroindol-3-acético (4-CI-AIA) e ácido fenilacético (AFA). As auxinas AIB e AIA são quase idênticas, diferenciam-se apenas na quantidade de carbonos da cadeia lateral, uma vez que AIB carrega quatro carbonos e AIA carrega apenas dois carbonos (Figura 7). Plantas superiores podem armazenar AIA na forma de conjugados de AIA e AIB, que pode fornecer AIA livre após hidrólise ou  $\beta$ -oxidação, respectivamente. O AIB é mais eficaz do que o AIA na indução da raiz lateral, talvez

porque, o AIB induz eficientemente as raízes laterais em concentrações que inibem apenas minimamente o alongamento da raiz (ZOLMAN; YODER; BARTEL, 2000). A ocorrência de AIB em angiospermas filogeneticamente diversas sugere um papel conservado desse hormônio na homeostase das auxinas. O transporte direcional de AIB nas raízes, hipocótilos e outros tecidos indica a existência de transportadores ativos de AIB, e as diferenças entre o transporte de AIB e AIA demonstra que o AIB pode usar transportadores distintos daqueles usados para mover AIA (STRADER; BARTEL, 2011).

Assim, parece provável que a conversão de AIB desempenhe papéis no crescimento e desenvolvimento da planta que não podem ser facilmente compensados por outras vias, caso contrário, esperaríamos que esse caminho se perdesse, pelo menos em algumas espécies (FRICK; STRADER, 2018). Além de ser uma forma de armazenamento de AIA, o AIB através de sua conversão em AIA também pode desempenhar um papel importante na geração de concentrações máximas de AIA durante o desenvolvimento ou respostas ao estresse. Ainda não se sabe, se AIB pode induzir respostas que são parciais ou completamente independentes do AIA, entretanto não foi encontrada nenhuma via biossintética independente de AIA para AIB, logo provavelmente os níveis de AIB dependem dos níveis de AIA, sugerindo que AIB seja ativo somente após a conversão em AIA (SIMON; PETRÁŠEK, 2011).

A distribuição de auxina nativa, normalmente AIA, no corpo da planta é realizada em distâncias curtas e longas. Essas moléculas podem se mover por longas distâncias através do sistema vascular, isto é, através do floema, desde os tecidos de origem até as raízes, por fluxo de massa. Pode se mover ainda a partir do mecanismo célula a célula o qual é principalmente polar. Como todas as auxinas são ácidos fracos, podendo se apresentar na forma próton-dissociada ou não-dissociada, sua capacidade de penetrar através da membrana depende do pH. Em plantas, o pH apoplástico é de aproximadamente 5,5 e nesse pH, o equilíbrio das moléculas de AIA ( $pK_a = 4,85$ ) é calculado como sendo aproximadamente 83% dissociado (aniônico,  $A^-$ ) e 17% não dissociado (HA). Logo, apenas as moléculas não dissociadas podem entrar na célula por difusão lipofílica através da membrana plasmática sem assistência de uma proteína transportadora. Sendo assim, existe a necessidade de transporte ativo de moléculas de auxina, mais precisamente ânions, para fora das células. Vale

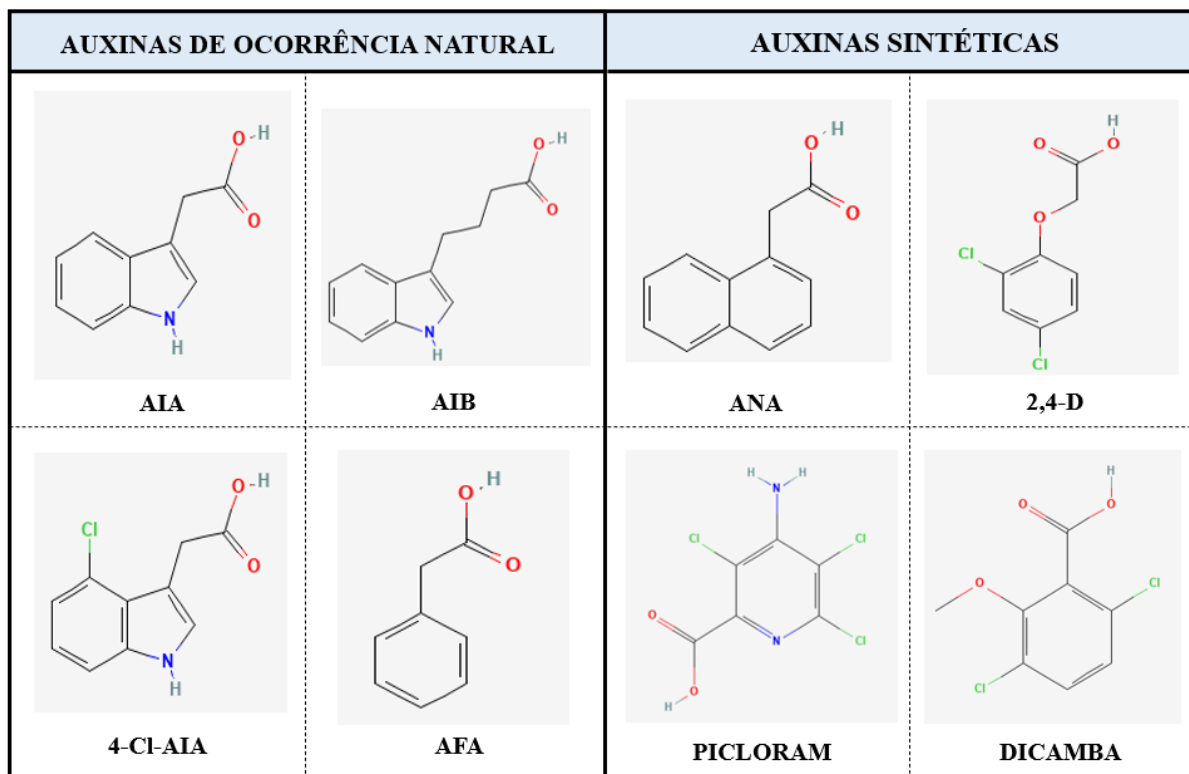
ressaltar que existem inúmeros transportadores de auxinas já reportados na literatura (ZAŽÍMALOVÁ *et al.*, 2010).

Há alguns tipos de reguladores de crescimento de plantas sintéticos com atividade semelhante à auxina que foram descritos como o ácido 1-naftalacético (ANA), 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzóico (Dicamba) e ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (Picloram). Ambos compostos exercem influências semelhantes às da auxina, incluindo a inibição do alongamento da raiz e promoção lateral da raiz (KORASICK; ENDERS; STRADER, 2013; WOODWARD; BARTEL, 2005). Alguns desses são utilizados como herbicidas, os quais caracterizam-se como sendo agroquímicos que são utilizados para controlar o crescimento de plantas daninhas indesejadas, visando aumentar a produtividade das culturas. Estes podem ser **não seletivos**, usados para matar ou danificar todo o crescimento e geralmente é reservado para uso agrícola ou para limpar áreas grandes ou muito cobertas de vegetação, ou **seletivos**, usados para controlar certos tipos de ervas daninhas, e geralmente funciona através de algum tipo de interrupção hormonal. As auxinas sintéticas são usadas, especificamente, como herbicidas seletivos (SONG, 2013). Os sintomas induzidos em plantas são semelhantes aos induzidos por altas doses exógenas da auxina natural. Em baixas doses, promovem o crescimento das plantas, enquanto em altas doses estimula o crescimento excessivo das plantas, incluindo escavação e atrofia das folhas, fragilidade, atrofia e torção dos caules e crescimento anormal geral (GROSSMANN, 2009). Em resumo, os efeitos das auxinas dependem de sua concentração. As plantas que crescem em alta concentração formam raízes mais curtas e mais grossas. As barreiras apoplásmicas nas raízes se desenvolvem mais perto do ápice da raiz. A auxina, em baixas concentrações, afeta o crescimento radicular, sem sintomas de estresse. Plantas estressadas, cultivadas em altas concentrações de auxina, contêm uma porção maior de celulose e uma porção maior de lignina no complexo lignocelulósico em comparação com plantas estimuladas (ŠÍPOŠOVÁ *et al.*, 2019).

O 2,4-D, auxina em estudo neste trabalho, é uma pequena molécula sintética que as plantas não podem degradar *in vivo*, no entanto, membros de uma classe de enzimas bacterianas ariloxialcanoato dioxigenases (AADs) podem clivar eficientemente essa auxina em diclorofenol não herbicida e glioxilato (WRIGHT *et al.*, 2010). De acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos EUA (EPA), o 2,4-D mata as plantas, principalmente, de três maneiras: alterando a plasticidade das paredes

celulares, influenciando a quantidade de produção de proteínas e aumentando a produção de etileno.

**Figura 7** – Estrutura de auxinas naturais e sintéticas.



**Nota:** As estruturas 2D das auxinas foram obtidas a partir do PubChem com os seguintes códigos de referência: AIA (802), AIB (8617), 4-Cl-AIA (100413), PAA (999), ANA (6862), 2,4-D (1486), PICLORAM (15965) e DICAMBA (3030).

Embora muitos compostos naturais e sintéticos exibam atividade semelhante à auxina em bioensaios, o AIA é reconhecido como a auxina chave na maioria das plantas. O AIA é sintetizado tanto a partir de triptofano (Trp) usando vias dependentes de Trp, o qual é produzido pela via do chiquimato nos plastídios, quanto a partir de um precursor indólico de Trp usando vias independentes de Trp. A síntese envolve vários caminhos, sendo a via IPyA (ácido indol-3-pirúvico) a rota predominante para síntese de AIA em plantas. Essa via consiste em uma reação de duas etapas, resumidamente, em que o Trp é primeiramente desaminado para IPyA e depois IPyA é então descarboxilado a AIA em uma reação irreversível e limitante de velocidade catalisada por monooxigenases contendo flavina da família YUCCA (MASHIGUCHI *et al.*, 2011; STEPANOVA *et al.*, 2011). Acredita-se que as principais rotas para biossíntese e degradação do AIA ocorram no citosol, pelo fato da maioria das enzimas envolvidas



compartilharem localização citoplasmática. Juntamente com o transporte direcional e a biossíntese local, a inativação metabólica do AIA também modula as concentrações de auxina nas células e tecidos vegetais. A maioria do AIA em plantas existe como conjugados inativos e formas de éster metílico que podem ser reversivelmente convertidos em AIA (formas de armazenamento de auxina), para ajustar rapidamente os níveis de auxina sem a necessidade de síntese de novo; e como AIA inativo irreversível (catabólicos de auxina), que é o resultado da remoção do excesso de auxina ou de uma resposta regulada para criar mínimos de auxina (CASANOVA-SÁEZ; MATEO-BONMATÍ; LJUNG, 2021). As plantas também podem obter AIA por  $\beta$ -oxidação do AIB ou por hidrolisação de conjugados de AIA, nos quais o AIA está ligado a aminoácidos, açúcares ou peptídeos (KORASICK; ENDERS; STRADER, 2013).

Em 2013, foi relatado o primeiro trabalho sobre a interação de lectina a partir da ConM com AIA. Verificou-se que o local do ligante AIA em ConM é cercado por Ser108 e Asn131. A capacidade de ConM de interagir com AIA pode ser uma estratégia para tornar o fitohormônio indisponível para a célula para proteger as radículas de sua atividade inibitória. Assim, este novo papel fisiológico proposto para as lectinas de leguminosas pode ser um novo mecanismo, além da destruição e formação de novos complexos, pelos quais os níveis de AIA podem ser diminuídos nas fases posteriores da germinação das sementes. Além do mais, níveis altos de AIA induzidos por uma classe de patógenos conhecidos como BIPS (Produtores de ácido acético indol bacteriano) podem estar relacionados com o desenvolvimento de doenças em várias espécies de plantas, nisso os autores sugeriram que a capacidade das lectinas de interagir com AIA também poderia ser um mecanismo de defesa contra esses patógenos (DELATORRE *et al.*, 2013).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Caracterizar estruturalmente o sítio de ligação a auxinas da lectina de *Canavalia maritima* (ConM) complexado aos hormônios vegetais ácido indol-4-butírico (AIB) e 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Cristalizar a ConM complexada com os hormônios AIB e 2,4-D;
- Difratar e obter conjuntos de dados de difração dos complexos;
- Resolver a estrutura dos complexos;
- Analisar comparativamente a ligação de auxinas à diferentes lectinas.

#### 4 ARTIGO DA TESE

**Structural analysis of *Canavalia maritima* lectin complexed with natural and synthetic auxins**

1     **Structural analysis of *Canavalia maritima* lectin complexed with natural and**  
2                             **synthetic auxins**

3  
4     Jucilene P. de Sousa<sup>a</sup>, Eduardo H.S. Bezerra<sup>b</sup>, Misrael V. Sales<sup>a</sup>, Patricia P. de  
5     Queiroz<sup>a</sup>, Francisca M. S. da Silva<sup>c</sup>, João P. F. Queiroz<sup>a</sup>, Cristina P. S. Carvalho<sup>a</sup>,  
6     Valder N. Freire<sup>d</sup>, Bruno A. M. Rocha<sup>a\*</sup>

7  
8     <sup>a</sup>Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará,  
9     Campus do Pici, Zip Code 60451-970, Fortaleza, Ceará, Brazil.

10    <sup>b</sup>Laboratório Nacional de Biociências, Centro Nacional de Pesquisas em Energia e  
11    Materiais, Campinas, São Paulo, Brazil.

12    <sup>c</sup>Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Ceará, Fortaleza,  
13    Brazil.

14    <sup>d</sup>Departamento de Física, Universidade Federal de Ceará, Fortaleza, Brazil.

15    \*Corresponding author; E-mail: bruno.rocha@ufc.br

16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32

33 **Abstract**

34 Auxins are a class of phytohormones that are included in a range of plant growth and  
35 development processes. These processes include cell division, cell growth, and cell  
36 differentiation, which underlie many types of organogenesis and growth responses.  
37 Natural auxins are composed of aromatic molecules with carboxylic acid moieties such  
38 as indole-3-butyric acid (IBA) and there are still some synthetic growth regulators with  
39 auxin-like activity such as 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). Considering that  
40 legume lectins are also involved plant growth and development, the objective of this  
41 work was to characterize the interaction of *Canavalia maritima* (ConM) lectin with the  
42 phytohormones IBA and 2,4-D. To achieve these goals, ConM lectin was co-  
43 crystallized with IBA/2,4-D and solved at 1.8 and 1.6 Å resolution, respectively. IBA  
44 formed hydrogen bond with Asn131 and established van der Waals interactions with  
45 Thr49 and 2,4-D formed hydrogen bonds with Thr49/Ser110 and van der waals  
46 interactions with Thr49/Asn131. Although bind at the same binding site in ConM  
47 compared to IAA in ConM and ConBr (*Canavalia brasiliensis*), their orientations  
48 differed briefly in relation to the type of bond, distance and amino acid residues  
49 involved. The similarity between the sequences of *Canavalia* lectins allow us to affirm  
50 the conservation of the auxin binding site in this group of lectins. The difference  
51 between the interactions described may be evidence of the different ability to modulate  
52 the concentrations of auxins (expression and synthesis) available in the early stages  
53 of development.

54 **Keywords:** Indole-3-butyric acid; 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; phytohormone;  
55 legume lectins; x-ray crystallography.

56

57

## 58 1. Introduction

59 Research on plant lectins began over 130 years ago. Since then, many  
60 biochemists and molecular biologists have been intrigued by this specific group of  
61 carbohydrate-binding proteins. These lectin research focused most effectively on the  
62 study of legume lectins for several decades, thus making it the most studied group due  
63 to the great abundance and easy to purify (SHARON; LIS, 2002; VAN DAMME, 2021),  
64 as well as the high structural similarity with lectins from other sources (SHARON; LIS,  
65 2002).

66 Among legume lectins, ConA, isolated from *Canavalia ensiformis* seeds, was  
67 the first lectin to be isolated (SUMNER; HOWELL, 1936), sequenced (CUNNINGHAM  
68 *et al.*, 1975; WANG *et al.*, 1975) and to have its three-dimensional structure determined  
69 by X-Ray Crystallography (HARDMAN; AINSWORTH, 1972). From then on, many  
70 legume lectins began to be studied, such as the lectin from *Canavalia maritima*  
71 (ConM). Both have high homology, differing in only five amino acid residues, consisting  
72 of 237 amino acid residues per monomer (~25 kDa), a carbohydrate recognition  
73 domain (CRD) and metal-binding sites by divalent cations such as calcium (Ca<sup>2+</sup>) and  
74 manganese (Mn<sup>2+</sup>) (LAGARDA-DIAZ; GUZMAN-PARTIDA; VAZQUEZ-MORENO,  
75 2017). The quaternary structure appears in the form of a tetramer with a total molecular  
76 mass of 102 kDa with all identical subunits (GADELHA *et al.*, 2005).

77 In legumes, specifically, seeds are a rich source of lectins (INGALE; HIVRALE,  
78 2013; LORIS *et al.*, 1998; VAN DAMME, 2021). It is known that seeds and resting  
79 storage organs are more attractive to parasites and predators (PEUMANS; VAN  
80 DAMME, 1995a). Therefore, the association of lectins with plant parts more  
81 susceptible to attack by foreign organisms may be an argument for a possible  
82 protective role.

83 Like animals, plants use several extracellular chemical signals for  
84 communication between cells, known as hormones, which act on the development and  
85 growth of the organism. Auxins, in turn, are a class of phytohormones that are included  
86 in a range of plant growth and development processes. These processes include cell  
87 division, cell growth, and cell differentiation, which underlie many types of  
88 organogenesis and growth responses (LEYSER, 2018). Natural auxins are composed  
89 of aromatic molecules with carboxylic acid moieties such as indole-3-acetic acid (IAA)  
90 and indole-3-butyric acid (IBA). There are still some synthetic growth regulators with

91 auxin-like activity such as 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) (WOODWARD;  
92 BARTEL, 2005).

93         Despite the extensive knowledge about the molecular biology and structure of  
94 lectins, their physiological role in relation to the plant is still not well understood. Greater  
95 emphasis is given to events that occur outside the plant cell, especially legume lectins,  
96 as they bind more effectively to oligosaccharides that are not present in plants (HOFF;  
97 BRILL; HIRSCH, 2009). In recent years, some works have been developed in order to  
98 investigate the interaction of lectins with hormones. The first structure with auxins was  
99 determined by Delatorre *et al.* (2013) from the interaction of ConM with IAA and more  
100 recently was published also ConBr (*Canavalia brasiliensis*) complexed with this  
101 phytohormone (SALES, 2019), hypothesizing that the lectin interaction with different  
102 forms of IAA is a strategy to render the phytohormone unavailable to the cell to protect  
103 radicles from its inhibitory activity. Therefore, this study aims to investigate the  
104 interaction of ConM with the hormones IBA and 2,4-D through the crystal structure  
105 complexes, which will completely describe the auxin binding site in these proteins and  
106 contribute to the deepening of the discussion about the interaction of lectins with plant  
107 hormones.

108

## 109 **2. Materials and methods**

### 110 **Extraction and purification of ConM**

111         *Canavalia maritima* seeds were collected on Fortaleza, Ceará, Brazil.  
112 Collections were authorized through our registration with SISGEN (Sistema Nacional  
113 de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado, ID:  
114 AFD4698). The fine powder of seed from *C. maritima* was obtained in a coffee grinder  
115 and the soluble proteins were extracted by continuous stirring with 0.15 M NaCl [1:10  
116 (w:v)] for 3 h at 298 K, followed by centrifugation at 10,000 ×g at 277 K for 30 min.  
117 Protein purification was carried out by the affinity chromatography using a Sephadex  
118 G-100 column (3x15cm) by protocol previously described (CECCATTO *et al.*, 2005).  
119 Protein fraction was lyophilized, purity-tested by SDS-PAGE and used in crystallization  
120 experiments. The assays for the detection of hemagglutinating activity were carried out  
121 adapting the protocol described by Moreira and Perrone (MOREIRA; PERRONE,  
122 1977). The sample was prepared using 0.15 M NaCl saline with 2 mg/mL ConM, then  
123 applied to a serial dilution process. The mixture was incubated with an equal volume  
124 of 2% erythrocyte suspension for 60 min.

## 125 **Crystallization and X-ray diffraction**

126 Solutions of 0.5 mM ConM with IBA and 2,4-D 5mM were prepared and set  
127 aside for 16 h at 4°C. This solution was used to assemble the hanging drop system  
128 using the crystallization condition 100mM Hepes, pH 8.5, 2M Ammonium Sulfate, PEG  
129 400 (4%). The crystals were diffracted in the synchrotron light source with a wavelength  
130 of 1.43 Å at 100 K, using crystallization condition with 25% glycerol as cryoprotectant  
131 to avoid ice formation, at MX2 beamline of the Brazilian Synchrotron Light Laboratory  
132 (LNLS, Campinas, Brazil) using a DECTRIS PILATUS 2M placed at 100 mm from the  
133 crystal. Diffraction data were indexed, integrated and scaled using XDS (KABSCH,  
134 2010) and SCALA (EVANS, 2011).

## 135 **X-ray structure determination**

136 The crystal structure of ConM/IBA and ConM/2,4-D were determined by  
137 molecular replacement using Phaser (MCCOY *et al.*, 2007). The phases were obtained  
138 from the atomic coordinates of a previously deposited ConM structure with PDB  
139 (Protein Data Bank) code 2OW4 and auxin molecules IBA and 2,4-D obtained by  
140 PubChem ID 8617 and 1486 (Fig. S1). The restrained refinement of initial structure  
141 was done using Phenix (ADAMS *et al.*, 2010) and positional refinement of the model  
142 was done using COOT (EMSLEY; COWTAN, 2004). The stereochemistry of the  
143 structure was avalied using a Ramachandran plot analysis by Molprobity (CHEN *et al.*,  
144 2010), allowing the analysis of the  $\phi$  and  $\psi$  angles and the root mean square deviation  
145 of the bonds. The graph confirmed the absence of residues in disallowed regions, and  
146 the deviations were within normal range. The molecular replacement and refinement  
147 data are shown in Table 1. All structural figures were generated using PyMOL  
148 (Schrödinger, LLC, 2020). The atomic coordinates for the structures were deposited in  
149 the PDB with the access code 7UN2 from ConM/IBA and 7UOD from ConM/2,4-D.

## 150 **Structural comparative study**

151 The obtained complexes were aligned with the previously deposited structures  
152 of lectins complexed with IAA: ConM (PDB code 3SNM) and ConBr (PDB code 6VB8)  
153 using the PyMOL software. Sequence alignment of the ConM with eight lectins of the  
154 genus *Canavalia* (*ensiformis-ConA*, *brasiliensis-ConBr*, *boliviana-Cbol*, *gladiata-CGL*,  
155 *virosa-ConV*, *lineata-CaLi*, *grandifora-ConGF*, *bonariensis-CaBo*), one lectin of the  
156 genus *Camptosema* (*pedicellatum-CPL*), two lectins of the genus *Cratylia* (*mollis-*  
157 *Cramoll* and *foribunda-CFL*), one lectin of the genus *Cymbosema* (*roseum-CRLI*) and



158 eleven lectins of the genus *Dioclea* (*virgata-DvirL*, *lasiocarpa-DLL*, *lasiophylla-Dlyl*,  
159 *guianensis-Dguia*, *rostrata-DRL*, *grandifora-DGL*, *altissima-DAL*, *sclerocarpa-DSL*,  
160 *refexa-DrfL*, *wilsonii-DwL*, *violácea-DVL*) with deposited structures in the PDB. The  
161 analyzes were performed in the R programming language (version 4.1.1). Therefore,  
162 the structures were downloaded from the PDB through functions of the Bio3D package  
163 (version 2.4-3) (GRANT *et al.*, 2006; GRANT; SKJÆRVEN; YAO, 2021; SKJAERVEN  
164 *et al.*, 2014). The sequence alignment used the MUSCLE software (EDGAR, 2004) as  
165 an external application in the R language and the msaR package (version 0.6.0) was  
166 used for exploratory alignment analysis. Alignment plot with the residues involved in  
167 the interaction with highlighted auxins was generated using the ggmsa package  
168 (version 1.3.3).

169

### 170 **3. Results**

#### 171 **Purification and hemagglutinating activity**

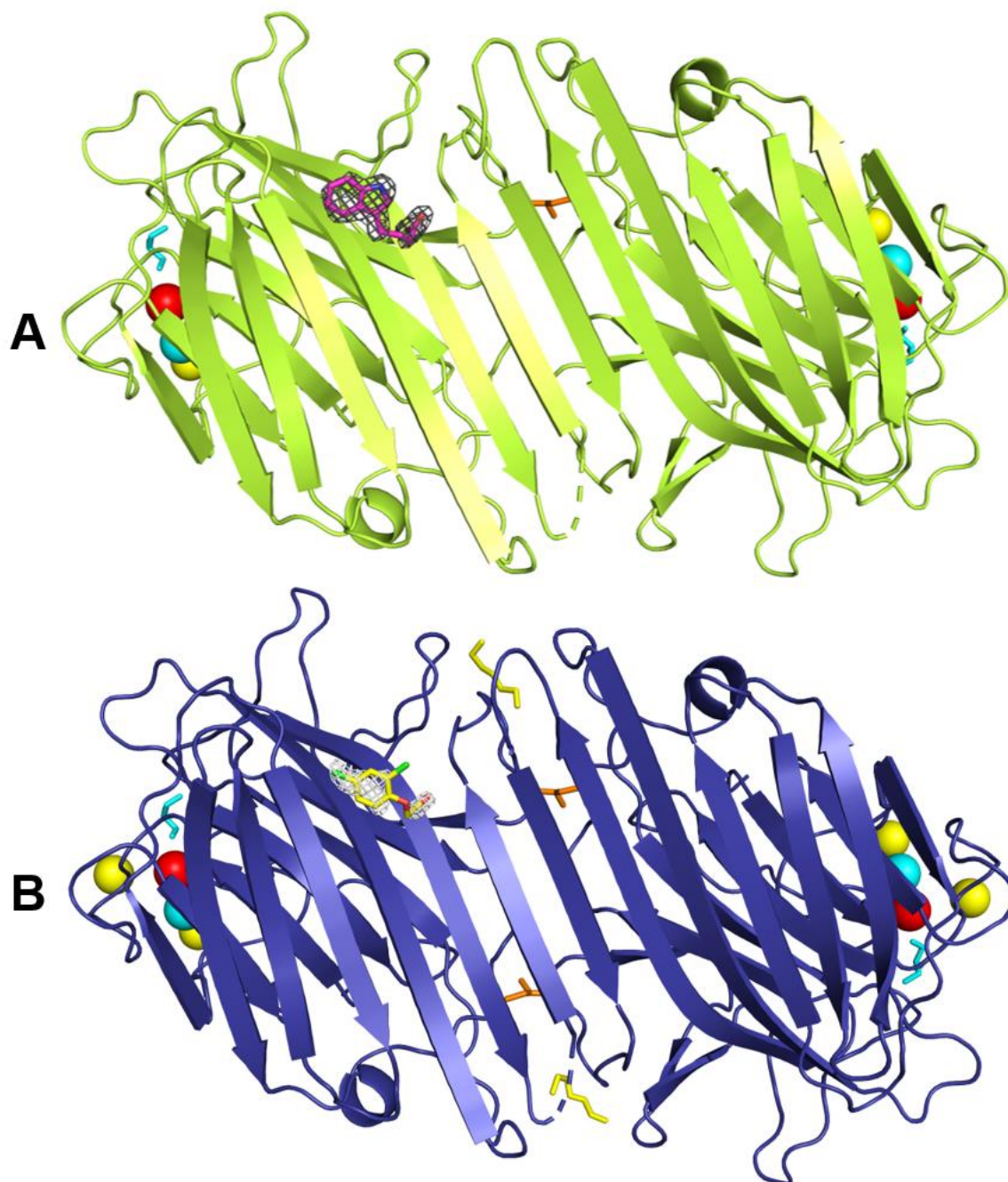
172 ConM was purified by affinity chromatography in single step purification and the  
173 activity was confirmed by hemagglutination assay which determined the  
174 hemagglutination titer of 5120 UH/mgP.

#### 175 **Complexes structure insights**

176 The two structures, ConM complexed with IBA and 2,4-D, exhibit a classic  
177 “canonical” dimer (subunits A and B) in the asymmetric unit, both belonging to the  
178 orthorhombic space group  $P2_122_1$ , Figure 1. Architecture of lectin monomer is  
179 generally described as consisting of three  $\beta$ -sheets: a flat six-membered back  $\beta$ -sheet,  
180 a seven-stranded front  $\beta$ -sheet and a smaller five-stranded top  $\beta$ -sheet, that plays an  
181 important role in keeping the two large sheets together (LORIS *et al.*, 1998). This  
182 architecture characterizes the Jelly roll motif that was first described for ConA (SINHA  
183 *et al.*, 2007). The canonical dimer is characterized by the side-by-side antiparallel  
184 alignment of two six-membered back  $\beta$ -sheets to the formation of a contiguous 12-  
185 strand  $\beta$  sheet (BANERJEE *et al.*, 1996). The Matthews coefficient (MATTHEWS,  
186 1968) of  $2.37 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$  indicates the presence of a dimer in the asymmetric unit in both  
187 structures. The cell parameters for the crystals structures of ConM/IBA and ConM/2,4-  
188 D were:  $a = 67.9 \text{ \AA}$ ,  $b = 71.84 \text{ \AA}$  and  $c = 98.86 \text{ \AA}$ , and  $a = 68.18 \text{ \AA}$ ,  $b = 71.83 \text{ \AA}$  and  $c$   
189  $= 98.80 \text{ \AA}$ , respectively. The crystals structures of ConM/IBA and ConM/2,4-D were

190 scaled and solved at a 1.8 and 1.6 Å resolution, respectively, confirming the  $\beta$ -  
191 sandwich/jelly-roll fold.

192 **Fig. 1.** ConM dimer structures referring to the complexes with (A) IBA and (B) 2,4-D,  
193 denoted by the gray and white electron density at 1  $\sigma$ , respectively.



194

195 **Note:** IBA and 2,4-D represented by pink and yellow sticks. The ions Ca<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> and Cl<sup>-</sup> are represented  
196 by spheres in red, cyan and yellow, respectively. Glycerol, ABU and PEG are represented by sticks in  
197 the color cyan, orange and yellow, respectively.

198

199 The loop 118-122 (in the Chain A) of ConM/IBA complexes structure and the  
200 amino acid residues 121 and 122 (Chain A) and the loop 118-122 (Chain B) of

201 ConM/2,4-D complexes could not be modeled. Loop in region 117–123 is a highly  
 202 unstable segment and commonly described as a region of low electron density  
 203 (BEZERRA *et al.*, 2011). ConM/IBA and ConM/2,4-D coordinates were solved and a  
 204 total of 349 and 357 water molecules were added to the structure, respectively.

205 The final restrained refinement obtained  $R_{\text{factor}}$  of 20.3 % and  $R_{\text{free}}$  of 23.4 % from  
 206 ConM/IBA and  $R_{\text{factor}}$  of 19.9 % and  $R_{\text{free}}$  of 22.7 % from ConM/2,4-D. The  
 207 Ramachandran plot from ConM/IBA and ConM/2,4-D showed 96.54% and 97,39% of  
 208 the residues were found in the most favored regions and 3,24% and 2,61% were  
 209 located in additional allowed regions, respectively. No residues were in non-permitted  
 210 regions. The dimers were linked by a non-canonical interface to form the quaternary  
 211 structure by symmetry. Details of the Crystallographic statistics are summarized in  
 212 Table 1.

213

214 **Table 1.** Crystallographic statistics of data collection and structure refinement of  
 215 ConM/IBA and ConM/2,4-D. (To be Continued)

	ConM/IBA	ConM/2,4-D
<b>Data collection</b>		
X-ray source	LNLS – MX2	LNLS – MX2
Wavelength (Å)	1.458	1.458
Resolution range (Å)	33.76–1.8 (1.864–1.8)	32.23–1.6 (1.657–1.6)
Space group	$P2_122_1$	$P2_122_1$
Cell parameters: a=b, c (Å)	a = 67.9, b = 71.84, c = 98.86	a = 68.18, b = 71.83, c = 98.80
Molecules/u.a.	2	2
No. unique reflections	45553 (4472)	62417 (5886)
Completeness (%)	99.72 (99.78)	96.31 (92.26)
$R_{\text{meas}}^b$	0.023 (0.231)	0.01901 (0.2983)
$R_{\text{pim}}^c$	0.016 (0.163)	0.01344 (0.211)
$R_{\text{merge}}$	0.016 (0.163)	0.01344 (0.211)
CC(1/2)	1 (0.961)	1 (0.908)
Multiplicity	2.0 (2.0)	2.0 (2.0)
$I/\sigma(I)$	27.87 (4.58)	26.14 (3.44)
$B_{\text{Wilson}}$ (Å <sup>2</sup> )	20.09	20.06
Integration software	XDS	XDS
Escalation Software	Scala	Scala
<b>Refinement</b>		
Reflections used in refinement	45468 (4464)	62329 (5887)
Reflections used for R-free	2221 (225)	1983 (192)
R-work	0.2027 (0.2671)	0.1986 (0.2500)
R-free	0.2335 (0.3012)	0.2274 (0.2836)

216

217 **Table 1.** Crystallographic statistics of data collection and structure refinement of  
 218 ConM/IBA and ConM/2,4-D. (Conclusion)

	ConM/IBA	ConM/2,4-D
<b>Refinement</b>		
CC(work)	0.961 (0.916)	0.958 (0.849)
CC(free)	0.940 (0.774)	0.952 (0.725)
Number of residues in asymmetric unit	476	469
Number of water molecules	349	357
R.m.s.d. from ideal bond length (Å)	0.009	0.012
R.m.s.d. from ideal bond angles (°)	1.67	1.30
Refinement software	PHENIX	PHENIX
Refinement method	ML/TLS	ML/TLS
<b>Ramachandran Plot</b>		
Ramachandran favored (%)	96.54	97.39
Ramachandran allowed (%)	3.24	2.61
Ramachandran outliers (%)	0.00	0.00
<b>PDB ID</b>	7UN2	7UOD

219 <sup>a</sup>Values in parentheses are relative to higher resolution layer.

$$220$$

$$221 R_{meas} = \frac{\sum_h \sqrt{\frac{n_h}{n_h - 1}} \sum_i^{n_h} |\hat{I}_h - I_{h,i}|}{\sum_h \sum_i^{n_h} I_{h,i}} \text{ with } \hat{I}_h = \frac{1}{n_h} \sum_i^{n_h} I_{h,i}$$

$$222$$

$$223$$

$$224$$

$$225 R_{rim} = \sum_{hkl} \sqrt{\frac{1}{N-1}} \sum_i |I_i(hkl) - \overline{I(hkl)}| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$$

226 Where I (hkl) is the intensity of multiples I<sub>i</sub> (hkl) observations of symmetrically related reflections, N  
 227 is the redundancy, n<sub>h</sub> is the multiplicity,  $\hat{I}_h$  is the average intensity and I<sub>h,i</sub> is the observed intensity.

$$229 {}^d R_{cryst} = \sum |F_o - F_c| / \sum F_o$$

230 <sup>e</sup>R<sub>free</sub> is the cross-validation of R<sub>factor</sub> computed by a set of reflections (5%) omitted from the  
 231 refinement process.

## 232 Overall structure of complexes

233  
 234 Monomer of complexes exhibit a CRD and metal binding sites by divalent  
 235 cations such as calcium (Ca<sup>2+</sup>) and manganese (Mn<sup>2+</sup>) (LAGARDA-DIAZ; GUZMAN-  
 236 PARTIDA; VAZQUEZ-MORENO, 2017). CRD is characterized by amino acid residues  
 237 Tyr12, Asn14, Leu99, Tyr100, Asp208 and Arg228. The metal binding site is composed  
 238 of amino acid residues Glu8, Asp10, Tyr12, Asn14, Asp19, His24, Val32, Ser34,  
 239 Asp208 and Arg228 (CAVADA *et al.*, 2001). CRD of complexes presented the electron  
 240 density of a glycerol per monomer, interacting principally with amino acid residues  
 241 Asn14, Leu99 and Tyr100 by hydrogen bonds (Fig. S2A and S2B). The structures  
 242 presented in the metal binding site, for each monomer, one calcium and one  
 243 manganese (Fig. S3). The calcium interacts with amino acid residues Asp10, Tyr12,  
 244

245 Asn14 and Asp19 and the manganese interacts with Glu8, Asp10, Asp19 and His24  
246 by hydrogen bonds.

247 ConM/IBA presented one molecule of  $\alpha$ -aminobutyric acid (ABU) (Chain B),  
248 Fig. S2C, and ConM/2,4-D presented two molecules of ABU (Chain A and Chain B),  
249 Fig. S2D. Delatorre and contributors (DELATORRE *et al.*, 2007) showed that ABU  
250 interacts with one chain through hydrogen bond with Asp139 and an interstitial water  
251 molecule, which interacts with Asn124 and with the other chain through hydrogen  
252 bonds with Ala125 and with another interstitial water interacting with Gln137, and  
253 through hydrophobic interaction with Leu126 and Val179. The ConM/IBA presented  
254 also one chlorine molecule per chain, while ConM/2,4-D presented two chlorine  
255 molecules per chain. The complex ConM/2,4-D presented also one molecule of  
256 polyethylene glycol (PEG) by chain, Fig. S2E. The PEG interacts principally with amino  
257 acid residues Gln132, Phe133, Ser134 and Glu183 by hydrophobic contacts. The PEG  
258 and glycerol found in the structures are crystallization artifacts, since they composed  
259 the crystallization condition or cryoprotectant solution.

260

### 261 **ConM structures complexed with IBA and 2,4-D**

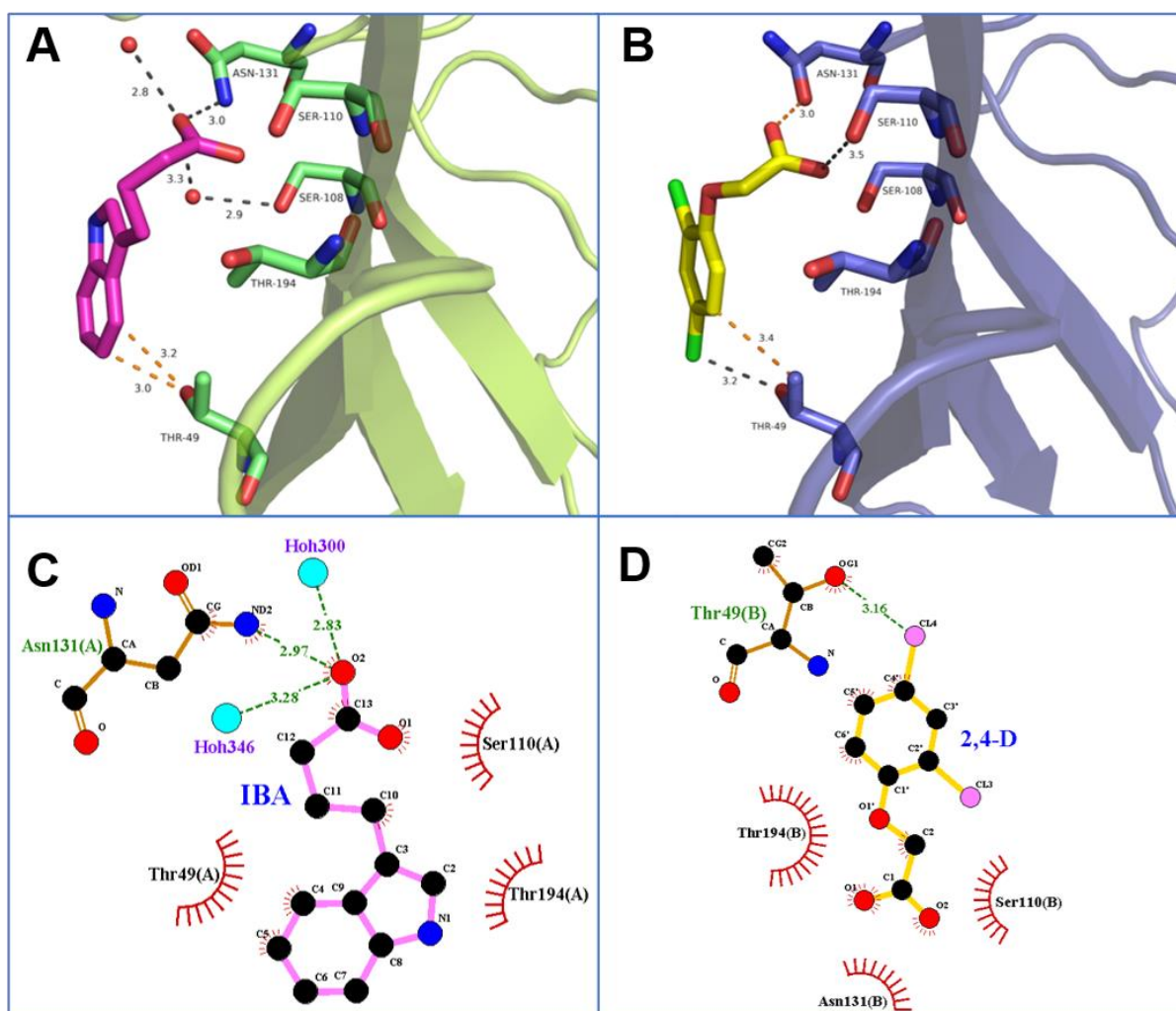
262 The IBA and 2,4-D auxins were found arranged between the back and top  
263 sheet strands (Figure 1). The solved structures were presented as a dimer, as cited,  
264 however the auxins were bound to only one of the monomers for each complex: IBA  
265 in the Chain A and 2,4-D in the Chain B. Generally, IBA interacts with the protein  
266 through hydrogen bonds via residue Asn131 and 2,4-D via residues Thr49 and Ser110.  
267 Auxins interacts also by van der Waals forces with residues Thr49 from IBA and 2,4-  
268 D. 2,4-D interacts also with Asn131 via van der Waals forces (Fig. 2). Coordinates  
269 resemble the positioning described for ConBr and ConM complexed with IAA that are  
270 positioned near residues Ser108 and Asn131 in both structures (DELATORRE *et al.*,  
271 2013; SALES, 2019).

272 The oxygen atom O2 of IBA formed hydrogen bonds of 3.0 Å with the nitrogen  
273 ND2 of Asn131 and hydrogen bonds of 2.8 and 3.3 Å with the molecules of water 300  
274 e 346, respectively. The van der Waals interactions occurred between the OG1 oxygen  
275 of Thr49 and the C4 and C5 carbons of IBA, which were separated by 3.2 and 3.0 Å,  
276 respectively (Fig. 2A and 2C). The oxygen OG of Ser110 formed hydrogen bonds with  
277 the oxygen atom O1 of the 2,4-D of 3.5 Å. The oxygen OG1 of Thr49 also formed  
278 hydrogen bonds with the chlorine atom CL4 of the 2,4-D of 3.2 Å. The hydroxyl oxygen

279 OD1 of Asn131 and carbon CG2 of Thr49 formed van der Waals interactions with the  
 280 oxygen O2 and C5 of 2,4-D, at distances of 3.0 and 3.4 Å, respectively (Fig. 2B and  
 281 2D). The interactions of auxins are stabilized also by amino acid residues Ser110 and  
 282 Thr194 for IBA and Thr194 for 2,4-D.

283

284 **Fig. 2.** Pymol 3D and LigPlot 2D schematic diagrams of ConM-auxins interactions. The  
 285 auxin IBA in (A) and (C) and 2,4-D in (B) and (D) interactions.



286

287

288 **Note:** IBA and 2,4-D represented by pink and yellow sticks, respectively. Waters represented by red  
 289 balls in Pymol. In Pymol, hydrogen bonds are represented by dash black and hydrophobic interactions  
 290 by dash orange. In LigPlot, hydrogen bonds are indicated by dashed lines between the atoms involved,  
 291 while hydrophobic contacts are represented by an arc with spokes radiating towards the ligand atoms  
 they contact. The contacted atoms are shown with spokes radiating back.

292

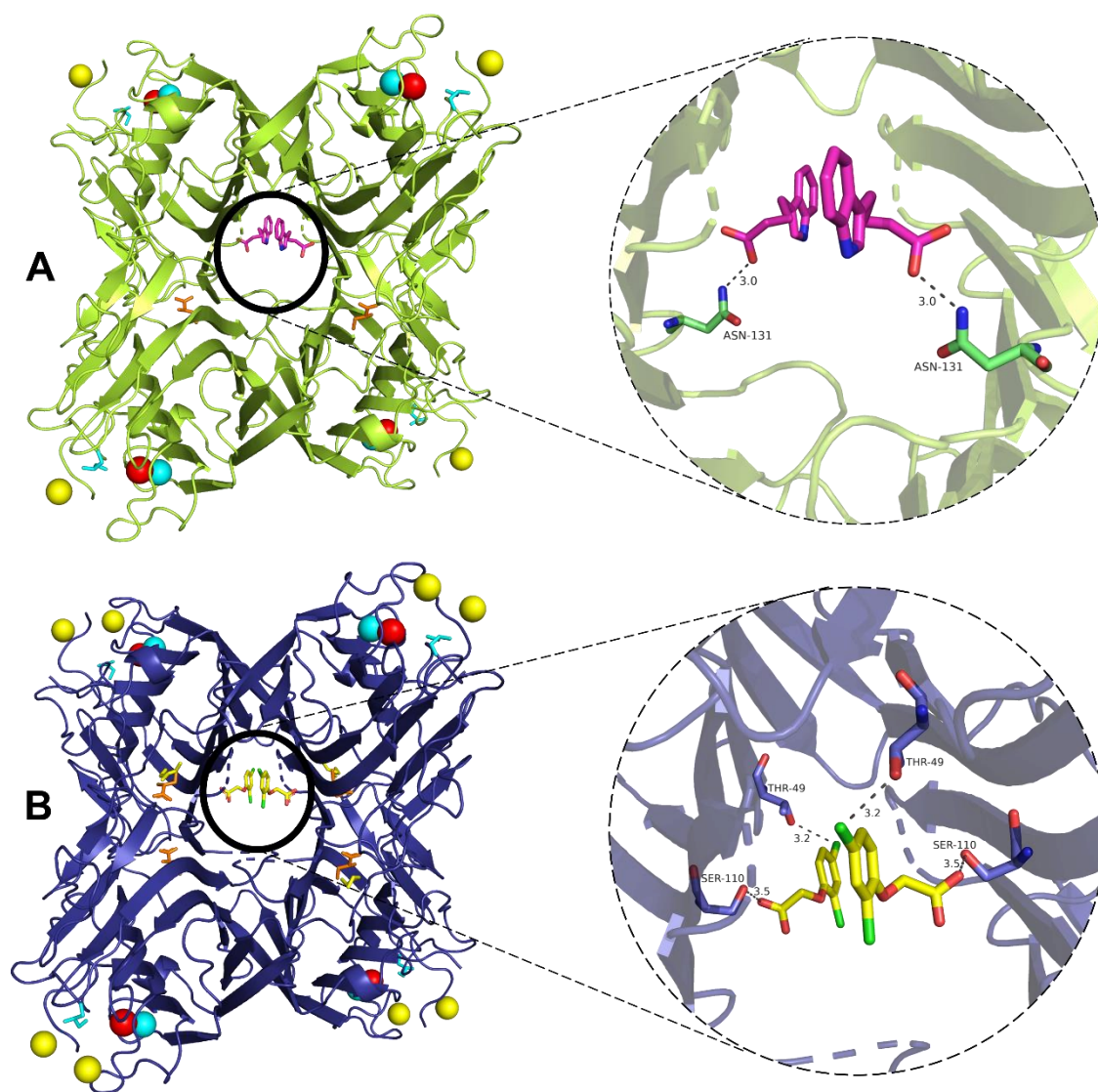
293

294 In figure 3, can be observed the disposition of auxins IBA and 2,4-D by the  
 295 tetramer biological assembly. The tetramers were generated by crystallographic

296 symmetry to verify the relative position of the IBA and 2,4-D molecule in relation to the  
 297 biological assembly of ConM.

298

299 **Fig. 3.** Tetramer of ConM complexed to (A) IBA and (A) 2,4-D.



300

301 **Note:** The IBA (pink) and 2,4-D molecules (yellow) in stick forms are positioned in the central cavity of  
 302 the tetramer in a low affinity site. Only hydrogen bonds between auxin and amino acid residues of ConM  
 303 are shown. The ions  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$  and  $\text{Cl}^-$  are represented by spheres in red, cyan and yellow, respectively.  
 304 Glycerol, ABU and PEG are represented by sticks in the color cyan, orange and yellow, respectively.

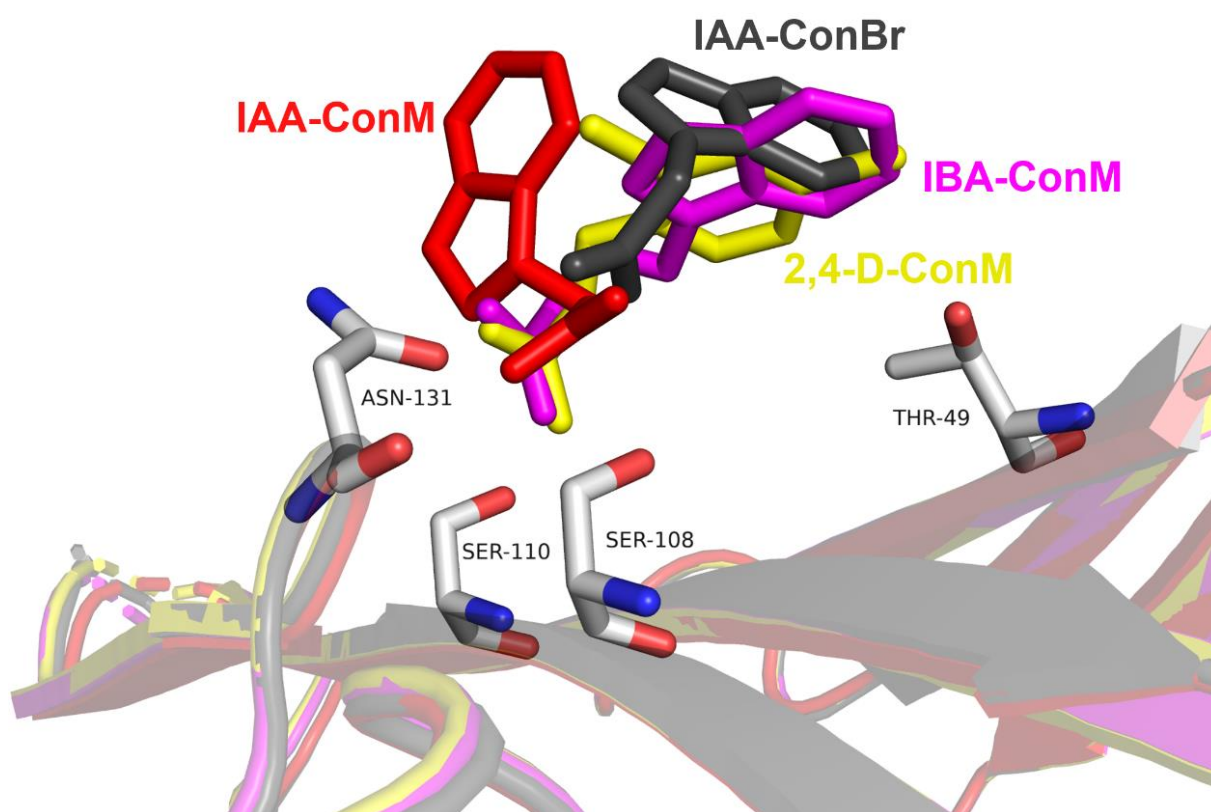
305

306 In figure 4, showed an alignment of auxin structures complexed with  
 307 ConM/ConBr. As can be seen, both auxins bind at the same site, however the mode  
 308 of binding varies between them. By comparing the interaction of the auxins in this study  
 309 with that of previously auxins studied, we can extract some considerations. All auxins  
 310 IBA, 2,4-D and IAA complexed with ConM and IAA complexed with ConBr bind to the

311 amino acid residue Asn131, either by hydrogen bonds or hydrophobic interactions  
 312 (Table 2). IAA complexes bind to amino acid residue Ser108. On the other hand, only  
 313 2,4-D is bound to residue Ser110. Additionally, all complexes were stabilized by van  
 314 der Waals interactions or hydrogen bonds with Thr49, except ConM/IAA  
 315 (DELATORRE *et al.*, 2013; SALES, 2019). From the alignment of the auxins, it is  
 316 possible to see that IAA complexed with ConM is farther from Thr49 compared to the  
 317 other auxins.

318

319 **Fig. 4.** Alignment of ConM complexed with IBA, 2,4-D and IAA, and ConBr complexed  
 320 with IAA.



321  
 322  
 323  
 324

**Note:** Analysis of IAA-ConM (red) and IAA-ConBr (black) by PDB 3SNM and 6VB8, respectively. The highlighted amino acid residues belong to the structure of ConM/2,4-D (7UOD).

325 It is also important to highlight that the positioning of IBA and 2,4-D was very  
 326 similar, although the interactions were a little different. IAA and IBA/ConM interacted  
 327 with water molecules 26 and 31, and 300 and 346, respectively. It is important to note  
 328 that the water 346 binds to both auxin IBA and amino acid residue Ser108 (2,9 Å),  
 329 suggesting that this molecule functions as a water bridge, since IBA was the only auxin  
 330 that did not bind directly to this amino acid residue (Figure 2A).



331 **Table 2.** The overall interactions between ConM and IBA, 2,4-D and IAA, and ConBr  
 332 with IAA.

Interactions auxins atoms	Thr49		Ser108		Ser110	Asn131		H <sub>2</sub> O			
	OG1	CG2	OG	CB	OG	OD1	ND2	26	31	300	346
IBA <sup>1</sup>	O2						3.0 <sup>a</sup>			2.8 <sup>a</sup>	3.3 <sup>a</sup>
	C4	3.2 <sup>b</sup>									
	C5	3.0 <sup>b</sup>									
2,4-D <sup>1</sup>	O1				3.5 <sup>a</sup>						
	O2					3.0 <sup>b</sup>					
	CL4	3.2 <sup>a</sup>									
	C5		3.4 <sup>b</sup>								
IAA <sup>1</sup>	O2		3.0 <sup>a</sup>	3.4 <sup>b</sup>				3.4 <sup>a</sup>	3.3 <sup>a</sup>		
	O3		2.8 <sup>a</sup>			2.3 <sup>a</sup>					
	C7					3.4 <sup>b</sup>					
	C18			3.1 <sup>b</sup>							
IAA <sup>2</sup>	O2					3.5 <sup>a</sup>					
	O3			3.2 <sup>a</sup>							
	C3	3.2 <sup>b</sup>									

333 <sup>1</sup>: Interactions auxins atoms with amino acid residues/water of the ConM.

334 <sup>2</sup>: Interactions auxins atoms with amino acid residues/water of the ConBr.

335 <sup>a</sup>: Hydrogen bonds.

336 <sup>b</sup>: Van der Waals interactions.

337 Analysis of IAA<sup>1</sup> and IAA<sup>2</sup> by Delatorre (2013) and Sales (2019), respectively.

338

339 The quaternary structure from the monomeric unit containing the linked auxins  
 340 IBA, 2,4-D and IAA was generated, so that each monomer had a linked auxin molecule  
 341 (Fig. S1). From the comparison it can be noted that only the ConM-IAA complex  
 342 showed a hydrophobic stacking of auxin, this fact is also reinforced from the analysis  
 343 of the alignment in Fig. 4, in which it can be seen that the interactions of IBA and 2,4-  
 344 D were similar to the positioning of IAA in ConBr, while the positioning of IAA in ConM  
 345 differed. aConM presented a greater number of interactions with IAA and tends to have  
 346 a slightly higher interaction against other auxins and ConBr due to stacking and  
 347 perhaps this guarantees an efficiency for the lectin to participate in different processes,  
 348 as mentioned by Delatorre and contributors (Delatorre *et al.*, 2013) this stacking has  
 349 capacity to stabilize the tetrameric form of ConM.

350

#### 351 4. Discussion

352 Although IBA and 2,4-D bind at the same binding site in ConM compared to  
 353 IAA in ConM and ConBr, their orientations are different. It is known that ConM and  
 354 ConBr have high homology, differing in only five amino acid residues (Val129/Met129,  
 355 Asp151/Glu151, Glu155/Arg155, Asp192/Glu192 and Ser202/Pro202 in  
 356 ConM/ConBr), it is noteworthy that the residues that differ are not involved in binding

357 to auxins. This fact is directly reflected in the interaction of IAA with these lectins, since  
358 it is bound to the same residues, differing only in orientation and binding mode  
359 (DELATORRE *et al.*, 2013; SALES, 2019). This fact elucidates the idea that these  
360 phytohormones of similar structures bind to this site. Structural variation in each auxin  
361 molecule influences binding to receptor proteins (TAN *et al.*, 2007) and the degradation  
362 rate within the cell. Alignment of ConM with lectins from legumes of different genus  
363 such as *Canavalia*, *Camptosema*, *Cratylia* and *Cymbosema* showed that residues from  
364 the auxin binding site Thr49, Ser108, Ser110, and Asn131 are conserved in the  
365 species tested. In Dioclea genus, the lectins Dguia, DSL, DrfL, DwL and DVL showed  
366 amino acid residue substitution 131, where asparagine was replaced by histidine (Fig.  
367 S7). Even as described by Nagano and contributors (NAGANO *et al.*, 2008) this  
368 residue 131 has an important role in the stabilization of the dimer/tetramer.

369 It is known that the auxins IBA and IAA are almost identical, they differ only in  
370 the amount of carbons in the side chain, since IBA carries four carbons and IAA carries  
371 only two carbons (ZOLMAN; YODER; BARTEL, 2000). Despite this high structural  
372 similarity, these auxins showed differences in their binding. The fact that IBA has a  
373 larger structure than IAA, its arrangement in relation to the site was different, since this  
374 auxin was positioned more vertically in relation to the site, being stabilized by the amino  
375 acid residue Thr49, while IAA/ConM was positioned more horizontally in relation to the  
376 site not interacting with this residue (Fig. S4).

377 Auxin is commonly used to induce the formation of callus, culture suspension,  
378 roots, to stimulate elongation and cell division (MAYERNI *et al.*, 2020). Different types  
379 of auxins have a different function to be used in tissue culture. Some works showed  
380 that the inclusion of IBA to the medium induced the rooting (AHN *et al.*, 2007;  
381 ORLIKOWSKA; SABALA; KUCHARSKA, 2000) and also significantly increased the  
382 number of roots/plantlets (MOHAMAD *et al.*, 2022). Higher plants can store IAA in the  
383 form of conjugates of IAA and IBA, which can provide free IAA after hydrolysis or  $\beta$ -  
384 oxidation, respectively. IBA is more effective than IAA in inducing lateral root, perhaps  
385 because IBA efficiently induces lateral roots at concentrations that only minimally  
386 inhibit root elongation (ZOLMAN; YODER; BARTEL, 2000). While, auxin 2,4-D is one  
387 of the most used for *in vitro* callus production (OLIVEIRA; SARTORATTO; CARLOS  
388 CARDOSO, 2020).

389 In summary, the effects of auxins depend on their concentration. Plants that  
390 grow in high concentration form shorter and thicker roots, and in low concentrations

391 affects root growth, without stress symptoms (KARIMIAN; LAHOUTI; DAVARPANAH,  
392 2014). In the case of synthetic auxins such as 2,4-D, which is structurally and  
393 functionally analogous to IAA, at low concentrations it is biologically active as an auxin  
394 in plants (UCHIDA *et al.*, 2004). Although 2,4-D looks and acts like an auxin, plants  
395 cannot metabolize this herbicide like they do with IAA, this turns out to be the main  
396 reason why 2,4-D is able to kill sensitive plants in high concentrations (MOHAMAD *et*  
397 *al.*, 2022).

398         Legume lectins behave as storage proteins, performing vital functions during  
399 plant growth and development, including carbohydrate storage and trafficking, as well  
400 as hormone storage and cell-cell interactions through binding to cell surface receptors  
401 (KATOCH; TRIPATHI, 2021). Furthermore, the interaction of leguminous lectins with  
402 natural phytohormone can be directly involved with the processes of plant  
403 development. This can be assumed due the fact that auxins stimulate somatic  
404 embryogenesis and lectins are in high concentration in the initial stage of development.

405         In 1985, Borrebaeck and Linsefors (BORREBAECK; LINSEFORS, 1985)  
406 showed evidence of interaction of lectins with hormones, in which verified that the  
407 biosynthesis of lectin of *Phaseolus vulgaris* can be influenced by the alteration of  
408 hormonal proportions in the culture medium, while lectin was not detected in medium  
409 without auxins and cytokinins. Previous studies, based on a tetrameric model of the  
410 complex ConM/IAA, the authors hypothesized how the lectin controls the availability of  
411 IAA during the early seedling stages (DELATORRE *et al.*, 2013). Soon, the  
412 ConM/ConBr interaction with different forms of IAA is a strategy to render the  
413 phytohormone unavailable to the cell and describes a novel mechanism by which IAA  
414 levels are decreased in addition to the destruction and formation of new complexes in  
415 the later stages of seed germination (DELATORRE *et al.*, 2013; SALES, 2019). Said  
416 that, does the interaction of lectins with auxins interfere with development? In which  
417 steps? With the structural characterization of the binding site of lectins with auxins, we  
418 now have to advance in physiological studies in order to answer this question,  
419 depending on the modulation of activity and these responses, these proteins can be  
420 used *in vitro* culture.

421  
422  
423  
424  
425

## 426 **Conclusions**

427           Lectins interact with plant hormones through a low-affinity binding site  
428 constituted by residues Thr49, Ser108, Ser110 and Asn131, and eventually by  
429 residues Thr49 and Asn131 for IBA and Thr49, Ser110 and Asn131 for 2,4 D. The high  
430 similarity between the sequences of *Canavalia* lectins allow us to affirm the  
431 conservation of the auxin binding site in this group of lectins. The difference between  
432 the interactions described in the work suggest the different ability to modulate the  
433 concentrations of auxins (expression and synthesis) available in the early stages of  
434 development.

435

## 436 **Acknowledgments**

437           This study was partly funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento  
438 Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de  
439 Nível Superior (CAPES). This research used resources of the Brazilian Synchrotron  
440 Light Laboratory (LNLS), an open national facility operated by the Brazilian Center for  
441 Research in Energy and Materials (CNPEM) for the Brazilian Ministry for Science,  
442 Technology, Innovations and Communications (MCTIC). The MX2 beamline staff is  
443 acknowledged for the assistance during the experiments.

444

445

446

447

448

449

450

451

452

453

454

455 **References**

- 456 Adams, P.D., Afonine, P. V., Bunkóczi, G., Chen, V.B., Davis, I.W., Echols, N.,  
457 Headd, J.J., Hung, L.W., Kapral, G.J., Grosse-Kunstleve, R.W., McCoy, A.J.,  
458 Moriarty, N.W., Oeffner, R., Read, R.J., Richardson, D.C., Richardson, J.S.,  
459 Terwilliger, T.C., Zwart, P.H., 2010. PHENIX: A comprehensive Python-based  
460 system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol.*  
461 *Crystallogr.* 66, 213–221. <https://doi.org/10.1107/S0907444909052925>
- 462 Ahn, Y.J., Vang, L., McKeon, T.A., Chen, G.Q., 2007. High-frequency plant  
463 regeneration through adventitious shoot formation in castor (*Ricinus communis*  
464 L.). *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Plant* 43, 9–15. [https://doi.org/10.1007/s11627-006-](https://doi.org/10.1007/s11627-006-9009-2)  
465 [9009-2](https://doi.org/10.1007/s11627-006-9009-2)
- 466 Banerjee, R., Das, K., Ravishankar, R., Suguna, K., Surolia, A., Vijayan, M., 1996.  
467 Conformation, protein-carbohydrate interactions and a novel subunit association  
468 in the refined structure of peanut lectin-lactose complex. *J. Mol. Biol.* 259, 281–  
469 296. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0319>
- 470 Bezerra, E.H.S., Rocha, B.A.M., Nagano, C.S., Bezerra, G. de A., Moura, T.R. de,  
471 Bezerra, M.J.B., Benevides, R.G., Sampaio, A.H., Assreuy, A.M.S., Delatorre,  
472 P., Cavada, B.S., 2011. Structural analysis of ConBr reveals molecular  
473 correlation between the carbohydrate recognition domain and endothelial NO  
474 synthase activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 408, 566–570.  
475 <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.04.061>
- 476 Borrebaeck, C.A.K., Linsefors, L., 1985. Hormonal Regulation of the Lectin  
477 Biosynthesis in Callus Culture of the *Phaseolus vulgaris* Plant. *Plant Physiol.* 79,  
478 659–622.
- 479 Cavada, B.S., Barbosa, T., Arruda, S., Grangeiro, T.B., Barral-Netto, M., 2001.  
480 Revisiting proteus : Do Minor Changes in Lectin Structure Matter in Biological  
481 Activity? Lessons from and Potential Biotechnological Uses of the *Diocleinae*  
482 Subtribe Lectins. *Curr. Protein Pept. Sci.* 2, 123–135.
- 483 Ceccatto, V., Cavada, B., Nunes, E., Nogueira, N., Grangeiro, M., Moreno, F.B.,  
484 Teixeira, E., Sampaio, A., Alves, M., Ramos, M., Calvete, J., Grangeiro, T.,  
485 2005. Purification and Partial Characterization of a Lectin from *Canavalia*  
486 *Grandiflora* Benth. Seeds. *Protein Pept. Lett.* 9, 67–73.  
487 <https://doi.org/10.2174/0929866023409002>
- 488 Chen, V.B., Arendall, W.B., Headd, J.J., Keedy, D.A., Immormino, R.M., Kapral, G.J.,  
489 Murray, L.W., Richardson, J.S., Richardson, D.C., 2010. MolProbity: All-atom  
490 structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr. Sect. D*  
491 *Biol. Crystallogr.* 66, 12–21. <https://doi.org/10.1107/S0907444909042073>
- 492 Cunningham, B.A., Wang, J.L., Waxdal, M.J., Edelman, G.M., 1975. The Covalent  
493 and Three-Dimensional Structure of Concanavalin A. *J. Biol. Chem.* 250, 1503–  
494 1512. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)41841-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)41841-3)
- 495 Delatorre, P., Rocha, B.A.M., Souza, E.P., Oliveira, T.M., Bezerra, G.A., Moreno,  
496 F.B.M.B., Freitas, B.T., Santi-Gadelha, T., Sampaio, A.H., Azevedo, W.F.,  
497 Cavada, B.S., 2007. Structure of a lectin from *Canavalia gladiata* seeds: New  
498 structural insights for old molecules. *BMC Struct. Biol.* 7, 1–9.

- 499 <https://doi.org/10.1186/1472-6807-7-52>
- 500 Delatorre, P., Silva-Filho, J.C., Rocha, B.A.M., Santi-Gadelha, T., Da Nóbrega, R.B.,  
501 Gadelha, C.A.A., Do Nascimento, K.S., Nagano, C.S., Sampaio, A.H., Cavada,  
502 B.S., 2013. Interactions between indole-3-acetic acid (IAA) with a lectin from  
503 *Canavalia maritima* seeds reveal a new function for lectins in plant physiology.  
504 *Biochimie* 95, 1697–1703. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.05.008>
- 505 Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and  
506 high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792–1797.  
507 <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- 508 Emsley, P., Cowtan, K., 2004. Coot: Model-building tools for molecular graphics. *Acta*  
509 *Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 60, 2126–2132.  
510 <https://doi.org/10.1107/S0907444904019158>
- 511 Evans, P.R., 2011. An introduction to data reduction: Space-group determination,  
512 scaling and intensity statistics. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 67,  
513 282–292. <https://doi.org/10.1107/S090744491003982X>
- 514 Gadelha, C.A. de A., Moreno, F.B.M.B., Santi-Gadelha, T., Cajazeiras, J.B., Rocha,  
515 B.A.M. da, Assreuy, A.M.S., Mota, M.R.L., Pinto, N.V., Meireles, A.V.P., Borges,  
516 J.C., Freitas, B.T., Canduri, F., Souza, E.P., Delatorre, P., Criddle, D.N., Jr.,  
517 W.F. de A., Cavada, B.S., 2005. Native crystal structure of a nitric oxide-  
518 releasing lectin from the seeds of *Canavalia maritima*. *J. Struct. Biol.* 152, 185–  
519 194. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2005.07.012>
- 520 Grant, B.J., Rodrigues, A.P.C., ElSawy, K.M., McCammon, J.A., Caves, L.S.D.,  
521 2006. Bio3d: An R package for the comparative analysis of protein structures.  
522 *Bioinformatics* 22, 2695–2696. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl461>
- 523 Grant, B.J., Skjærven, L., Yao, X.Q., 2021. The Bio3D packages for structural  
524 bioinformatics. *Protein Sci.* 30, 20–30. <https://doi.org/10.1002/pro.3923>
- 525 Hardman, K.D., Ainsworth, C.F., 1972. Structure of Concanavalin A at 2.4-Å  
526 Resolution. *Biochemistry* 11, 4910–4919.
- 527 Hoff, P.L. De, Brill, L.M., Hirsch, A.M., 2009. Plant lectins : the ties that bind in root  
528 symbiosis and plant defense. *Mol Genet Genomics* 282, 1–15.  
529 <https://doi.org/10.1007/s00438-009-0460-8>
- 530 Ingale, A.G., Hivrale, A.U., 2013. Plant as a plenteous reserve of lectin. *Plant Signal.*  
531 *Behav.* 812, 8, 1–7.
- 532 Kabsch, W., 2010. XDS. *Acta Crystallogr. Sect. D* 66, 125–132.  
533 <https://doi.org/10.1107/S0907444909047337>
- 534 Karimian, R., Lahouti, M., Davarpanah, S.J., 2014. Effects of different concentrations  
535 of 2, 4-D and kinetin on callogenesis of *Taxus brevifolia* nutt. *J. Appl. Biotechnol.*  
536 *Reports* 1, 167–170.
- 537 Katoch, R., Tripathi, A., 2021. Research advances and prospects of legume lectins.  
538 *J. Biosci.* 46, 1–30. <https://doi.org/10.1007/s12038-021-00225-8>
- 539 Lagarda-Diaz, I., Guzman-Partida, A.M., Vazquez-Moreno, L., 2017. Legume  
540 Lectins : Proteins with Diverse Applications. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 1–18.

- 541 <https://doi.org/10.3390/ijms18061242>
- 542 Leyser, O., 2018. Auxin Signaling. *Founders Rev.* 176, 465–479.  
543 <https://doi.org/10.1104/pp.17.00765>
- 544 Loris, R., Hamelryck, T., Bouckaert, J., Wyns, L., 1998. Legume lectin structure.  
545 *Biochim. Biophys. Acta* 1383, 9–36. [https://doi.org/10.1016/S0167-](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(97)00182-9)  
546 [4838\(97\)00182-9](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(97)00182-9)
- 547 Matthews, B.W., 1968. Solvent content of protein crystals. *J. Mol. Biol.* 33, 491–497.  
548 [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(68\)90205-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(68)90205-2)
- 549 Mayerni, R., Satria, B., Wardhani, D.K., Chan, S., 2020. Effect of auxin (2,4-D) and  
550 cytokinin (BAP) in callus induction of local patchouli plants (*Pogostemon cablin*  
551 Benth.). *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* 583. [https://doi.org/10.1088/1755-](https://doi.org/10.1088/1755-1315/583/1/012003)  
552 [1315/583/1/012003](https://doi.org/10.1088/1755-1315/583/1/012003)
- 553 McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Adams, P.D., Winn, M.D., Storoni, L.C., Read,  
554 R.J., 2007. Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* 40, 658–674.  
555 <https://doi.org/10.1107/S0021889807021206>
- 556 Mohamad, M.E., Awad, A.A., Majrashi, A., Esadek, O.A.A., El-Saadony, M.T., Saad,  
557 A.M., Gendy, A.S., 2022. *In vitro* study on the effect of cytokines and auxins  
558 addition to growth medium on the micropropagation and rooting of Paulownia  
559 species (*Paulownia hybrid* and *Paulownia tomentosa*). *Saudi J. Biol. Sci.* 29,  
560 1598–1603. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.11.003>
- 561 Moreira, R.D.A., Perrone, J.C., 1977. Purification and Partial Characterization of a  
562 Lectin from *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol.* 59, 783–787.
- 563 Nagano, C.S., Calvete, J.J., Baretino, D., Pérez, A., Cavada, B.S., Sanz, L., 2008.  
564 Insights into the structural basis of the pH-dependent dimer-tetramer equilibrium  
565 through crystallographic analysis of recombinant *Diocleinae* lectins. *Biochem. J.*  
566 409, 417–428. <https://doi.org/10.1042/BJ20070942>
- 567 Oliveira, M.E.B.S., Sartoratto, A., Carlos Cardoso, J., 2020. *In Vitro* Calli Production  
568 Resulted in Different Profiles of Plant-Derived Medicinal Compounds in  
569 *Phyllanthus amarus*. *Molecules* 25, 1–15.  
570 <https://doi.org/10.3390/molecules25245895>
- 571 Orlikowska, T., Sabala, I., Kucharska, D., 2000. The effect of leaf and shoot tip  
572 removal and explant orientation on axillary shoot proliferation of *Codiaeum*  
573 *variegatum* Blume var. *pictum* Muell. Arg. cv. Excellent. *Sci. Hortic.*  
574 (Amsterdam). 85, 103–111. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(99\)00121-1](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(99)00121-1)
- 575 Peumans, W.J., Van Damme, E.J.M., 1995. Lectins as plant defense proteins. *Plant*  
576 *Physiol.* 109, 347–352. <https://doi.org/10.1104/pp.109.2.347>
- 577 Sales, M.V., 2019. Bases Estruturais da Interação da Lectina de *Canavalia*  
578 *brasiliensis* Mart. ex Benth. (ConBr) com o Fitohormônio Ácido Indole-3-Acético.  
579 Universidade Federal do Ceará (Dissertação).
- 580 Sharon, N., Lis, H., 2002. How Proteins Bind Carbohydrates : Lessons from Legume  
581 Lectins. *J. Agric. Food Chem.* 50, 6586–6591.
- 582 Schrödinger, LLC, 2020. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.4.0.

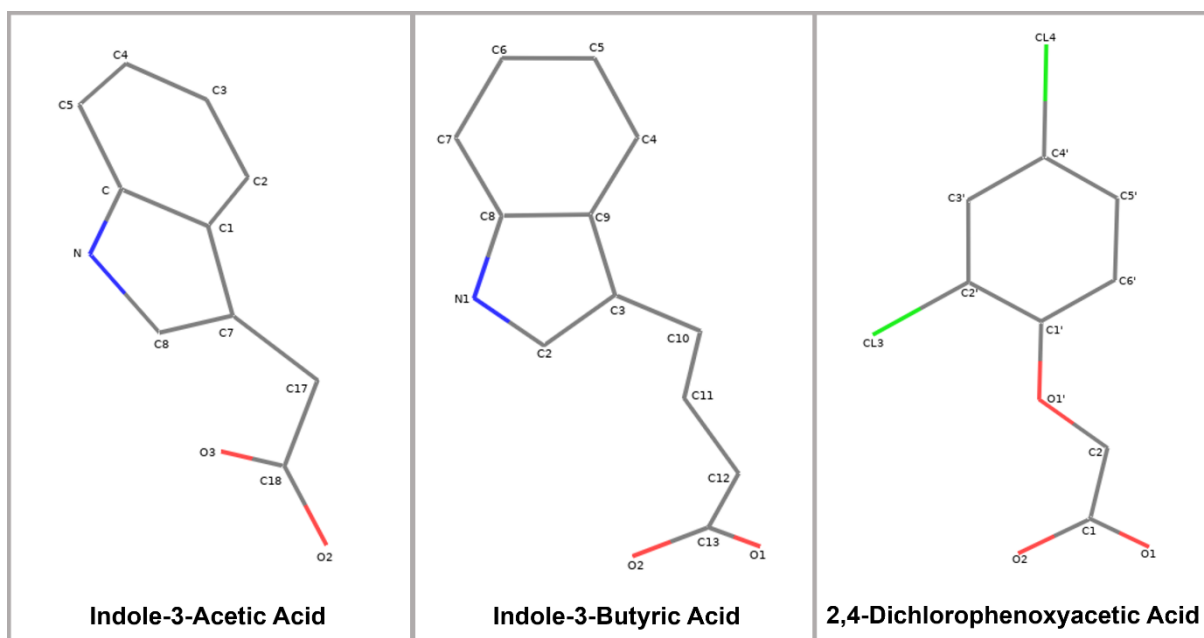
- 583 Sinha, S., Gupta, G., Vijayan, M., Surolia, A., 2007. Subunit assembly of plant  
584 lectins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 17, 498–505.  
585 <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2007.06.007>
- 586 Skjaerven, L., Yao, X.Q., Scarabelli, G., Grant, B.J., 2014. Integrating protein  
587 structural dynamics and evolutionary analysis with Bio3D. *BMC Bioinformatics*  
588 15, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12859-014-0399-6>
- 589 Sumner, J.B., Howell, S.F., 1936. The Identification of the Hemagglutinin of the *Jack*  
590 *Bean* With Concanavalin A. *J. Bacteriol.* 32, 227–237.
- 591 Tan, X., Calderon-Villalobos, L.I.A., Sharon, M., Zheng, C., Robinson, C. V., Estelle,  
592 M., Zheng, N., 2007. Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin  
593 ligase. *Nature* 446, 640–645. <https://doi.org/10.1038/nature05731>
- 594 Uchida, H., Nakayachi, O., Otani, M., Kajikawa, M., Kohzu, Y., Yamato, K.T.,  
595 Fukuzawa, H., Shimada, T., Ohyama, K., 2004. Plant regeneration from  
596 internode explants of *Euphorbia tirucalli*. *Plant Biotechnol.* 21, 397–399.  
597 <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.21.397>
- 598 Van Damme, E.J.M., 2021. 35 Years in Plant Lectin Research: a Journey From Basic  
599 Science To Applications in Agriculture and Medicine. *Glycoconj. J.* 1–15.  
600 <https://doi.org/10.1007/s10719-021-10015-x>
- 601 Wang, J.L., Cunningham, B.A., Waxdal, M.J., Edelman, G.M., 1975. The Covalent  
602 Concanavalin Three-Dimensional Structure. *J. Biol. Chem.* 250, 1490–1502.  
603 [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)41840-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)41840-1)
- 604 Woodward, A.W., Bartel, B., 2005. Auxin: Regulation, action, and interaction. *Ann.*  
605 *Bot.* <https://doi.org/10.1093/aob/mci083>
- 606 Zolman, B.K., Yoder, A., Bartel, B., 2000. Genetic Analysis of Indole-3-butyric Acid  
607 Responses in *Arabidopsis thaliana* Reveals Four Mutant Classes. *Genet. Soc.*  
608 *Am. Genet.* 156, 1323–1337.
- 609
- 610
- 611
- 612
- 613
- 614
- 615
- 616
- 617
- 618
- 619
- 620



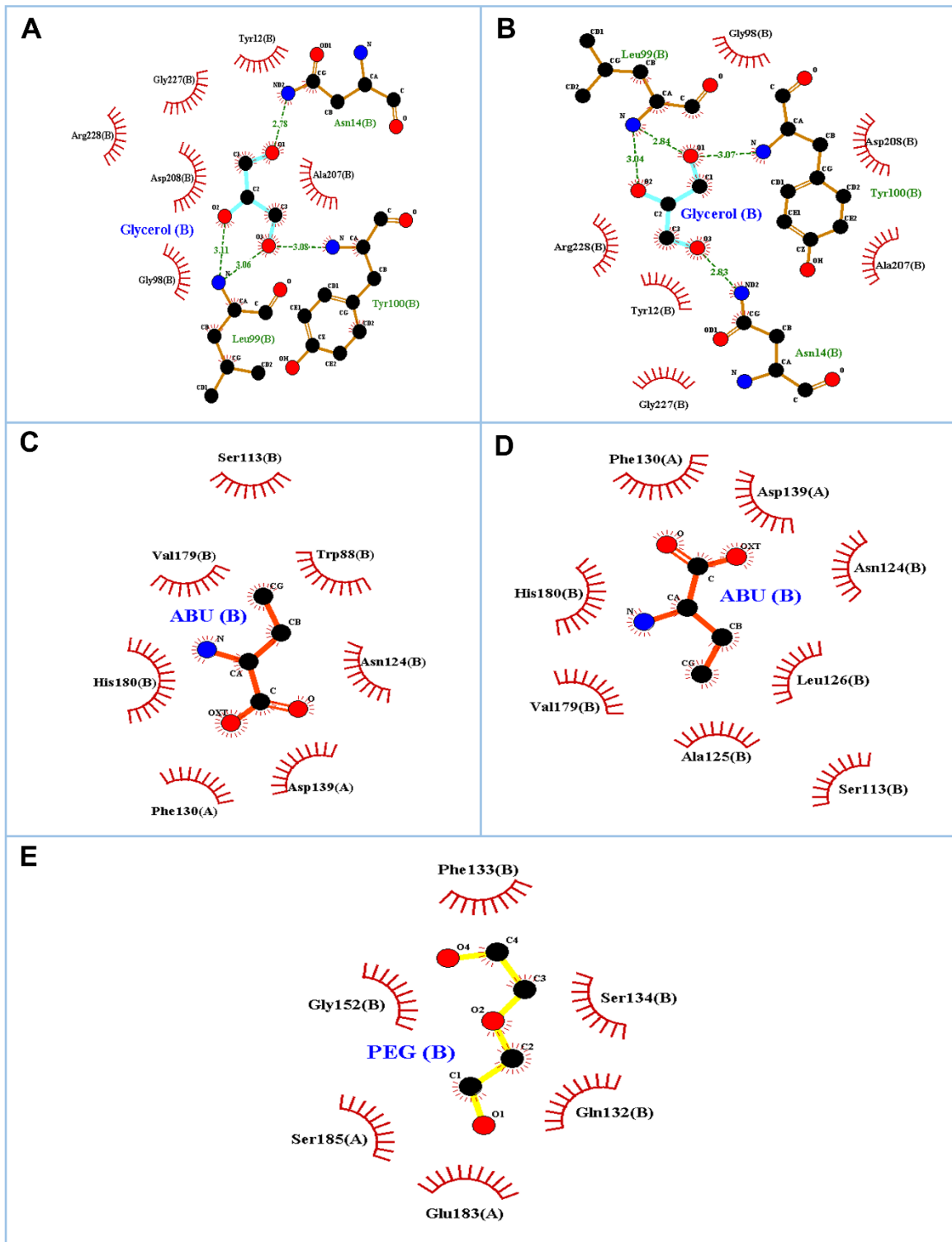
## Supplementary material

621  
622  
623  
624  
625

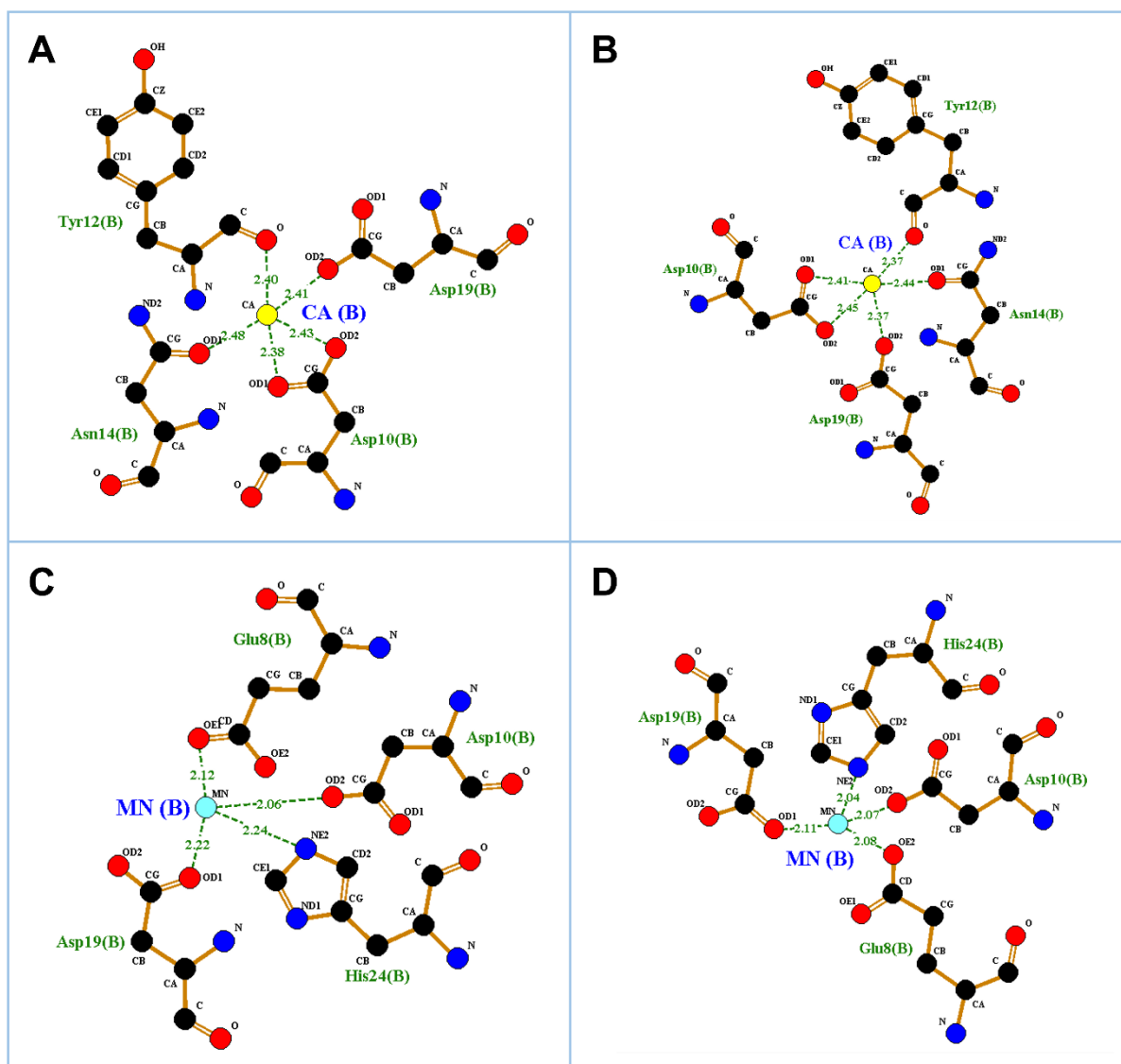
**Figure S1:** Representation of IAA, IBA and 2,4-D auxins with their detailed atoms. Figure obtained from Pymol.



643 **Figure S2:** Glycerol, ABU and PEG interactions with ConM. The complexes ConM/IBA  
 644 interacting with glycerol (A) and ABU (C). The complexes ConM/2,4-D interacting with  
 645 glycerol (B), ABU (D) and PEG (E). Glycerol interacting with amino acid residues  
 646 Asn14, Leu99 and Tyr100 by hydrogen bonds. ABU and PEG interacting by  
 647 hydrophobic contacts. Hydrogen bonds are indicated by dashed lines between the  
 648 atoms involved, while hydrophobic contacts are represented by an arc with spokes  
 649 radiating towards the ligand atoms they contact. The contacted atoms are shown with  
 650 spokes radiating back.



652 **Figure S3:** Calcium and manganese metals interactions with the metal-binding site.  
 653 Calcium in (A) and (B) and manganese in (C) and (D) interactions from ConM/IBA and  
 654 ConM/2,4-D complexes, respectively. The calcium interacts with amino acid residues  
 655 Asp10, Tyr12, asn14 and Asp19 and the manganese interacts with Glu8, Asp10,  
 656 Asp19 and His24 by hydrogen bonds. Hydrogen bonds are indicated by dashed lines  
 657 between the atoms involved, while hydrophobic contacts are represented by an arc  
 658 with spokes radiating towards the ligand atoms they contact. The contacted atoms  
 659 are shown with spokes radiating back.



660

661

662

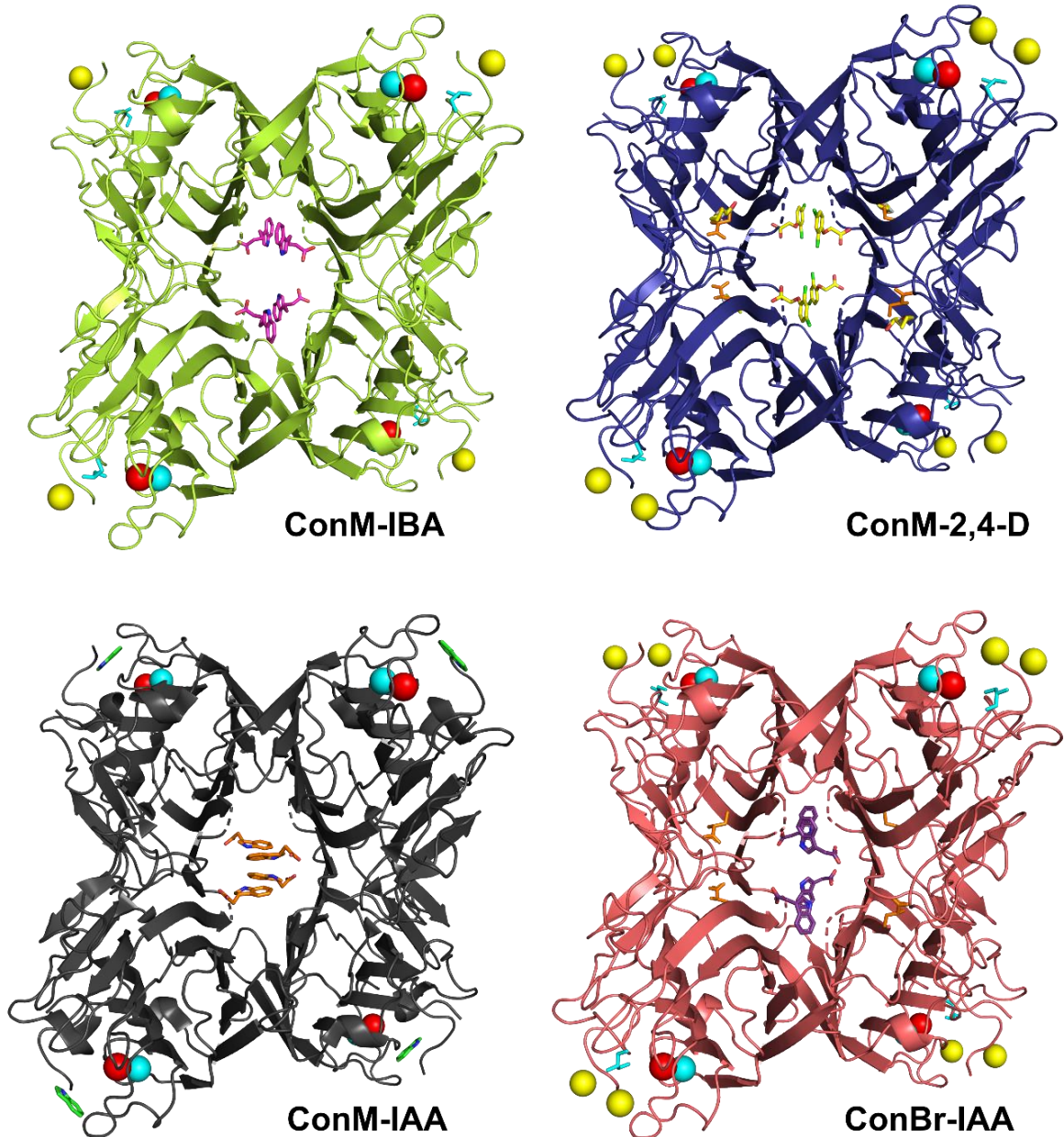
663

664

665

666

667 **Figure S4:** Jelly-roll motif of lectin monomers displayed as tetramer with four auxin  
 668 molecules in (A) ConM-IBA, (B) ConM-2,4-D, (C) ConM-IAA and (D) ConBr-IAA. The  
 669 ions  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$  and  $\text{Cl}^-$  are represented by spheres in red, cyan and yellow,  
 670 respectively. Glycerol, ABU, PEG and indole group are represented by sticks in the  
 671 color cyan, Orange, yellow and green, respectively. Auxins represented by sticks pink  
 672 (IBA), yellow (2,4-D), orange (IAA in ConM) and purple (IAA in ConBr).



673

674

675

676

677

678



## REFERÊNCIAS

- ADAMS, P. D. *et al.* PHENIX: A comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 66, n. 2, p. 213–221, 2010.
- AHN, Y. J. *et al.* High-frequency plant regeneration through adventitious shoot formation in castor (*Ricinus communis* L.). **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 43, n. 1, p. 9–15, 2007.
- ARUN, A. B. *et al.* Nutritional and antinutritional components of *Canavalia* spp . seeds from the west coast sand dunes of India. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 58, p. 1–13, 2003.
- ARUN, A. B.; SRIDHAR, K. R. Symbiotic performance of fast-growing rhizobia isolated from the coastal sand dune legumes of west coast of India. **Biol Fertil Soils**, v. 40, p. 435–439, 2004.
- ASSREUY, A. M. S. *et al.* Vasodilator effects of *Diocleinae* lectins from the *Canavalia* genus. **Naunyn-Schmied Arch Pharmacol**, v. 380, p. 509–521, 2009.
- BANERJEE, R. *et al.* Conformation, protein-carbohydrate interactions and a novel subunit association in the refined structure of peanut lectin-lactose complex. **Journal of Molecular Biology**, v. 259, n. 2, p. 281–296, 1996.
- BARRE, A.; BOURNE, Y.; DAMME, E. J. M. VAN. Overview of the Structure – Function Relationships of Mannose-Specific Lectins from Plants , Algae and Fungi. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 1, p. 1–49, 2019.
- BELLANDE, K. *et al.* Plant Lectins and Lectin Receptor-Like Kinases: how do they sense the outside? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, p. 5–25, 2017.
- BEZERRA, E. H. S. *et al.* Structural analysis of ConBr reveals molecular correlation between the carbohydrate recognition domain and endothelial NO synthase activation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 408, n. 4, p. 566–570, 2011.
- BEZERRA, G. A. *et al.* Structural analysis of *Canavalia maritima* and *Canavalia gladiata* lectins complexed with different dimannosides: new insights into the understanding of the structure – biological activity relationship in legume lectins. **Journal of Structural Biology**, v. 160, p. 168–176, 2007.
- BORREBAECK, C. A. K.; LINSEFORS, L. Hormonal Regulation of the Lectin Biosynthesis in Callus Culture of the Phaseolus vulgaris Plant. **Plant Physiology**, v. 79, n. 9, p. 659–622, 1985.
- BRINDA, K. V; MITRA, N.; SUROLIA, A. Determinants of quaternary association in legume lectins. **Protein Science**, v. 13, p. 1735–1749, 2004.
- CARRINGTON, D. M.; AUFFRET, A.; HANKE, D. E. Polypeptide ligation occurs during post-translational modification of concanavalin A. **Nature**, v. 313, p. 64–67, 1985.

- CASANOVA-SÁEZ, R.; MATEO-BONMATÍ, E.; LJUNG, K. Auxin metabolism in plants. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 11, n. 3, p. 1–23, 2021.
- CAVADA, B. S. *et al.* Revisiting proteus: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? lessons from and potential biotechnological uses of the *diocleinae* subtribe lectins. **Current Protein and Peptide Science**, v. 2, p. 123–135, 2001.
- CAVALCANTE, T. T. A. *et al.* Effect of Lectins from *Diocleinae* Subtribe against Oral Streptococci. **Molecules**, v. 16, p. 3530–3543, 2011.
- CECCATTO, V. *et al.* Purification and Partial Characterization of a Lectin from *Canavalia Grandiflora* Benth. Seeds. **Protein & Peptide Letters**, v. 9, n. 1, p. 67–73, 2005.
- CHEN, V. B. *et al.* MolProbity: All-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 66, n. 1, p. 12–21, 2010.
- CUNNINGHAM, B. A. *et al.* The Covalent and Three-Dimensional Structure of Concanavalin A. **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, n. 4, p. 1503–1512, 1975.
- D'CUNHA, M.; SRIDHAR, K. R. Micropropagation of the wild legume *Canavalia rosea* (Sw.) DC . from coastal sand dunes. **Biological Lett.**, v. 48, n. 1, p. 85–96, 2011.
- DELATORRE, P. *et al.* Crystal structure of a lectin from *Canavalia maritima* (ConM) in complex with trehalose and maltose reveals relevant mutation in ConA-like lectins. **Journal of Structural Biology**, v. 154, p. 280–286, 2006.
- DELATORRE, P. *et al.* Structure of a lectin from *Canavalia gladiata* seeds: New structural insights for old molecules. **BMC Structural Biology**, v. 7, p. 1–9, 2007.
- DELATORRE, P. *et al.* Interactions between indole-3-acetic acid (IAA) with a lectin from *Canavalia maritima* seeds reveal a new function for lectins in plant physiology. **Biochimie**, v. 95, n. 9, p. 1697–1703, 2013.
- EDGAR, R. C. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 5, p. 1792–1797, 2004.
- EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: Model-building tools for molecular graphics. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 60, n. 12 I, p. 2126–2132, 2004.
- EVANS, P. R. An introduction to data reduction: Space-group determination, scaling and intensity statistics. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 67, n. 4, p. 282–292, 2011.
- FAYE, L.; CHRISPEELS, M. J. Transport and processing of the glycosylated precursor of Concanavalin A in *jack-bean*. **Planta**, v. 170, n. 2, p. 217–224, 1987.
- FRICK, E. M.; STRADER, L. C. Roles for IBA-derived auxin in plant development. **Journal of Experimental Botany**, v. 69, n. 2, p. 169–177, 2018.
- GADELHA, C. A. DE A. *et al.* Native crystal structure of a nitric oxide-releasing lectin from the seeds of *Canavalia maritima*. **Journal of Structural Biology**, v. 152, p.

185–194, 2005.

GAUTAM, A. K. *et al.* Biochemical and functional properties of a lectin purified from the seeds of *Cicer arietinum* L. **3 Biotech**, v. 8, n. 6, p. 1–11, 2018.

GOMES, J. C. *et al.* Histamine release induced by glucose (mannose)-specific lectins isolated from Brazilian beans . Comparison with concanavalin A. **Agents Actions**, v. 41, p. 132–135, 1994.

GONDIM, A. C. S. *et al.* The potent anti-cancer activity of *Dioclea lasiocarpa* lectin. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 175, p. 179–189, 2017.

GONDIM, A. C. S. *et al.* Potent antiviral activity of carbohydrate-specific algal and leguminous lectins from the Brazilian biodiversity. **Med. Chem. Comm.**, p. 1–9, 2018.

GRANT, B. J. *et al.* Bio3d: An R package for the comparative analysis of protein structures. **Bioinformatics**, v. 22, n. 21, p. 2695–2696, 2006.

GRANT, B. J.; SKJÆRVEN, L.; YAO, X. Q. The Bio3D packages for structural bioinformatics. **Protein Science**, v. 30, n. 1, p. 20–30, 2021.

GROSSMANN, K. Auxin herbicides: current status of mechanism and mode of action. **Pest Management Science**, v. 66, n. 2, p. 113–120, 2009.

HARDMAN, K. D.; AINSWORTH, C. F. Structure of Concanavalin A at 2.4-Å Resolution. **BIOCHEMISTRY**, v. 11, n. 26, p. 4910–4919, 1972.

HOFF, P. L. DE; BRILL, L. M.; HIRSCH, A. M. Plant lectins : the ties that bind in root symbiosis and plant defense. **Mol Genet Genomics**, v. 282, p. 1–15, 2009.

INGALE, A. G.; HIVRALE, A. U. Plant as a plenteous reserve of lectin. **Plant Signaling & Behavior** 8:12, v. 8, p. 1–7, 2013.

KABSCH, W. XDS. **Acta Crystallographica Section D**, v. D66, p. 125–132, 2010.

KARIMIAN, R.; LAHOUTI, M.; DAVARPANAH, S. J. Effects of different concentrations of 2, 4-D and kinetin on callogenesis of *Taxus brevifolia* nutt. **Journal of Applied Biotechnology Reports**, v. 1, n. 4, p. 167–170, 2014.

KATOCH, R.; TRIPATHI, A. Research advances and prospects of legume lectins. **Journal of Biosciences**, v. 46, n. 4, p. 1–30, 2021.

KORASICK, D. A.; ENDERS, T. A.; STRADER, L. C. Auxin biosynthesis and storage forms. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 9, p. 2541–2555, 2013.

LAGARDA-DIAZ, I.; GUZMAN-PARTIDA, A. M.; VAZQUEZ-MORENO, L. Legume Lectins: proteins with diverse applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, p. 1–18, 2017.

LEYSER, O. Auxin Signaling. **Founders Review**, v. 176, p. 465–479, 2018.

LORD, J. M.; ROBERTS, L. M.; ROBERTUS, J. D. Ricin: structure, and some current applications. **The FASEB Journal**, v. 8, p. 201–208, 1994.

LORIS, R. *et al.* Legume lectin structure. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1383, n. 1, p. 9–36, 1998.

MASHIGUCHI, K. *et al.* The main auxin biosynthesis pathway in *Arabidopsis*.



**Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 45, p. 18512–18517, 2011.

MATTHEWS, B. W. Solvent content of protein crystals. **Journal of Molecular Biology**, v. 33, n. 2, p. 491–497, 1968.

MAYERNI, R. *et al.* Effect of auxin (2,4-D) and cytokinin (BAP) in callus induction of local patchouli plants (*Pogostemon cablin* Benth.). **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 583, n. 1, 2020.

MAZALOVSKA, M.; KOUOKAM, J. C. Review Article Plant-Derived Lectins as Potential Cancer Therapeutics and Diagnostic Tools. **BioMed Research International**, v. 2020, p. 1–13, 2020.

MCCOY, A. J. *et al.* Phaser crystallographic software. **Journal of Applied Crystallography**, v. 40, n. 4, p. 658–674, 2007.

MENDOZA-GONZÁLEZ, G.; MARTÍNEZ, M. L.; LITHGOW, D. Biological Flora of Coastal Dunes and Wetlands : *Canavalia rosea* (Sw.) DC. **Journal of Coastal Research**, v. 30, n. 4, p. 697–713, 2014.

MISHRA, A. *et al.* Structure-function and application of plant lectins in disease biology and immunity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 134, p. 1–17, 2019.

MOHAMAD, M. E. *et al.* *In vitro* study on the effect of cytokines and auxins addition to growth medium on the micropropagation and rooting of *Paulownia* species (*Paulownia hybrid* and *Paulownia tomentosa*). **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 29, n. 3, p. 1598–1603, 2022.

MOREIRA, R. D. A.; PERRONE, J. C. Purification and Partial Characterization of a Lectin from *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology**, v. 59, n. 5, p. 783–787, 1977.

MORENO, F. B. M. B. *et al.* Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of an anti-H (O) lectin from *Lotus tetragonolobus* seeds. **Acta Crystallographica Section F**, v. F62, n. April, p. 680–683, 2006.

NAGANO, C. S. *et al.* Insights into the structural basis of the pH-dependent dimer-tetramer equilibrium through crystallographic analysis of recombinant *Diocleinae* lectins. **Biochemical Journal**, v. 409, n. 2, p. 417–428, 2008.

NONIS, S. G. *et al.* Structural and biochemical analyses of concanavalin A circular permutation by *jack bean* asparaginyl endopeptidase. **Plant Cell**, v. 33, n. 8, p. 2794–2811, 2021.

OLIVEIRA, M. E. B. S.; SARTORATTO, A.; CARLOS CARDOSO, J. *In Vitro* Calli Production Resulted in Different Profiles of Plant-Derived Medicinal Compounds in *Phyllanthus amarus*. **Molecules** (Basel, Switzerland), v. 25, n. 24, p. 1–15, 2020.

ORLIKOWSKA, T.; SABALA, I.; KUCHARSKA, D. The effect of leaf and shoot tip removal and explant orientation on axillary shoot proliferation of *Codiaeum variegatum* Blume var. *pictum* Muell. Arg. cv. Excellent. **Scientia Horticulturae**, v. 85, p. 103–111, 2000.

PEREZ, G. *et al.* Comparison of the Amino Acid Sequences of the Lectins from Seeds of *Dioclea Lehmanni* and *Canavalia Maritima*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 8, p. 2619–2621, 1991.

- PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, v. 109, n. 2, p. 347–352, 1995a.
- PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. The role of lectins in plant defense. **Histochemical Journal**, v. 27, n. 4, p. 253–271, 1995b.
- PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Plant Lectins : versatile proteins with important perspectives in Biotechnology. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 15, p. 199–228, 1998.
- PINTO, N. V. *et al.* Effects of *Canavalia* lectins on Acute Inflammation in Sensitized and Non-sensitized Rats. **Inflammation**, v. 36, n. 3, p. 713–722, 2013.
- RAMIS, C. *et al.* Deglycosylation is necessary but not sufficient for activation of proconcanavalin A. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, n. 358, p. 911–917, 2001.
- RUDIGER, H.; GABIUS, H.-J. Plant lectins : occurrence , biochemistry, functions and applications. **Glycoconjugate Journal**, v. 18, p. 589–613, 2001.
- SALES, M. V. **Bases Estruturais da Interação da Lectina de *Canavalia brasiliensis* Mart. ex Benth. (ConBr) com o Fitohormônio Ácido Indole-3-Acético.** [s.l.] Universidade Federal do Ceará (Dissertação), 2019.
- SHARON, N. Lectins: Carbohydrate-specific Reagents and Biological Recognition Molecules. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 5, p. 2753–2764, 2007.
- SHARON, N.; LIS, H. How Proteins Bind Carbohydrates : lessons from legume lectins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 22, p. 6586–6591, 2002.
- SCHRÖDINGER, LLC, 2020. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.4.0.
- SIMON, S.; PETRÁŠEK, J. Why plants need more than one type of auxin. **Plant Science**, v. 180, n. 3, p. 454–460, 2011.
- SINHA, S. *et al.* Subunit assembly of plant lectins. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 17, n. 5, p. 498–505, 2007.
- ŠÍPOŠOVÁ, K. *et al.* The effects of IBA on the composition of maize root cell walls. **Journal of Plant Physiology**, v. 239, p. 1–24, 2019.
- SKJAERVEN, L. *et al.* Integrating protein structural dynamics and evolutionary analysis with Bio3D. **BMC Bioinformatics**, v. 15, n. 1, p. 1–11, 2014.
- SONG, Y. Insight into the mode of action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) as an herbicide. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 56, n. 2, p. 106–113, 2013.
- SRIDHAR, K. R.; SEENA, S. Nutritional and antinutritional significance of four unconventional legumes of the genus *Canavalia* – A comparative study. **Food Chemistry**, v. 99, n. January 2018, p. 267–288, 2006.
- STEPANOVA, A. N. *et al.* The Arabidopsis YUCCA1 Flavin Monooxygenase functions in the Indole-3-Pyruvic acid branch of Auxin Biosynthesis. **Plant Cell**, v. 23, n. 11, p. 3961–3973, 2011.
- STRADER, L. C.; BARTEL, B. Transport and Metabolism of the Endogenous Auxin

- Precursor Indole-3-Butyric Acid. **Molecular Plant**, v. 4, n. 3, p. 477–486, 2011.
- SUMNER, J. B.; HOWELL, S. F. The Identification of the Hemagglutinin of the *Jack Bean* With Concanavalin A. **Journal of Bacteriology**, v. 32, n. 2, p. 227–237, 1936.
- TAN, X. *et al.* Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. **Nature**, v. 446, n. 7136, p. 640–645, 2007.
- TSANEVA, M.; VAN DAMME, E. J. M. 130 years of Plant Lectin Research. **Glycoconjugate Journal**, v. 37, n. 4, p. 533–551, 2020.
- UCHIDA, H. *et al.* Plant regeneration from internode explants of *Euphorbia tirucalli*. **Plant Biotechnology**, v. 21, n. 5, p. 397–399, 2004.
- VAN DAMME, E. J. M. *et al.* Plant Lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Reviews in Plant Sciences**, v. 17, n. 6, p. 575–692, 1998.
- VAN DAMME, E. J. M. 35 Years in Plant Lectin Research: a Journey From Basic Science To Applications in Agriculture and Medicine. **Glycoconjugate Journal**, p. 1–15, 2021.
- WAH, D. A. *et al.* Crystal Structure of Native and Cd/Cd-substituted Dioclea guianensis Seed Lectin . A Novel Manganese- binding Site and Structural Basis of Dimer- tetramer Association. **Journal of Molecular Biology**, v. 310, p. 885–894, 2001.
- WANG, J. L. *et al.* The Covalent Concanavalin Three-Dimensional Structure. **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, n. 4, p. 1490–1502, 1975.
- WOODWARD, A. W.; BARTEL, B. **Auxin: Regulation, action, and interaction** *Annals of Botany*, 2005.
- WRIGHT, T. R. *et al.* Robust crop resistance to broadleaf and grass herbicides provided by aryloxyalkanoate dioxygenase transgenes. **PNAS**, v. 107, n. 47, p. 20240–20245, 2010.
- WU, D. *et al.* Probing N-glycoprotein microheterogeneity by lectin affinity purification-mass spectrometry analysis. **Chemical Science**, v. 10, p. 5146–5155, 2019.
- ZAŽÍMALOVÁ, E. *et al.* Auxin Transporters — Why So Many ? **Cold Spring Harb Perspect Biol.**, v. 2, n. 3, p. 1–14, 2010.
- ZOLMAN, B. K.; YODER, A.; BARTEL, B. Genetic Analysis of Indole-3-butyric Acid Responses in *Arabidopsis thaliana* Reveals Four Mutant Classes. **Genetics Society of America Genetic**, v. 156, p. 1323–1337, 2000.

## APÊNDICE A – ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE DA ConM

As sementes de *Canavalia maritima* foram coletadas na Praia de Tabuba no município de Caucaia, Ceará, Brasil. As coletas foram autorizadas por meio de nosso registro no SISGEN (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado, ID: AFD4698). Em seguida, as melhores sementes foram selecionadas e os tegumentos foram removidos, expondo-se o endosperma, o qual foi triturado em um moedor de café e peneirado, obtendo-se uma farinha fina (Figura A1).

**Figura A1** – Vagens, sementes, endosperma e farinha de *Canavalia maritima*

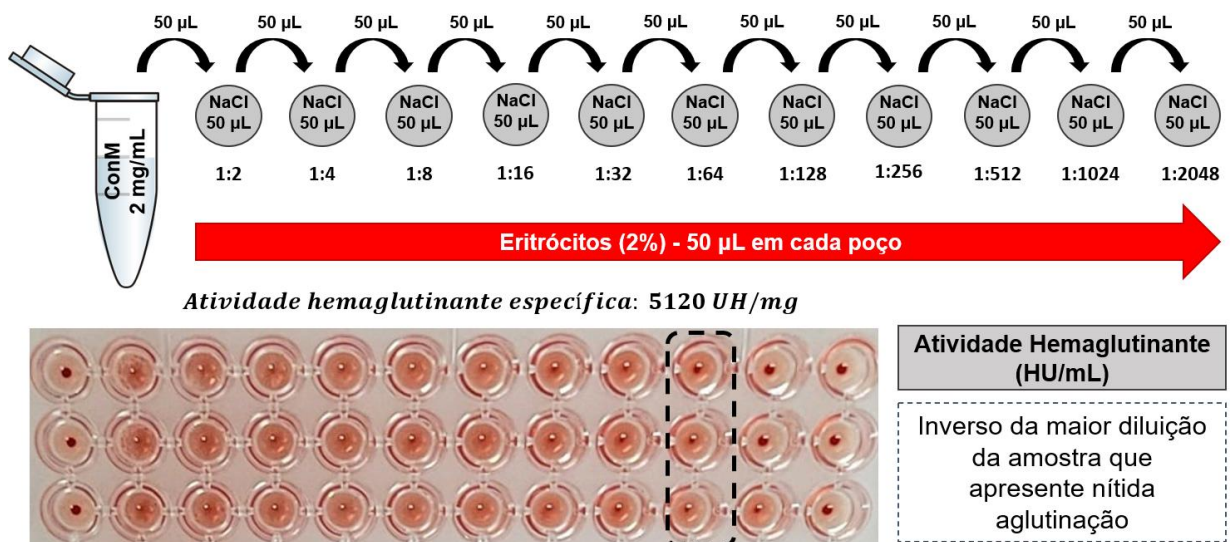


Fonte: elaborada pela autora.

As proteínas solúveis foram extraídas em solução de NaCl 0,15 M, na proporção de massa:volume (1:10), sob agitação por 3 horas à temperatura ambiente. O material, em seguida, foi centrifugado a 10.000 xg durante 30 min a 4 °C. O sobrenadante foi denominado extrato total, sendo filtrado em papel de filtro e submetido à purificação em coluna cromatográfica de afinidade Sephadex G-100 seguindo protocolo previamente estabelecido por Ceccatto *et al.* (2002). Após a purificação, foram realizados os ensaios para a detecção de atividade hemaglutinante das amostras, os quais foram realizados através de diluições seriadas em microplaca de 96 poços do tipo fundo “V”, a partir de uma adaptação ao método descrito por Moreira e Perrone (1977). As amostras contendo a lectina foram diluídas, em triplicata,

em solução NaCl 0,15 M, de forma seriada nos poços, seguindo a proporção de 1:2, 1:4, 1:8 e assim por diante. Após a diluição seriada, foi adicionado 50  $\mu$ L da suspensão de eritrócitos de coelho 2% (v/v). O controle negativo foi constituído por NaCl 0,15 M e solução de hemácias 2%. Após 30 min de incubação a 37 °C e repouso por mais 30 min a temperatura ambiente, a presença ou não de hemaglutinação foi observada macroscopicamente a olho nu. Como pode ser observado a partir da Figura A2, a ConM apresentou atividade específica de 5120 UH/mg de proteína. Vale ressaltar que o grupo controle não apresentou atividade hemaglutinante.

**Figura A2** – Atividade hemaglutinante do pico retido na purificação da ConM. A ConM apresentou uma atividade específica de 5120 UH/mg



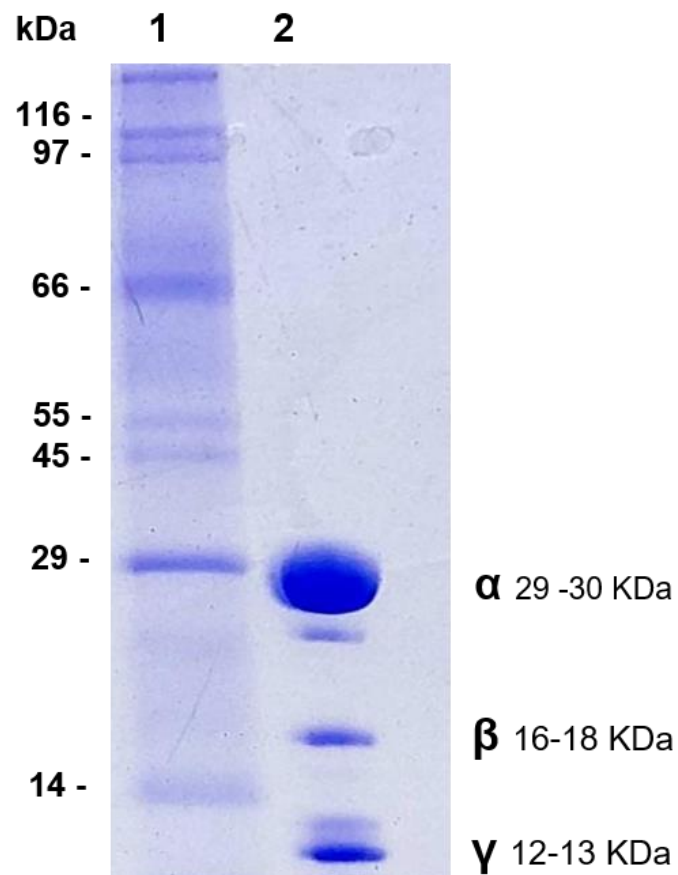
**Nota:** O ensaio foi realizado em triplicata. A primeira coluna representa o grupo controle e as demais representam a atividade da ConM em diluição seriada.

## APÊNDICE B – PERFIL ELETROFORÉTICO DA ConM

O perfil eletroforético da ConM mostrou que a proteína foi obtida em sua forma pura e livre de contaminantes (Figura B1). A partir do perfil eletroforético pode-se visualizar a composição de três bandas proteicas:

- Cadeia  $\alpha$ : molecular aparente de 30 kDa;
- Cadeia  $\beta$ : molecular aparente de 14 kDa
- Cadeia  $\gamma$ : molecular aparente de 12 kDa

**Figura B1** – Perfil eletroforético da ConM purificada. SDS-PAGE 12,5 % na presença de 2-mercaptoetanol. Em (1) Padrão de peso molecular:  $\beta$ -Galactosidase (116 kDa); Fosforilase  $\beta$  (97 KDa); Albumina sérica bovina (66 kDa); Glutamato desidrogenase (55 kDa); Ovoalbumina (45 kDa); Anidrase carbónica (30 kDa) e  $\alpha$ -lactoalbumina (14 kDa). (2) ConM e a visualização das subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ .



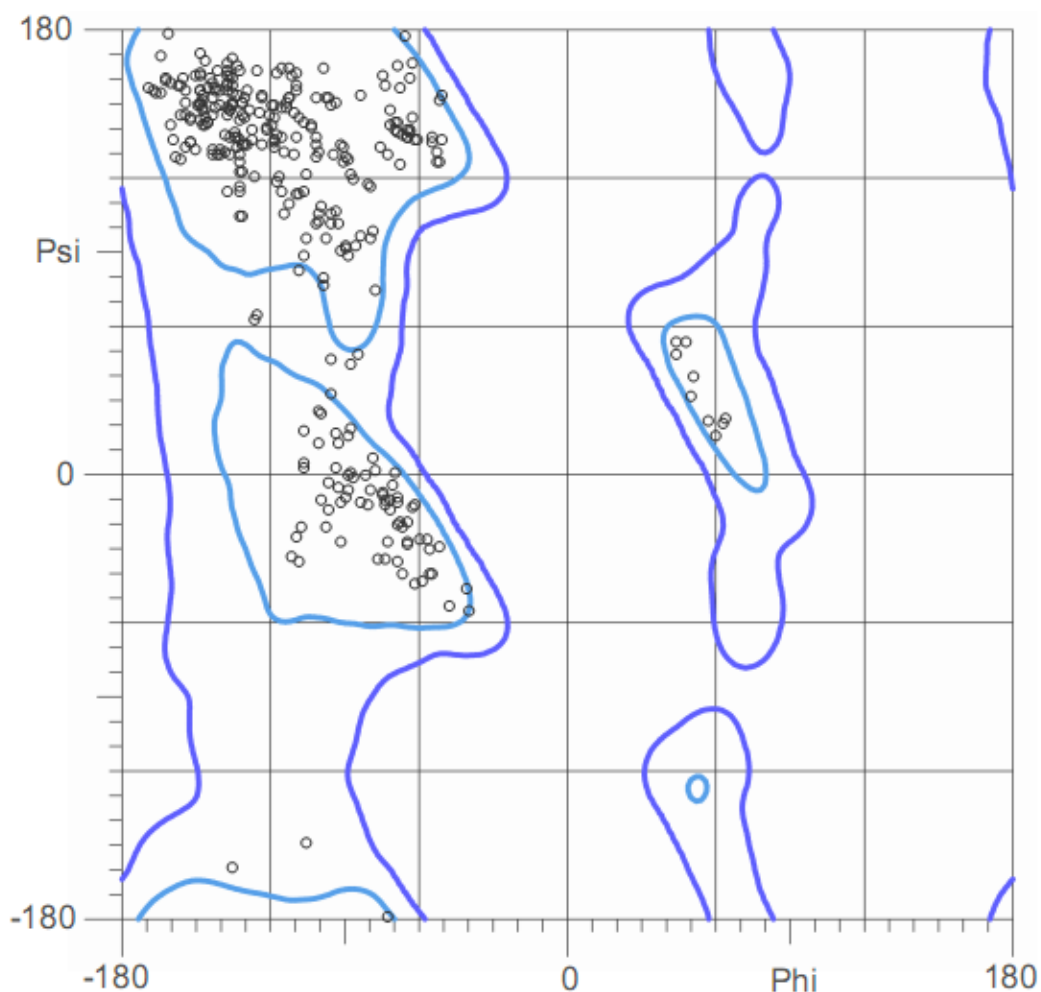
Esse perfil eletroforético é característico das lectinas da família das leguminosas, resultado de clivagens da proteína durante o processamento pós-

traducional (sessão 2.3.1). Do ponto de vista estrutural as lectinas de leguminosas são geralmente compostas de duas ou quatro subunidades iguais ou diferentes com massa molecular de 25 a 30 kDa. Cada unidade monomérica é constituída por aproximadamente 237 resíduos de aminoácidos, denominada de subunidade  $\alpha$ . Essa subunidade é formada a partir da ligação entre os resíduos 118 e 119 (cadeia  $\beta$  e  $\gamma$ ), as quais podem ser visualizadas pelo fato de não ter havido a formação da ligação peptídica. No trabalho desenvolvido por Chrispeels e colaboradores verificaram ainda que ConA, por exemplo, pode apresentar uma massa relativa de 30 kDa em seu estado maduro, bem como apresentar produtos menores de 24, 19 e 13,5-12 kDa resultantes do processamento da proteína (CHRISPEELS *et al.*, 1986). Em resumo, de acordo com Nonis *et al.* (2021), subunidade  $\alpha$  é a representação do monômero da proteína com as subunidades  $\beta$  e  $\gamma$  ligadas, subunidade  $\beta$  compreende dos resíduos 1-118 e subunidade  $\gamma$  dos resíduos 119-237.

## APÊNDICE C – QUALIDADE ESTEREOQUÍMICA DAS ESTRUTURAS

A qualidade estereoquímica dos complexos estruturais ConM/AIB e ConM/2,4-D foi comprovada a partir do gráfico de Ramachandran, gerado pelo software Molprobit, o qual analisa as torções dos ângulos  $\Phi$  (phi) e  $\Psi$  (psi). As áreas representadas pela demarcação de cor azul claro correspondem à conformação em que não há choques estereoquímicos, isto é, regiões permitidas. As regiões generosamente permitidas estão representadas pela demarcação em azul escuro. As áreas representadas em branco correspondem as regiões em que ocorrem choques estereoquímicos nas proteínas, as quais são denominadas de regiões não permitidas.

**Figura C1** – Gráfico de Ramachandran obtido a partir da estrutura do complexo ConM/AIB



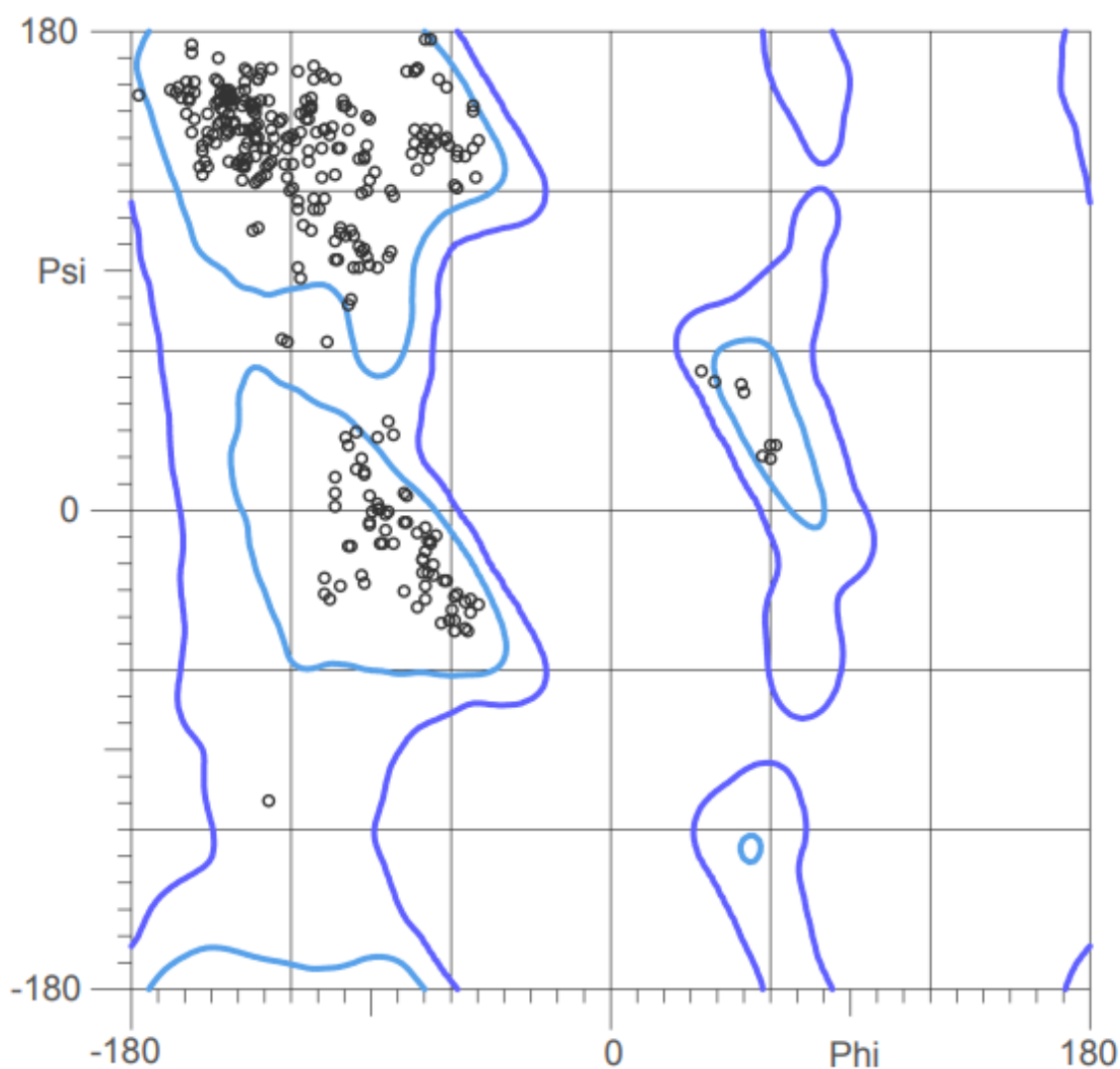
**Nota:** - 96,54% dos resíduos foram encontrados nas regiões mais favorecidas;  
- 3,24% foram localizados em regiões adicionalmente permitidas;  
- Nenhum resíduo foi encontrado em regiões não permitidas.



A partir do gráfico de Ramachandran para o complexo ConM/AIB, Figura C1, pode-se verificar que 96,54% dos resíduos foram encontrados nas regiões mais favorecidas e 3,24% foram localizados em regiões adicionalmente permitidas. Nenhum resíduo foi encontrado em regiões não permitidas.

O gráfico de Ramachandran para o complexo ConM/2,4-D, Figura C2, apresentou 97,39 % dos resíduos em regiões mais favorecidas e 2,61 % dos resíduos localizados em regiões adicionalmente permitidas. Nenhum resíduo foi encontrado em regiões não permitidas.

**Figura C2** – Gráfico de Ramachandran obtido a partir da estrutura do complexo ConM/2,4-D



**Nota:** - 97,39 % dos resíduos foram encontrados nas regiões mais favorecidas;  
- 2,61 % foram localizados em regiões adicionalmente permitidas;  
- Nenhum resíduo foi encontrado em regiões não permitidas.