

**ESTABELECIMENTO DA ESTRUTURA  
PRIMÁRIA E DADOS CRISTALOGRAFICOS DA  
PRIMEIRA LECTINA DE MIMOSOIDEAE  
PURIFICADA DE SEMENTES DE  
*Parkia platycephala* Benth**

**CREUZA MARIA SILVEIRA DE ARAÚJO FARIAS**

---

**TESE APRESENTADA À COORDENAÇÃO DO CURSO DE PÓS-  
GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM BIOQUÍMICA  
PELA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**

**FORTALEZA, 2002**

Esta Tese foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Bioquímica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.

A transcrição de qualquer trecho desta Tese é permitida, desde que seja feita de acordo com as normas de ética científica.

Creuza Maria Silveira de Araújo Farias

Tese aprovada em 30/08/2002

Professor ~~Dr.~~ Benildo Sousa Cavada  
Orientador de Tese  
Presidente

Professora Dra. Cláudia Ferreira Santos  
Conselheira

Professor ~~Dr.~~ José Luiz de Lima Filho  
Conselheiro

Professor Dr. Márcio Viana Ramos  
Conselheiro

Professor Dr. Thalles Barbosa Grangeiro  
Conselheiro

“Bem longe, lá na luz do sol,  
estão as minhas mais altas aspirações.  
Talvez eu não as alcance,  
Mas posso olhar para cima e  
ver sua beleza,  
acreditar nelas e  
tentar seguir para onde apontam”.

LOUISA MAY ALCOTT

A Deus,  
Ao meu marido Wellington,  
Aos meus pais Marco e Elizabete,  
Às minhas filhas Luma e Louise,  
Aos meus irmãos Diana, Silvia, Marco e Carlos Magno,  
À minha tia Carolina,  
Aos meus afilhados Thainá e Lucca

Dedico.



## AGRADECIMENTOS

De modo muito especial ao Professor Doutor Benildo Sousa Cavada pela orientação criteriosa desse trabalho, pela dedicação, compreensão, amizade e pela oportunidade que me proporcionou para crescer profissionalmente.

Aos professores Marcio Viana Ramos, Thalles Barbosa Grangeiro, Cláudia Ferreira Santos e José Luis de Lima Filho pelas valiosas sugestões e discussões apresentadas, sempre no intuito de engrandecer este trabalho científico.

De modo especial aos amigos Kátia Bonfim Leite, Tatiane Santi Gadelha, Nylane, Iza Rocha, Carlos Alberto de Almeida Gadelha, Celso Shiniti Nagano, Kíria, Renato Isidro, Frederico, Fernanda Nunes Guimarães, Edson Holanda, Liezelote Bomfim pela constante ajuda e valiosa colaboração no decorrer deste trabalho.

Ao caríssimo Dr. Juan José Calvete pela valiosa contribuição na realização e êxito do trabalho.

De maneira carinhosa à amiga Rita de Cássia Queiróz de Pontes pelo incentivo durante a realização do trabalho.

Agradeço a todos os professores e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC, em especial ao grupo BioMol-Lab pela cooperação e incentivo ao longo desse trabalho.

Aos mestres, em geral, que abriram novos horizontes em minha vida.

De modo muito especial e particular, agradeço as pessoas que mais amo, meus pais, motivo maior da minha existência, minha tia e madrinha, minhas irmãs e irmãos que estão e estarão sempre presentes em todos os momentos importantes da minha vida. Por fim, neste momento de grande realização tenho que expressar com satisfação o grande amor que sinto e a felicidade de ter junto a mim, o meu marido Wellington, e as minhas filhas Luma e Louise.

Aos colegas de trabalho Inês Xavier Martins, Paulo Roberto de Lavor Porto, Angela Muniz, João Batista Júnior pelo companheirismo e incentivo constante.

De modo especial à Diretora do Centro de Ciências da Unifor, Dra. Fátima Veras pelo apoio e ajuda no êxito deste trabalho.

Ao corpo científico da reitoria de Pesquisa Extensão e Pós-Graduação da Universidade de Fortaleza, na pessoa do Dr. Antonio Carlos Morano, pela confiança, ajuda e incentivo.

A todas as pessoas que não foram citadas anteriormente, mas que participaram direta ou indiretamente com sugestões ou críticas para a realização deste trabalho.

À todas as pessoas amigas, colegas ou não, que contribuíram direta ou indiretamente através do conforto espiritual, para a realização deste trabalho.

## ESTE TRABALHO FOI REALIZADO GRAÇAS AO AUXÍLIO DAS SEGUINTE INSTITUIÇÕES:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelos constantes auxílios de pesquisa concedidos ao BioMol-Lab (Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelos convênios estabelecidos com o Curso de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

Fundação Cearense de Amparo à Pesquisa (FUNCAP), pelos constantes auxílios de pesquisa concedidos ao BioMol-Lab (Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PADCT/CNPq), pelos constantes auxílios de pesquisa concedidos ao BioMol-Lab (Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

Universidade Federal do Ceará pelo apoio oferecido para as viagens de coleta de sementes e de material botânico.

Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, onde grande parte deste trabalho foi realizado.

Laboratório de Química de Proteínas e Biología Estructural do Instituto de Biomedicina de Valência-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IBV-CSIC), Espanha, Max Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, Alemanha onde parte deste trabalho foi realizado.



## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	ix
ABREVIATURAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1. <b><u>INTRODUÇÃO</u></b>	1
1.1. Definições e Considerações Gerais	1
1.2. Glicanos Alvo de Lectinas de Plantas	21
1.3. Especificidade da lectina de <i>Parkia platycephala</i> por carboidratos	24
1.4. Objetivos	26
2. <b><u>MATERIAIS</u></b>	27
2.1. Material Vegetal	27
2.2. Eritrócitos	28
2.3. Reagentes	28
3. <b><u>MÉTODOS</u></b>	29
3.1. Preparação da Farinha de Sementes de <i>Parkia platycephala</i> Benth	29
3.2. Extração e Fracionamento de Proteínas	29
3.3. Dosagem de Proteínas Solúveis	29
3.4. Determinação de Atividade Hemaglutinante	31
3.5. Cromatografia de Afinidade em Coluna de Sephadex G-100	31
3.6. Cromatografia de Afinidade em Coluna de Agarose-manose	32
3.7. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em Presença de SDS e 2-mercaptoetanol	32
3.8. Ultracentrifugação Analítica	32
3.9. Espectrometria de Massa	33
3.10. Degradações Químicas e Enzimáticas	33
3.11. Isolamento de Peptídeos	34
3.12. Análise de Aminoácidos e de Aminoaçúcares	34
3.13. Determinação da Seqüência de Aminoácidos	35
3.14. Determinação de Grupos Sulfidrilas e Pontes Dissulfeto	35

3.15.	Cristalização e Análise Preliminar de Difração de Raios X	36
4.	<b><u>RESULTADOS</u></b>	37
4.1.	Caracterização da Planta e das Sementes de <i>P.platycephala</i> Benth	37
4.2.	Purificação da Lectina de Sementes de <i>P.platycephala</i> Benth	37
4.3.	Eletroforese em SDS-PAGE em Presença de 2-mercaptoetanol da Lectina de Sementes de <i>P.platycephala</i> Benth	39
4.4.	Composição de Aminoácidos da Lectina de Sementes de <i>P.platycephala</i> Benth	40
4.5.	Estudos da Estrutura Molecular da Lectina de Sementes de <i>P.platycephala</i> Benth	40
4.6.	Composição de Aminoaçúcares da Lectina de Sementes de <i>P.platycephala</i> Benth	45
4.7.	Estrutura Primária da Lectina de Sementes de <i>P.platycephala</i> Benth	45
4.8.	Homologia de Seqüência entre a Lectina de <i>P.platycephala</i> Benth e outras Lectinas	45
4.9.	Estudos de Difração de Raios X de Cristais da Lectina de Sementes de <i>P.platycephala</i> Benth	47
4.10.	Estrutura Quaternária da Lectina de Sementes de <i>P.platycephala</i> Benth	47
5.	<b><u>DISCUSSÃO</u></b>	49
6.	<b><u>CONCLUSÃO</u></b>	54
7.	<b><u>BIBLIOGRAFIA CONSULTADA</u></b>	55
8.	<b><u>ANEXO (Trabalhos Completos Publicados)</u></b>	69

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Legenda	Página
01.	Vagem e sementes quiescentes de <i>Parkia platycephala</i> Benth	27
02.	Exemplar da planta <i>Parkia platycephala</i> Benth na Chapada do Araripe-Ce	27
03.	Fluxograma de extração, isolamento, purificação e caracterização de proteínas de <i>Parkia platycephala</i> Benth	30
04.	Cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-100	38
05.	Cromatografia de afinidade em coluna de Agarose-Manose	39
06.	Eletroforese em SDS-PAGE e 2-mercaptoetanol da lectina de <i>Parkia platycephala</i> Benth	40
07.	Espectro de massa ESI/MS da lectina de sementes de <i>Parkia platycephala</i> Benth	42
08.	Espectro de massa MS/MS do fragmento C-terminal CB <sub>2</sub> da lectina de sementes de <i>Parkia platycephala</i> Benth	43
09.	Eletroforese em SDS-PAGE e 2-mercaptoetanol com detecção de fluorescência da lectina de <i>Parkia platycephala</i> Benth tratada e não tratada com iodoacetamida	44
10.	Seqüência primária da lectina de <i>Parkia platycephala</i> Benth	46
11.	Alinhamento da seqüência de aminoácidos dos 3 domínios repetitivos da lectina de <i>Parkia platycephala</i> Benth com a lectina de <i>Calystegia sepium</i>	48

## LISTA DE TABELAS

Tabela	Legenda	Página
01.	Revisão da estrutura e especificidade de lectinas de plantas pertencentes às diferentes famílias de lectinas.	19
02.	Tribos da sub-família Mimosoideae	24
03.	Comparação da composição de aminoácidos da lectina PPL com a de outras lectinas do gênero <i>Parkia</i>	41



## ABREVIATURAS

Resíduos de aminoácidos (código protéico – IUPAC – IUB, 1972)

Código de 1 letra	Código de 3 letras	Aminoácido
A	ALA	Alanina
C	CYS	Cisteína
D	ASP	Ácido aspártico
E	GLU	Ácido glutâmico
F	PHE	Fenilalanina
G	GLY	Glicina
H	HIS	Histidina
I	ILE	Isoleucina
K	LYS	Lisina
L	LEU	Leucina
M	MET	Metionina
N	ASN	Asparagina
P	PRO	Prolina
Q	GLN	Glutamina
R	ARG	Arginina
S	SER	Serina
T	THR	Treonina
V	VAL	Valina
W	TRP	Triptofano
Y	TYR	Tirosina

EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
HPLC	Cromatografia líquida de alta pressão
m/v	Relação massa/volume
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Tris	Tris-hidroxiaminometano
MALDI	“Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization
TOF	“Time of Flight” (tempo de voo)



## RESUMO

A maioria dos estudos com lectinas da família Leguminosae envolve membros da sub-família Papilionoideae, enquanto que investigações sobre lectinas de outras duas sub-famílias, Caesalpinoideae e Mimosoideae, são escassas. Até o momento, nenhuma informação estrutural de nenhuma lectina de Mimosoideae foi publicada. O gênero *Parkia* é considerado um dos mais primitivos das leguminosas, compreendendo cerca de 30 espécies. A planta de *Parkia platycephala* Benth é uma importante forrageira que cresce no Nordeste do Brasil. A lectina de *P.platycephala* (PPL) pertence ao grupo específico por glicose/manose e manose e oligomanosídeos com ramificações  $\alpha$ 1-3 e  $\alpha$ 1-6, são seus melhores inibidores. A massa molecular da lectina purificada determinada por espectrometria de massa foi de  $47.946 \pm 6$ Da por ESI e de  $47\ 951 \pm 9$ Da por MALDI-TOF. A massa molecular aparente da lectina em soluções de pH na faixa de 4,5-8,5, determinada por ultracentrifugação analítica por equilíbrio de sedimentação, foi de  $94 \pm 3$ kDa, mostrando que a proteína comporta-se como um dímero não dependente de pH. A seqüência de aminoácidos da PPL foi determinada por degradação de Edman por sobreposição de peptídeos. Este é o primeiro relato da estrutura primária de uma lectina de Mimosoideae. O único resíduo de cisteína da PPL, ao ser marcado com eosina-5-iodoacetamida na ausência de agentes desnaturantes, indicou que o grupo tiol do mesmo está livre. A proteína contém um N-terminal bloqueado e uma cadeia polipeptídica única e não glicosilada composta de três domínios homólogos dispostos em seqüência. Cada domínio compartilha similaridade de seqüência de aminoácidos com lectinas relacionadas a jacalina. Baseado nesta homologia, os domínios repetidos de PPL podem apresentar uma estrutura em  $\beta$ -prisma semelhante à observada na estrutura cristalográfica da lectina de *Helianthus tuberosus*. A PPL pode ser considerada como um mosaico protéico composto de dois domínios jacalina-like de *Calistegya sepium* (Pk1 e Pk2) seguido de um domínio jacalina-like (Pk3) de *H.tuberosus*. Obtemos cristais ( $2,7\text{\AA}$ ) que tentamos resolver por substituição molecular usando a estrutura em  $\beta$ -prisma da lectina de *H.tuberosus* (PDB entry 1C3K). A especificidade de ligação a açúcar da PPL para manose, um abundante açúcar na superfície de glicoconjugados de vírus, bactérias e fungos sugere uma função da PPL na defesa de patógenos de plantas.

## ABSTRACT

Most studies on Leguminosae lectins involve members of the Papilionoideae subfamily, while investigations on lectins of the other two subfamilies, Caesalpinoideae and Mimosoideae, are scarce. To date no structural data of any Mimosoideae lectin has been reported. The genus *Parkia* is regarded as the most primitive group within Leguminosae plants, comprising around 30 species. *Parkia platycephala* Benth is an important forage tree growing in parts of north-eastern of Brazil. The lectin isolated from seeds of *P. platycephala* (PPL) belongs to the mannose/glucose-specific group and mannose and oligomannosides with  $\alpha$ 1-3 and  $\alpha$ 1-6 branch linkages are its best inhibitors. The molecular mass of the purified lectin determined by mass spectrometry was  $47\,946 \pm 6\text{Da}$  (by ESI/MS) and  $47\,951 \pm 9\text{Da}$  (by MALDI-TOF/ESI). The apparent molecular mass of the lectin in solutions of pH in the range 4.5-8.5 determined by analytical ultracentrifugation equilibrium sedimentation was  $94 \pm 3\text{kDa}$ , showing that the protein behaves as a non-pH dependent dimer. The amino-acid sequence of PPL was determined by Edman degradation of overlapping peptides. This is the **first report of the primary structure of a Mimosoideae lectin**. The unique cysteine residue of PPL, labeled with eosin-5-iodoacetamide in the absence of denaturing reagents, indicated that the thiol group is solvent-exposed. The protein contained a blocked N-terminus and a single, nonglycosylated polypeptide chain composed of three tandemly arranged homologous domains. Each of these domains shares amino-acid sequence similarity with jacalin-related lectins. Based on this homology, the repeated domain of PPL may display a  $\beta$  prism fold similar to that observed in the crystal structure of the lectin from *Helianthus tuberosus*. The PPL can be regarded as a mosaic protein composed of two N-terminal *Calistegya sepium* jacalin-like domains (Pk1 and Pk2  $\beta$  prism domains) followed by an *H.tuberosus* jacalin-like domain (Pk3  $\beta$  prism domain). We have obtained crystals ( $2.7 \text{ \AA}$ ) that we are trying to solve by molecular replacement using the  $\beta$  prism structure of the *H.tuberosus* lectin (PDB entry 1C3K). The sugar binding specificity of PPL towards mannose, an abundant sugar of surface glycoconjugates of viruses, bacteria, and fungi, suggests a role for PPL in the defense against plant pathogens.



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Definições e Considerações Gerais.

Lectinas são definidas atualmente como (glico)proteínas de origem não imune que apresentam pelo menos um sítio de ligação reversível a carboidratos ou glicocojugados (PEUMANS & VAN DAMME, 1995). Multivalência não deve ser um requisito absoluto para classificar estas proteínas, mesmo que seja ainda um fator importante para muitas lectinas. Desde que lectinas não apresentam atividade catalítica como enzimas, suas funções fisiológicas permanecem ainda obscuras. Por esta razão, o termo lectina tem sido usado algumas vezes como um táxon para agrupar proteínas que se ligam a carboidratos, as funções das quais são desconhecidas. No momento, todavia, nenhuma idéia iria opor-se de que lectinas são capazes de decifrar códigos de carboidratos. Lectinas são ainda classificadas baseadas na sua especificidade por açúcar, embora este método convencional seja proveitoso, ele não é relevante para especificidade refinada, lectinas de uma mesma categoria com especificidade por galactose mostra diferenças consideráveis na preferência de ligação a glicanos. Todavia, um número crescente de lectinas que nunca mostrou alta afinidade por açúcares simples têm sido encontradas. (HIRABAYASHI, 1997).

Lectinas formam um grupo estruturalmente heterogêneo de proteínas que se ligam a carboidratos, de origem não imune, incluindo famílias distintas de proteínas evolutivamente relacionadas. As lectinas são ubíquas na natureza e são encontradas em todos os tipos de organismos vivos e desempenham papéis biológicos em muitos processos celulares, tais como comunicação celular, defesa de hospedeiros, fertilização, desenvolvimento, infecção parasitária e metástase tumoral (GABIUS & GABIUS, 1997).

A função mais provável dessas lectinas de plantas é a defesa. Particularmente em leguminosas as lectinas estão também envolvidas no reconhecimento de bactérias fixadoras de nitrogênio com o propósito de estabelecer a simbiose entre a planta e o microorganismo. Proteínas com domínios semelhantes aos de lectinas de leguminosas também foram encontrados em células animais (YAMAMOTO, 2001).

Classificação é uma atividade humana natural, é acima de tudo um meio conveniente de agrupar conjuntos incompletos de dados de cada vez. Algumas lectinas das quais suas estruturas têm sido determinadas e registradas ainda permanecem órfãs, não possuindo proteínas homólogas no momento, tornando-se, portanto, difíceis de serem classificadas. Entretanto com o projeto Genoma de vários organismos, incluindo o humano, haverá um progresso rápido de elucidação de estruturas e certamente será relevante na classificação de lectinas, sobretudo no conceito de família de proteínas (genes).

Para a classificação proposta por HIRABAYASHI (1997) foram escolhidas poucas famílias representativas de lectinas:

- 1) Galectinas são famílias de lectinas animais que crescem rapidamente. Todas elas compartilham especificidade por galactose.
- 2) Lectinas dependentes de Ca (tipo-C) são lectinas animais que formam uma família extremamente vasta, composta de membros possuindo diversas estruturas e funções.
- 3) As Selectinas, entre as lectinas da família tipo-C formam uma subfamília distinguível por sua função específica de adesão de leucócitos a células endoteliais através do reconhecimento sialil-Lewis X.
- 4) Colectinas, outra subfamília das lectinas tipo-C tem especificidade por manose e uma única estrutura consistindo de um domínio de lectinas tipo-C e de um domínio tipo colágeno; são lectinas que supostamente estejam envolvidas na imunidade inata.
- 5) Nos invertebrados são conhecidas várias lectinas nos seus fluídos corporais, provavelmente como fatores de proteção. Recentemente algumas lectinas encontradas em ecnodermas apresentaram atividade hemolítica.
- 6) Anexinas são um grupo de proteínas tipo lectinas que têm mostrado uma certa atividade de ligação a glicosaminoglicanos e muita atenção tem sido dado às suas funções.

Todas as lectinas acima são de origem animal, mas há, também na mesma classificação, grupos de lectinas no reino vegetal:



- 7) As lectinas da família de leguminosas consistem de um vasto número de representantes, tais como a Con-A que possui diferente especificidade a carboidratos quando comparada as lectinas tipo-C. Recentemente, estudos estão sendo realizados para entender como tais especificidades e afinidades são controladas.
- 8) A ricina foi a primeira lectina investigada (na Estônia, então pertencente a Rússia) há mais de 100 anos atrás, e hoje já são bem conhecidos homólogos desta lectina que se diferenciam ou na toxicidade ou na especificidade de ligação a açúcares.

Todavia, as definições acima ainda não são suficientes para contemplar o grande e variável grupo das lectinas já conhecidas. Avanços recentes na caracterização, clonagem e análise estrutural permitiram classificar as lectinas de plantas em sete famílias de proteínas relacionando-as evolutiva e estruturalmente. Ainda que membros de uma mesma família sejam semelhantes, isso não significa necessariamente que sejam idênticos, pois naturalmente eles possuem individualidades. A questão da espécie-especificidade dos seres vivos deve ser sempre considerada. Uma vez compreendidas as lectinas nos aspectos geral e específico, desvendar-se-á a chave para entender a essência dos carboidratos e a existência (função) das lectinas (HIRABAYASHI, 1997).

Geralmente dentro de cada família de lectinas o dobramento (folding) do monômero e a estrutura dos sítios de ligação a carboidrato são conservados. Esta conservação estrutural está refletida na especificidade muito semelhante de lectinas pertencentes às famílias das Amarantinas, das lectinas que se ligam a quitina compostas de domínio de Heveína, das lectinas de floema de Cucurbitaceae, das lectinas de monocotiledôneas que se ligam a manose e das proteínas tipo II que inativam ribossomos. Dentro da família de lectinas relacionadas a jacalina, o mesmo dobramento permite a construção de dois sítios de ligação estruturalmente semelhantes mas com especificidade diferentes, e na família de lectinas de leguminosas uma simples estrutura permite a formação de sítios de ligação com ampla especificidade devido a diferenças estruturais no sítio. Uma análise da relação entre estrutura e especificidade de lectinas de plantas pode levar a importantes conclusões. Primeiro, várias famílias de lectinas exibem uma especificidade extremamente conservada, embora outras incluam um amplo grau de especificidades. Segundo, alguns carboidratos são reconhecidos por diferentes estruturas múltiplas de ligação a carboidratos conhecidas como motivos



(motifs). Terceiro, o desenvolvimento de porções de ligações múltiplas a manose, quitina e Gal/GalNAc realça a importância para a planta de um sistema sensível à presença desses açúcares. Um exame ainda mais acurado indica que muitas lectinas de plantas não são direcionadas contra carboidratos de plantas, mas preferencialmente com ligação a carboidratos exógenos (PEUMANS *et al*, 2000a).

Muitas plantas contêm uma ou mais proteínas que se ligam a carboidratos, que são conhecidas como aglutininas ou hemaglutininas. Embora a história científica de lectinas de plantas seja datada de 1888, quando Stillmark publicou sua dissertação sobre “ricina”, alguns dos mais importantes conceitos sobre a atividade de ligação a carboidratos, estrutura, evolução e função de lectinas de plantas têm sido revelados somente recentemente. Durante as últimas décadas, duas importantes descobertas se destacaram e mudaram completamente a percepção da relação entre a estrutura e a função de lectinas de plantas. Primeiro, o progresso dramático realizado na clonagem molecular e análise estrutural demonstrou e continuam demonstrando claramente que plantas desenvolveram somente um número limitado de famílias de lectinas relacionadas evolutivamente e estruturalmente, cada qual possuindo sua estrutura tridimensional própria (VAN DAMME *et al*, 1998). Segundo, os estudos detalhados forneceram e continuam fornecendo amplas evidências que muitas lectinas de plantas não são alvos contra glicanos endógenos, mas de preferência contra glicanos incomuns às plantas. Para ilustrar esse novo conceito, faz-se necessário uma breve revisão nos novos enfoques de se estudar a análise molecular/estrutural de lectinas de plantas e na identificação de glicanos alvos naturais dessas proteínas. No princípio fundamental desta abordagem, as relações de estrutura e especificidade dentro do grupo inteiro de lectinas de plantas são analisadas em detalhes e são discutidas as implicações do seu papel fisiológico. Desde então, houve uma longa controvérsia sobre a definição de lectinas em geral e de lectinas de plantas em particular, e como base fundamental inclui a definição clara de que tais proteínas de plantas são consideradas ‘lectinas’, e que as mesmas se caracterizam originalmente pela sua habilidade em reconhecer e ligar-se específica e reversivelmente a carboidratos. Lectinas de plantas são ainda subdivididas com base nas estruturas gerais de proteínas adultas nativas em “Merolectinas”, “Hololectinas”, “Quimerlectinas” e “Superlectinas”. Merolectinas que consistem de um simples domínio de ligação a carboidrato, isto é, são monovalentes e não precipitam glicoconjugados ou aglutinam células; Hololectinas também consistem exclusivamente



de dois ou mais domínios idênticos ou muito homólogos que se ligam ao mesmo açúcar ou açúcares estruturalmente semelhantes, e são por definição di ou multivalentes e aglutinam células e/ou precipitam glicoconjugados. Algumas lectinas consistem de dois ou mais domínios de ligação a carboidratos que reconhecem estruturalmente açúcares não relacionados. Para distinguir este tipo de lectinas de Hololectinas genuínas elas são chamadas Superlectinas. Outras lectinas são proteínas quiméricas consistindo de um ou mais domínios de ligação a carboidratos dispostos em seqüência e de um domínio não relacionado a ligação com carboidratos. Este domínio não relacionado possui uma atividade enzimática bem definida ou outra atividade biológica que deve agir independentemente do domínio de ligação a carboidrato. Por esta natureza quimérica estas últimas são conhecidas como Quimerolectinas (PEUMANS & VAN DAMME, 1995).

No momento, aproximadamente 300 lectinas diferentes de plantas foram isoladas e caracterizadas em relação a sua estrutura molecular, propriedades bioquímicas e especificidades a carboidratos (VAN DAMME *et al*, 1998). Devido a diferenças óbvias nas propriedades bioquímicas e fisicoquímicas, na estrutura molecular, na especificidade de ligação a carboidratos e nas atividades biológicas dessas lectinas, concluiu-se tratar de um grupo muito heterogêneo de proteínas. Todavia, um exame mais acurado permitiu traçar relações evolutivas entre as lectinas de plantas conhecidas atualmente. Baseado nestas relações as lectinas de plantas são divididas em sete famílias de proteínas relacionadas evolutivamente e estruturalmente: (1) A família de lectinas relacionadas a Amarantina; (2) as lectinas compostas de domínios que se ligam a quitina semelhantes aos da proteína Heveína; (3) as lectinas de floema de *Cucurbitaceae*; (4) as lectinas relacionadas a jacalina; (5) as lectinas de monocotiledôneas que se ligam a manose; (6) lectinas relacionadas a estrutura das RIPs tipo II e (7) as lectinas com estrutura tipo ConA (VAN DAMME *et al*, 1998). Concomitantemente com o progresso realizado no sequenciamento e clonagem de lectinas de plantas, avanços têm sido realizados na análise estrutural de lectinas de plantas usando difração de raios X e análise por ressonância magnética nuclear (NMR). Numerosas estruturas de lectinas têm sido determinadas e a resolução de novas estruturas é cada vez mais freqüente. Como resultado, os dobramentos gerais e as estruturas tridimensionais dos sítios de ligação a carboidratos de lectinas representativas das sete famílias citadas anteriormente foram conhecidas a nível atômico, permitindo



não somente um estudo das interações lectina-carboidrato a nível molecular, mas também demonstrando que cada família de lectina tem sua estrutura funcional própria e estruturas repetitivas que se ligam a açúcares complementares.

#### 1- A família de lectinas de Amarantina.

As Amarantinas são uma pequena família de lectinas que foram identificadas exclusivamente em sementes de espécies do gênero *Amaranthus*, que foram chamadas depois de Amarantinas, o nome trivial dado à lectina de *Amaranthus caudatus*. Todas as lectinas de *Amaranthus* são proteínas homodiméricas consistindo de subunidades não glicosiladas idênticas de aproximadamente 33kDa. A estrutura tridimensional de Amarantina foi resolvida a 2,2 Å (TRANSUE *et al*, 1997). Basicamente os protômeros consistem de dois domínios homólogos (chamados C e N) ligados por uma hélice curta. Ambos os domínios tem uma estrutura em  $\beta$ -folha tripla consistindo de seis segmentos antiparalelos em folha  $\beta$  com três grampos  $\beta$  no topo, formando uma estrutura que lembra um barril comumente chamado de  $\beta$ -barril (barrel- $\beta$ ). Os domínios C e N são ligados por uma hélice  $3_{10}$  e formam um protômero oval com o coroamento de grampo  $\beta$  de cada domínio localizado em ambas as terminações do monômero. Dímeros são formados por uma associação frente e costa de dois monômeros, dos quais, o domínio N da face de um monômero com o domínio C do outro monômero. Contatos extensivos não covalentes estabilizam a proteína, que possui duas superfícies expostas de sítios que se ligam a carboidratos que aparecem como depressões rasas na interface entre os domínios C e N de dois monômeros frontais. Estudos da especificidade detalhada demonstraram que Amarantinas são inibidas por GalNAc mas exibem uma grande afinidade pelo dissacarídeo antígeno T Gal  $\beta(1,3)$ GalNAc (RINDERLE *et al*, 1989). A estrutura do sítio de ligação foi resolvida por análise cristalográfica do dissacarídeo antígeno T benzilado em complexo com a Amarantina. A ligação é mediada por um complexo padrão de ponte de hidrogênio, que envolve resíduos de aminoácidos localizados principalmente em grampos e curvas expostos na superfície da molécula. A terminação reduzida de GalNAc do dissacarídeo interage exclusivamente com resíduos localizados no domínio N (Asn<sup>74</sup> - His<sup>75</sup> - Tyr<sup>76</sup> - Trp<sup>77</sup> do grampo 2; Tyr<sup>124</sup> - Val<sup>126</sup> - Phe<sup>130</sup> do grampo 3; e o resíduo Phe<sup>135</sup> de uma folha  $\beta$  do grampo 3). Em contraste, a Gal não reduzida do dissacarídeo interage através de pontes de hidrogênio (que são freqüentemente mediadas por moléculas de água) com Met<sup>261</sup> - Gln<sup>262</sup> - Lys<sup>263</sup> - Thr<sup>264</sup>



de uma volta do domínio C e a cadeia lateral da Asn<sup>74</sup> do domínio N. Vale mencionar que nenhum contato hidrofóbico formou-se entre o dissacarídeo e a superfície da lectina, e que os anéis piranosídicos do antígeno T são aproximadamente paralelos à superfície da proteína.

2- Lectinas compostas de domínios que se ligam a quitina semelhante ao da proteína Heveína.

A família de lectinas que se ligam a quitina compreende por definição todas as proteínas de plantas que possuem pelo menos um domínio de Heveína. Assim, um domínio de Heveína é definido como uma unidade estrutural de cerca de 40 resíduos de aminoácidos, que exhibe similaridade de seqüência a Heveína, a proteína de 43 aminoácidos isolada do látex da seringueira (*Hevea brasiliensis*)<sup>1</sup>. Lectinas que se ligam a quitina que não possuem o domínio de Heveína são classificadas em outra família de lectinas (em geral, lectinas com estrutura tipo a ConA e lectinas de floema de Cucurbitaceae). Lectinas que se ligam a quitina contendo domínio de Heveína são muito comuns em plantas superiores. Dependendo da estrutura da proteína nativa, estas lectinas que se ligam a quitina são classificadas como Merolectinas, Hololectinas ou Quimerolectinas. Merolectinas consistem de um único domínio de Heveína que foi identificado em diversas espécies (em geral, no látex da seringueira, em frutos de "elderberry" (*Sambucus nigra*) e em sementes de *Pharbitis nil*). Todas essas Heveínas ou proteínas tipo Heveína consistem de uma cadeia polipeptídica única de aproximadamente 40-45 aminoácidos que é rica em glicina e contém oito resíduos de cisteína que formam quatro pontes dissulfeto intracadeia. A maioria das lectinas que se ligam a quitina conhecidas comumente, são Hololectinas compostas de peptídeos contendo 2, 3, 4 ou 7 domínios de Heveína arranjados seqüencialmente. Lectinas compostas de protômeros com duas Heveínas repetidas foram identificadas em *Urtica dioica* (ferrão de urtiga) (PEUMANS *et al*, 1984; BEINTEMA & PEUMANS, 1992) "mistletoe" (*Viscum album*), "greater celandine" (*Chelidonium majus*) (PEUMANS *et al*, 1985) e umbú (*Phytolacca americana* lectina Pa-5/PL-D) (YAMAGUCHI *et al*, 1995; YAMAGUCHI *et al*, 1996; YAMAGUCHI *et al*, 1997). O umbú também contém lectinas com subunidade consistindo de três e sete domínios de Heveína (Pa-4/PL-C e PL-B respectivamente). A aglutinina de gérmen de trigo (WGA) e lectinas relacionadas

1- Waljuno, K., Scholma, R. A., Beintema, J., Mariono, A., & Hahn, A. M. (1975) Int. Rubber Conf., Kuala Lumpur, 2: 518-531. Apud Peumans, W. J., Barre, A., Hao, Q., Rougé, P. & Van Damme, E. J. M. (2000a) Higher plants developed structurally different motifs to recognize foreign glycans. Trends in Glycoscience and Glycotechnology, 12(64): 83-101.



são constituídas de dois protômeros consistindo de quatro domínios de Heveína (RAIKHEL *et al*, 1993). Juntas as Merolectinas e Hololectinas, as lectinas que se ligam a quitina também abrangem as lectinas quiméricas de Solonaceae [em geral, a batata (*Solanum tuberosum*), lectinas de tomate e lectinas de zabumba (*Datura stramonium*)]. Os protômeros destas lectinas consistem de um domínio N-terminal que se liga a quitina de três Heveínas repetidas ligado a um domínio O-glicosilado rico em serina e hidroxiprolina, semelhante à proteína extensina de parede celular. A estrutura tridimensional de diversas lectinas que se ligam em quitina foram obtidas por espectrometria de RMN (Ressonância Magnética Nuclear) (ANDERSEN *et al*, 1993) ou cristalografia de raios X. A Heveína contém estruturas secundárias pequenas, com um trecho de resíduos de aminoácidos localizados na extremidade N-terminal da cadeia polipeptídica formando duas cadeias antiparalelas de folha  $\beta$  seguida por uma  $\alpha$ -hélice. A estrutura tridimensional da região N-terminal é estabilizada por três das quatro pontes dissulfeto intracadeia de Heveína (Cys<sup>3</sup> – Cys<sup>18</sup>; Cys<sup>12</sup> – Cys<sup>24</sup>; Cys<sup>17</sup> – Cys<sup>31</sup>; e Cys<sup>37</sup> – Cys<sup>41</sup>). Três resíduos (Ser<sup>19</sup>, Trp<sup>21</sup> e Trp<sup>23</sup>), envolvidos na ligação de oligossacarídeos contendo GalNAc, estão localizados nas duas cadeias antiparalelas da folha  $\beta$  e o 4º resíduo (Tyr<sup>30</sup>), na primeira  $\alpha$ -hélice. A WGA possui a estrutura mais complexa que a Heveína porque a lectina nativa é um dímero de dois monômeros cada um do qual consistindo de quatro domínios de Heveína estruturalmente semelhantes (A<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>, C<sub>1</sub> e D<sub>1</sub> do monômero I e A<sub>2</sub>, B<sub>2</sub>, C<sub>2</sub> e D<sub>2</sub> do monômero II) (WRIGHT, 1977; WRIGHT, 1987). Separados por uma curta  $\alpha$ -hélice de 5 resíduos, cada domínio de Heveína é destituído de estruturas secundárias regulares e portanto consiste principalmente de estruturas em espiral (“coil”) e curvas (“turns”). Cada um dos oito domínios de Heveína de WGA contém 4 pontes dissulfeto que estabilizam a estrutura funcional global da proteína. Dímeros são formados por uma associação frente e costa de dois monômeros. Todos os oito domínios de Heveína da WGA possuem um sítio de ligação a carboidrato. A atividade e especificidade de ligação a carboidrato das lectinas que se ligam a quitina é determinada exclusivamente por seus domínios de Heveína. Estudos detalhados da especificidade feita com WGA, aglutinina de *Urtica dioica* e lectinas de batata e zabumba confirmaram que os sítios de ligação a carboidrato dessas lectinas que se ligam a quitina têm uma estrutura complexa, que é mais complementar ao trímero ou ao tetramero de GlcNAc. A presença de tais sítios complexos de ligação explica o porquê do potencial inibitório de oligômeros de GlcNAc aumentar com o prolongamento da



cadeia em 4 resíduos, e porque a maioria das lectinas que se ligam a quitina não são inibidas por GlcNAc mas requerem pelo menos o dímero deste açúcar. Também vale ressaltar que os sítios de ligação múltipla de algumas lectinas que se ligam em quitina não são idênticos. A WGA, por exemplo, contém ambos, sítios de alta e baixa afinidade. Também deve ser enfatizado que diversas lectinas que se ligam em quitina reagem muito fortemente com glicanos O-ligados e N-ligados de complexo animal. Por exemplo, a WGA liga-se a vários complexos de glicoconjugados contendo ácido siálico e GlcNAc.

### 3- Lectinas do floema de Cucurbitaceae.

As lectinas do floema de Cucurbitaceae constituem uma pequena família de aglutininas que se ligam a quitina que até agora foram encontradas exclusivamente em exudatos de floema de numerosas espécies de Cucurbitaceae e, apresentam-se como proteínas diméricas compostas de subunidades não glicosiladas de cerca de 25kDa. Todas essas lectinas exibem especificidade para oligômeros de GlcNAc. O potencial inibitório dos oligômeros de GlcNAc aumenta fortemente com o prolongamento da cadeia em 5 resíduos indicando que essas lectinas possuem um sítio de ligação a carboidratos estendido. Além de oligômeros de GlcNAc, as lectinas de Cucurbitaceae também reconhecem as seqüências internas de di-N-acetilquitobiosil de cadeias glicanas N-ligadas (ALLEN, 1979; ANATHARAM *et al*, 1986). Desde que nenhuma estrutura tridimensional foi determinada, nem a estrutura funcional total nem a estrutura exata do sítio de ligação da lectinas de floema de Cucurbitaceae são conhecidas.

### 4- Lectinas relacionadas a Jacalina.

A família de lectinas relacionadas a jacalina compreende todas as lectinas de plantas que são relacionadas estruturalmente e evolutivamente a jacalina, uma lectina galactose específica de jaca (*Artocarpus integrifolia*). Basicamente, a família da jacalina compreende um subgrupo específico por galactose e outro por manose. A subfamília específica por galactose está aparentemente restrita a sementes de espécies de poucos gêneros da família Moraceae, enquanto a subfamília específica por manose está amplamente distribuída em plantas superiores. Todas as lectinas relacionadas a jacalina específicas por galactose caracterizadas até o momento (isto é, jacalina, outra lectina de sementes de *Artocarpus* e a lectina de sementes de *Machura pomifera*) são constituídas



de 4 protômeros idênticos consistindo de uma grande cadeia  $\alpha$  e de uma pequena cadeia  $\beta$  de 133 e 20 resíduos respectivamente. Ambas as cadeias são derivadas de um precursor simples que sofre um processamento complexo pós e co-tradução. Algumas, porém, nem todas as isoformas são glicosiladas (YANG & CZAPLA, 1993).

A estrutura tridimensional da jacalina foi obtida por análise cristalográfica em raios X (SANKARANARAYANAN *et al*, 1996). Cada protômero consiste de um dobramento com três domínios em  $\beta$ -prisma constituído de 3 folhas  $\beta$  com 4 segmentos. Desses 12 segmentos (numerados de 1 a 12), 11 são formados por cadeia  $\alpha$  e um por cadeia  $\beta$ . Quatro protômeros estão associados por interações não covalentes dentro de uma estrutura tetramérica, que provavelmente resulta da associação de dois dímeros. Assim, a cadeia  $\beta$  ocupa uma região central no tetrâmero que desempenha um papel crucial.

A jacalina e seus homólogos galactose-específicos de outras espécies de Moraceae reagem fortemente com resíduos terminais  $\alpha$ -D-galactosil não redutor. Todavia, eles têm uma afinidade muito alta por antígeno T Gal  $\beta(1,3)$ GalNAc (SASTRY *et al*, 1986; SARKAR *et al*, 1981). A estrutura do sítio de ligação foi determinada por cristalografia em raios X de complexos de jacalina com antígeno T. Cada protômero abriga um sítio de ligação a monossacarídeo único constituído dos resíduos de Gly<sub>1</sub>, Tyr<sub>122</sub>, Trp<sub>123</sub> e Asp<sub>125</sub> da cadeia  $\alpha$  que cria uma rede de 9 pontes de hidrogênio com O3, O4, O5 e O6 do metil- $\alpha$ -D-galactose. O fato de que o resíduo Gly<sub>1</sub> da cadeia  $\alpha$  é liberado somente depois do processamento proteolítico da pro-jacalina, subentende-se que a atividade de ligação a açúcar da jacalina requer um correto processamento pós-tradução do precursor.

Lectinas específicas por manose relacionadas a jacalina foram identificadas em muitas espécies de grupos taxonomicamente diferentes. Depois da descoberta do primeiro membro desta sub-família de lectinas relacionadas a jacalina em *Calystegia sepium* (erva daninha: visgo) (VAN DAMME *et al*, 1996a), lectinas semelhantes foram isoladas de alcachofra de Jerusalém (*Helianthus tuberosus*) (VAN DAMME *et al*, 1999), de banana (PEUMANS *et al*, 2000a), de arroz (ZHANG *et al*, 2000) e também de jaca (ROSA *et al*, 1999). Todas as lectinas relacionadas a jacalina que se ligam a manose caracterizadas até aqui possuem duas ou quatro subunidades não glicosiladas de aproximadamente 150 resíduos de aminoácidos. A cristalografia revelou que o



protômero da aglutinina Heltuba de *Helianthus tuberosus* compartilha a topologia em  $\beta$ -prisma e o sítio de ligação a carboidrato da jacalina (apesar do fato dos protômeros não serem clivados). Todavia, os elementos do  $\beta$ -prisma recuperam-se para formar a interface octamérica de Heltuba e a estratégia para formar o sítio de ligação a manose, são evidentemente diferentes daquelas reportados para a jacalina (BOURNE *et al*, 1999).

Mesmo que a descoberta de lectinas relacionadas a jacalina específicas por manose tenha sido recente, somente poucos relatos determinam a sua especificidade. A aglutinina de *Calystegia sepium* reconhece tanto manose como maltose, mas não é inibida por galactose (PEUMANS *et al*, 1997). Do mesmo modo, Heltuba interage com manose, oligomanosídeos e glicanos com elevado teor de manose, mas não interage com galactose. Os melhores inibidores são os dimanosídeos Man  $\alpha$ 1-2Man e Man  $\alpha$ 1-3Man, porém,  $\alpha$ 1-3,  $\alpha$ 1-6 manotriose e  $\alpha$ 1-3,  $\alpha$ 1-6 manopentose não são melhores inibidores que os dimanosídeos, indicando que o sítio de ligação de Heltuba não acomoda mais que duas subunidades de açúcar. A localização do sítio de ligação a manose foi determinada por análise de cristais de Heltuba saturado de di-, tri- e pentamanosídeos. O sítio-chave que se liga a manose ocorre em uma posição semelhante ao de galactose em jacalina. Ele apresenta-se com três curvas expostas localizadas no topo da estrutura em  $\beta$ -prisma. O tripeptídeo Gly<sub>135</sub>-Asp<sub>136</sub>-Val<sub>137</sub> e o resíduo Asp<sub>139</sub> que pertence à curva  $\beta$ 11- $\beta$ 12 de superfície exposta criam uma rede de pontes de hidrogênio com os oxigênios dos grupos hidroxilas O6, O5 e O4 da manose. Além disso, a Gly<sub>18</sub>, que está localizado dentro da volta  $\beta$ 1- $\beta$ 2 forma uma ponte de hidrogênio com o átomo O3 e forma interações de Van der Waals com o O4 equatorial na conformação da manose (BOURNE *et al*, 1999).

#### 5- Lectinas de monocotiledôneas que se ligam a manose.

As lectinas de monocotiledôneas que se ligam a manose são uma superfamília ampla de lectinas com especificidade estrita a manose, acontecimento que é reservado ao subgrupo de plantas monocotiledôneas compreendendo as famílias Alliaceae, Amaryllidaceae, Araceae, Bromeliaceae, Iridaceae, Liliaceae e Orchidaceae.

Embora a descoberta desta família de lectinas seja datada de 1987, somente quando uma lectina com especificidade exclusiva por manose foi isolada de bulbos de snowdrop (*Galanthus nivalis*) (VAN DAMME *et al*, 1987), numerosas lectinas de



monocotiledôneas que se ligam a manose foram isoladas e clonadas. Além disso, a estrutura tridimensional de diversos membros dessa família de lectinas foi resolvida por cristalografia em raios X.

A superfamília de lectinas de monocotiledôneas que se ligam a manose exibe certa heterogeneidade no que diz respeito à estrutura molecular das proteínas nativas. Basicamente se distinguem dois grupos, no primeiro grupo inclui-se lectinas consistindo de um, dois ou quatro protômeros com um domínio de 11 – 14kDa e no segundo grupo, lectinas consistindo de um, dois ou quatro protômeros com dois domínios de cerca de 30kDa. O grupo de lectinas compostas de protômeros de 30kDa é ainda subdividido em um subgrupo com protômeros consistindo de dois domínios idênticos ou muito semelhantes e um subgrupo com protômeros com dois domínios diferentes.

A estrutura tridimensional de diversas lectinas de monocotiledôneas específicas por manose foi obtida por análise de difração de raios X começando com a aglutinina de *Galanthus nivalis* (GNA) (HESTER *et al*, 1995). GNA é um homotetrâmero composto de quatro protômeros de 109 resíduos de aminoácidos ligados não covalentemente. O protômero de GNA consiste de três subdomínios dispostos em seqüência (I, II, e III) cada um dos quais forma uma folha  $\beta$  de quatro cordões. Todavia a conclusão do feixe de quatro segmentos formando o subdomínio I envolve uma folha  $\beta$  localizada na extremidade C-terminal estendida da cadeia polipeptídica. Os três subdomínios seqüenciais são conectados por curvas e forma uma estrutura tipo  $\beta$ -barril ( $\beta$ -barrel) de 12 segmentos que contém três sítios de ligação a manose localizados na fenda formada por três feixes de segmentos  $\beta$ . Uma única ponte dissulfeto é formada entre Cys<sup>29</sup> e Cys<sup>52</sup>. Quatro monômeros (A, B, C e D) estão associados através de interações não covalentes dentro do homotetrâmero de GNA, que se assemelha a um cume achatado com um canal hidrofílico largo de 16Å. Desta forma, os monômeros associam-se de forma par (isto é, A com D e B com C) dentro dos dímeros compactados através de contatos por pontes de hidrogênio estabilizadas por mudanças no C-terminal da cadeia. Além dessas associações, os pares AD e BC estabilizam-se principalmente por interações hidrofóbicas. A GNA nativa possui todos os doze sítios de ligação a manose funcionais juntos (três por monômero).

Todas as lectinas de monocotiledôneas que se ligam a manose (exceção para a superlectina TxLC-I de tulipa (*Tulipa gesneriana*) e a lectina de dois domínios de *Scilla campanulata*) são inibidas por manose, todavia, as concentrações requeridas de manose



para uma inibição eficiente são altas ( $IC_{50} = 20-200$  mM). Oligomanosídeos são inibidores mais potentes que a manose, indicando que os sítios de ligação a carboidratos alojam preferencialmente oligomanosil. Lectinas de monocotiledôneas que se ligam a manose diferenciam-se entre si na especificidade fina. Por exemplo, foi mostrado que GNA tem uma grande especificidade por  $Man\alpha(1,3)Man$  terminal (SHIBUYA *et al*, 1998), enquanto que a aglutinina de “daffodil” (*Narcissus pseudonarcissus*) e da orquídea *Listera ovata* ligam-se preferencialmente a  $Man\alpha(1,6)Man$  (KAKU *et al*, 1990) e  $Man\alpha(1,3)Man\alpha(1,3)Man$  (SAITO *et al*, 1993), respectivamente. A superlectina TxLC-I não é inibida por manose sozinha e sim por uma combinação de manose e GalNAc. Este comportamento incomum é devido a presença de um domínio de ligação a manose e um domínio de ligação a GalNAc nos protômeros de TxLC-I (VAN DAMME *et al*, 1996b).

A base estrutural para o reconhecimento de açúcares simples e complexos tem sido determinada para a GNA. Todos os três sítios de ligação a manose são constituídos de resíduos de aminoácidos idênticos, isto é, Gln, Asp, Asn e Tyr (Gln<sup>89</sup>, Asp<sup>91</sup>, Asn<sup>93</sup> e Tyr<sup>97</sup> para o subdomínio I; Gln<sup>57</sup>, Asp<sup>59</sup>, Asn<sup>61</sup> e Tyr<sup>65</sup> para o subdomínio II e Gln<sup>26</sup>, Asp<sup>28</sup>, Asn<sup>30</sup> e Tyr<sup>34</sup> para o subdomínio III). Os resíduos (Asp, Asn) ligam-se ao O2, (Gln) ao O3 e (Tyr) ao O4 da manose através de uma rede de quatro pontes de hidrogênio. Além disso, um resíduo hidrofóbico (Val<sup>95</sup>, Val<sup>63</sup> e Val<sup>32</sup> dos subdomínios I, II e III, respectivamente) interage com o C3 e C4 da manose através de interações hidrofóbicas. A especificidade de GNA para D-manose pode ser explicada pela interação de resíduos Asp e Asn com o O2, que tem uma posição axial na manose.

A GNA e as lectinas de monocotiledôneas relacionadas são suspeitas de possuírem um sítio de ligação a carboidrato estendido, por estas lectinas reconhecerem N-glicanos de glicoproteínas animais e humanas e por inibirem fortemente *in vitro* a replicação de retrovírus (BALZARINI *et al*, 1992). A análise da GNA complexada com di-, tri- e pentamanosídeos revelou dois tipos de interações com oligomanosídeos mais complexos. Um primeiro sítio envolve o sítio de ligação a manose de dois subdomínios III adjacentes e as regiões vizinhas pertencentes aos dois dímeros diferentes (A e B ou C e D). Estes sítios permitem a interação da GNA com as duas unidades de manose de  $\alpha(1,3)$  ligados a oligomanosídeos. O segundo sítio é formado pela interface entre dois tetrâmeros de GNA. Ele compreende o sítio de ligação a manose do subdomínio III do monômero (B) do primeiro tetrâmero de GNA e o sítio de ligação a manose II do



monômero (A) de outro tetrâmero de GNA. Desde que o segundo tipo prolongado depende do empacotamento cristalográfico dos tetrâmeros de GNA nos cristais, ele provavelmente seja não funcional em solução (WRIGHT & HESTER, 1996).

#### 6- Lectinas relacionadas a estrutura das RIPs tipo 2.

As RIP tipo 2 constituem uma típica família de Quimerolectinas constituída de protômeros consistindo de um domínio na extremidade N-terminal da cadeia A com atividade N-glicosidase e um domínio na extremidade C-terminal da cadeia B com atividade lectínica (BARBIERI, *et al*, 1993). Visto que a cadeia A da RIP tipo 2 compartilha homologia de seqüência com a RIP tipo 1, as RIP tipo 2 são comumente consideradas como proteínas quiméricas compostas de uma subunidade de RIP 1 e uma subunidade de lectina. O termo “proteína que inativa ribossomos” refere-se à capacidade das RIP (ambas, tipo 1 e tipo 2) de inativarem cataliticamente ribossomos através da remoção enzimática de um resíduo de adenina específico de uma volta (loop) altamente conservada (A4324 do rRNA de rato) na grande subunidade do RNA ribossomal 28S.

A RIP tipo 2 foi identificada em espécies de uma dúzia de famílias de plantas. Exemplos clássicos são as toxinas ricina, abrina e modicina, as lectinas de “mistletoe” (*Viscum album*) e as diferentes aglutininas de “elderberry” (*Sambucus nigra*). Todas as RIP tipo 2 são compostas de protômeros semelhantes consistindo de uma ligação por ponte dissulfeto nas cadeias A e B (camadas par [A-s-s-B]). As RIP tipo 2 nativas são mono-, di- ou tetrâmeros consistindo de um, dois e quatro pares glicosilados [A-s-s-B], respectivamente.

A análise cristalográfica da ricina, abrina e lectina de “mistletoe” fornece informação detalhada sobre a estrutura tridimensional das RIP tipo 2. Devido cadeia A não possuir envolvimento na atividade de ligação a carboidrato da RIP tipo 2, sua estrutura não será discutida aqui com detalhe. Todavia, pode-se mencionar que a cadeia A consiste de três domínios distintos e contém estruturas secundárias regulares prolongadas (isto é, oito  $\alpha$  hélice e seis segmentos de folha  $\beta$ ). A cadeia B consiste da repetição de dois domínios semelhantes em série (chamados domínio 1 e domínio 2). Ambos os domínios são constituídos por quatro sub-domínios designados por  $\lambda 1$ ,  $\alpha 1$   $\beta 1$  e  $\gamma 1$  para o domínio 1, e  $\lambda 2$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 2$  e  $\gamma 2$  para o domínio 2. Curiosamente, os subdomínios  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  são homólogos. A cadeia B não contém estruturas secundárias



regulares prolongadas, mas consiste quase que exclusivamente de estruturas em espiral (coil) ligadas por voltas e curvas, e é estabilizada por quatro pontes dissulfeto intracadeia. Ambos os domínios 1 e 2 têm um enovelamento característico da família de folha  $\beta$  tripla (MURZIN *et al*, 1992). Cada domínio possui um sítio de ligação a carboidrato localizado no sub-domínio N-terminal  $\alpha$ 1 e no subdomínio C-terminal  $\gamma$ 2, respectivamente.

A atividade e especificidade de ligação a carboidrato das RIPs tipo 2 são estabelecidas somente por sítios de ligação a carboidrato da cadeia B. Estudos de especificidade indicaram que a maioria das RIPs tipo 2 são efetivamente inibidas por Gal, GalNAc ou por ambos. Todavia, os inibidores mais potentes que quaisquer outros monossacarídeos são os oligossacarídeos ou dissacarídeos. A lectina de sementes de *Abrus pulchellus* possui especificidade por galactose mas apresenta uma maior afinidade para seqüências de lactose [ $\beta$ -D-Gal-(1,4)-D-Glc], N-acetilactosamina [ $\beta$ -D-Gal-(1,4)-D-GlcNAc] e lacto-N-biose [ $\beta$ -D-Gal-(1,3)-D-GlcNAc] (RAMOS, *et al* 2001), e *Abrus precatorius* uma maior afinidade pelos dissacarídeos Gal $\beta$ (1,3)GalNAc e/ou por Gal $\beta$ (1,3/4)GlcNAc (WU, *et al* 1992). Uma das RIP tipo 2 de ederberry nem é específica por Gal nem por GalNAc, mas liga-se exclusivamente a glicanos contendo NeuAc $\alpha$ (2,6)Gal/GalNAc. As RIP tipo 2 derivadas de hololectinas e merolectinas exibem a mesma especificidade que as suas aparentadas RIP tipo 2. Deve-se enfatizar que os resultados de estudos da especificidade de RIP tipo 2 e lectinas relacionadas são menos esclarecedores que aqueles estudos sobre outras lectinas de plantas por causa da ocorrência simultânea de dois (ou possivelmente três) sítios de ligação a carboidrato com uma especificidade e/ou afinidade (ligeiramente) diferentes. A estrutura dos sítios de ligação foi determinada em detalhe para a cadeia B da ricina, que possui 2 sítios de ligação a carboidrato localizados no subdomínio N-terminal  $\alpha$ 1, e no subdomínio C-terminal  $\gamma$ 2. Ambos os sítios abrangem 5 resíduos de aminoácidos críticos (Asp<sup>22</sup>, Gln<sup>35</sup>, Trp<sup>37</sup>, Asn<sup>46</sup> e Gln<sup>47</sup> para o sítio 1, e Asp<sup>234</sup>, Ile<sup>246</sup>, Tyr<sup>248</sup>, Asn<sup>255</sup> e Gln<sup>256</sup> para o sítio2). Ambos os sítios ligam o resíduo de Gal da lactose por 4 pontes de hidrogênio (domínio 1) ou por 3 pontes de hidrogênio (domínio 2). Todavia, o sítio do domínio 1 comporta-se como um sítio de baixa afinidade pela lactose enquanto o sítio do domínio 2 age como um sítio de alta afinidade pela lactose (HATAKEYAMA *et al*, 1986). Contatos hidrofóbicos entre o anel de piranose da Gal e os resíduos aromáticos (Trp<sup>37</sup> e Tyr<sup>248</sup>) ou hidrofóbico (Ile<sup>246</sup>) dos sítios de ligação a carboidrato completam a ligação da lactose. A



ligação exclusiva de GalNAc ao sítio 2 depende de uma rotação (cerca de 15°) deste açúcar dentro do sítio. Devido esta rotação não há nenhuma oposição estérica do resíduo de Asp<sup>250</sup> localizada nas proximidades do sítio de ligação (RUTENBER & ROBERTUS, 1991). No sítio 1, há um obstáculo estérico entre o grupo N-acetil de GalNAc e Asp<sup>44</sup> do sítio 1 (homólogos para Asp<sup>250</sup> do sítio 2). Como resultado, GalNAc não pode girar, e conseqüentemente o sítio 1 não aloja este açúcar.

Depois que se constatou que a ricina e outra RIP tipo 2 interagiam fortemente com oligossacarídeos carregados por galactosídeos terminais, a ocorrência de sítios estendidos de ligação a carboidratos tornou-se bastante provável de ocorrer em outras lectinas, mas, infelizmente, a ocorrência deste sítio estendido de ligação a carboidrato ainda não foi confirmada a nível molecular.

#### 7- Lectinas de leguminosas com estrutura tipo ConA.

Lectinas de leguminosas com estrutura tipo a ConA são uma ampla família de proteínas intimamente relacionadas que ocorrem exclusivamente em espécies da família de plantas Leguminosae (Fabaceae). Aproximadamente uma centena de lectinas de leguminosas individuais foi caracterizada em cerca de 70 espécies diferentes pertencentes a vários grupos taxonômicos desta família.

As lectinas de leguminosas assemelham-se em suas propriedades bioquímicas e estruturais embora se diferenciem em suas especificidades a carboidratos. Elas consistem de 2 ou 4 protômeros com massa molecular aparente de cerca de 30 kDa e cada protômero contém aproximadamente 250 resíduos de aminoácidos. Em alguns casos, os protômeros são divididos em duas cadeias polipeptídicas pequenas. Lectinas de leguminosas são compostas de um protômero não dividido e dividido e são denominadas comumente de lectinas de leguminosas de uma cadeia e duas cadeias, respectivamente. Lectinas de leguminosas freqüentemente são metaloproteínas e, nestes casos, cada subunidade contém um íon de Mn<sup>2+</sup> e um de Ca<sup>2+</sup>, que são essenciais para a atividade de ligação a carboidrato da lectina como a lectina de *Dioclea guianensis* contém íons cálcio e manganês ligados próximos do sítio de ligação a carboidratos (WAH *et al*, 2001). Algumas lectinas de leguminosas são N-glicosiladas (SHARON & LIS, 1990). A análise da estrutura primária e de estudos em difração de raios X demonstra as similaridades na conformação tridimensional destas lectinas. Sua estrutura é compreendida de uma seqüência de 7 segmentos de estrutura secundária antiparalela  $\beta$



na frente e outro de 6 segmentos  $\beta$  atrás, que são interconectadas por curvas (“turns”) e voltas (“loops”) e formam uma estrutura achatada em forma de cúpula. A orientação das cadeias antiparalelas nas folhas  $\beta$  muda de uma face para a outra resultando em uma estrutura forte e rígida. O sítio de ligação a monossacarídeo do monômero da lectina (isto é, o sítio responsável pela ligação de monossacarídeos) é formado por 4 alças localizadas na parte superior da cúpula. Uma ligação peptídica *cis* envolvendo resíduos de alanina e ácido aspártico (Ala<sup>80</sup> e Asp<sup>81</sup> em LOLI) orienta a cadeia lateral deste resíduo de aminoácido de tal forma que ele pode interagir com um íon de Ca<sup>2+</sup>. Outro cátion divalente, Mn<sup>2+</sup>, é também ligado a proteína. Ambos os cátions divalentes são requeridos para a conformação funcional do sítio de ligação a monossacarídeos (BOURNE *et al*, 1990). A maioria das lectinas de leguminosas são constituídas de dois protômeros, que interagem um com o outro em um plano de simetria de estrutura dupla. Esta dimerização cria uma estrutura  $\beta$  tipo sanduíche com 12 segmentos, na qual os 2 monômeros frontais associam-se por seus planos inferiores (fundo). Como resultado, as voltas (loops) constituindo os sítios de ligação a monossacarídeos estão localizadas em ambas extremidades do dímero. Outras lectinas de leguminosas formam (por associação não covalente de 2 dímeros) estruturas tetraméricas com 4 sítios de ligação a monossacarídeos.

Embora todas as lectinas de leguminosas tenham uma estrutura tridimensional semelhante, esta família de lectinas abrange proteínas com um variado e amplo grau de especificidades. Além das lectinas que se ligam a manose e das lectinas específicas por manose/maltose, todas os outros grupos, que são distinguidos pela preferência de monossacarídeos que se ligam, são representados na família de lectinas de leguminosas. É também impressionante que lectinas de plantas que se ligam a manose/glicose e as específicas por fucose não foram ainda encontradas fora das lectinas de leguminosas e que a maioria das lectinas com especificidade complexa são lectinas de leguminosas típicas. O grau de especificidade ampla é contraditório às altas similaridades de seqüência e as estruturas conservadas de monômeros nas lectinas de leguminosas. Todavia, esta discrepância aparente pode ser explicada por substituições de poucos aminoácidos envolvidos na atividade de ligação a açúcar e por variações no comprimento de uma determinada volta (loop), que podem causar variações profundas no sítio de ligação sem afetar a estrutura tridimensional do protômero (SHARMA & SUROLIA, 1997).



Estudos de especificidade e de análise estrutural demonstraram que lectinas de leguminosas podem interagir tanto com açúcares simples como complexos. A interação da lectina com açúcares simples se realiza no conhecido sítio de ligação a monossacarídeos localizado na superfície do monômero. Por exemplo, o sítio de ligação a manose/glicose da isolectina I (LoLI) de *Lathyrus ochrus* é formado por poucos resíduos de aminoácidos pertencentes a 4 voltas (loops) localizadas na parte superior do monômero (cúpula). Os resíduos Asp<sup>81</sup>, Gly<sup>99</sup>, Asn<sup>125</sup>, Gly<sup>208</sup>, Ala<sup>209</sup> e Glu<sup>210</sup> criam uma rede de sete pontes de hidrogênio com O3, O4, O5 e O6 do açúcar simples. Além disso, o resíduo aromático Phe<sup>123</sup> cria uma interação hidrofóbica com o anel de piranose do açúcar. Por outro lado, a interação de lectinas de leguminosas com muitos glicanos complexos (como cadeias laterais de oligossacarídeos pertencentes a glicoproteínas) ocorrem no sítio estendido de ligação a carboidrato que determina sua especificidade fina de ligação a carboidratos, (BOURNE *et al*, 1994). Este sítio estendido encerra, junto a um sítio de ligação a monossacarídeo central, um número de resíduos adjacentes na superfície da lectina que interagem com as unidades de açúcar do glicano complexo. Tanto as pontes de hidrogênio (mediadas por moléculas de água presentes e arranjadas na superfície da lectina), como as interações hidrofóbicas envolvendo resíduos aromáticos expostos na superfície da molécula desempenham um papel chave na ligação de oligossacarídeos com o sítio de ligação estendido (PEUMANS, *et al*, 2000b).

Lectinas de plantas são por definição proteínas que se ligam especifica e reversivelmente a carboidratos. A descrição de famílias de lectinas indica que há uma heterogeneidade marcante dentro do grupo geral de lectinas de plantas no que diz respeito a sua especificidade (TABELA 01). Um exame de especificidade de grupos distintos, tendo como base a preferência por açúcares simples, ainda demonstra que lectinas de plantas abrangem um amplo espectro de especificidades incluindo manose/glicose, manose, manose/maltose, Gal/GalNAc, GlcNAc/(Glc/Nac)<sub>n</sub>, fucose e ácido siálico. Além disso, muitas lectinas não se ligam a açúcares simples, mas reagem exclusivamente com glicanos complexos, e conseqüentemente são consideradas lectinas com especificidade complexa.

**TABELA 01.** Revisão da estrutura e especificidade de lectinas de plantas pertencentes às diferentes famílias de lectinas.

Família de Lectinas	Estrutura	Especificidade
Amarantinas	$\beta$ -tripla	GalNAc/antígeno T
Lectinas compostas de domínios que se ligam a quitina semelhantes ao da Heveína	Domínio de Heveína	(GlcNAc) <sub>n</sub>
Lectinas de floema de Cucurbitaceae	Não conhecida	(GlcNAc) <sub>n</sub>
Lectinas relacionadas a jacalina		
Sub-grupo Galactose-específico	$\beta$ -prisma	Gal/antígeno T
Sub-grupo Manose-específico	$\beta$ -prisma	Man
Lectinas de monocotiledôneas que se ligam a manose	$\beta$ -sanduiche	Man
Lectinas relacionadas a estrutura das RIPs tipo II	$\beta$ - barril ( $\beta$ -barrel)	Gal/GalNAc Sia $\alpha$ 2,3Gal/GalNAc
Lectinas de leguminosas com estrutura tipo ConA	$\beta$ -tripla	Man/Glc Gal/GalNAc (GlcNAc) <sub>n</sub> Fuc Sia $\alpha$ 2,3Gal/GalNAc Complex

PEUMANS *et al*, 2000b.

A classificação de lectinas baseada na sua ligação preferencial por monossacarídeos é útil para distinguir grupos com especificidade bruta, mas que fornece em muitos casos uma idéia enganosa sobre a especificidade real. Deve-se enfatizar que, embora, muitas lectinas sejam inibidas por monossacarídeos ou dissacarídeos, muitas vezes as concentrações requeridas para inibição são altas, especialmente quando comparadas a concentrações inibitórias de oligossacarídeos ou glicanos complexos. Por exemplo, muitas lectinas que se ligam a quitina contendo domínio de Heveína não são inibidas por GlcNAc, mas requerem pelo menos o dímero para a inibição e são ainda mais sensíveis ao trímero ou ao tetrâmero. A família de lectinas de leguminosas com estrutura semelhante à ConA também abrange numerosas lectinas que são insensíveis a



qualquer monossacarídeo ou dissacarídeo, mas são eficientemente inibidas por baixíssimas concentrações de complexos N- ou O-glicanos (PEUMANS *et al*, 2000b).

A análise estrutural fornece evidências conclusivas de que ambos os dobramentos e a estrutura tridimensional dos sítios de ligação a carboidratos são altamente conservados dentro de cada família de lectinas. Este alto grau de conservação estrutural é, na maioria das famílias, refletido por uma correspondência de alta conservação da especificidade por açúcares. Por exemplo, todas as lectinas que se ligam a quitina e que contêm o domínio de Heveína reconhecem oligômeros de GlcNAc. Isto também pode ser afirmado com relação a todas as lectinas de floema de Cucurbitaceae. Igualmente, todas as lectinas de monocotiledôneas que se ligam a manose, têm uma especificidade exclusiva e semelhante para manose. Além disto, todas as RIP do tipo 2 reconhecem Gal/GalNAc, exceto as lectinas do gênero *Sambucus* que exibem uma especificidade por Neu5Ac $\alpha$ (2,6)-Gal/GalNAc. Dentro da família de lectinas relacionadas a jacalina, duas subfamílias distintas com especificidade para galactose e manose, respectivamente, são encontradas. Ainda não se entende bem porque estruturas repetitivas (motifs) semelhantes reconhecem dois açúcares estruturalmente diferentes. Muito provavelmente, hajam poucas diferenças na estrutura dos sítios de ligação dependendo do fato de os protômeros serem clivados ou não (PEUMANS *et al*, 2000b).

Estudos estruturais também revelaram que cada família de lectinas exhibe definitivamente um dobramento comum e possuem suas próprias estruturas repetitivas ou motivos (motifs) de ligação a carboidrato. Levando em consideração uma única estrutura tridimensional de cada família de lectina, não se deve esperar que *a priori* membros de diferentes famílias reconheçam o mesmo açúcar. É surpreendente por isso, que alguns monossacarídeos, bem como oligossacarídeos sejam reconhecidos por membros de diferentes famílias de lectinas. Por exemplo, lectinas que se ligam a (GlcNAc)<sub>n</sub> ocorrem dentro da família de lectinas que se ligam a quitina compostas de domínio de Heveína, nas lectinas de floema de *Cucurbitaceae* e nas lectinas de leguminosas. Lectinas que se ligam a manose são encontradas dentro da família de lectinas de monocotiledôneas que se ligam a manose, das lectinas relacionadas a jacalina e das lectinas de leguminosas. Lectinas específicas por galactose e N-acetilgalactosamina ocorrem nas Amarantinas (WRIGHT, 1997), em lectinas de leguminosas e em RIP tipo 2. Igualmente, lectinas específicas por dissacarídeos de antígenos T foram identificadas na família de lectinas de leguminosas, nas relacionadas



a jacalina, nas relacionadas as RIP tipo 2 e nas Amarantinas. Baseando-se nesses exemplos pode-se concluir que plantas desenvolveram estruturas repetitivas ou motivos (motifs) diferentes para reconhecerem os mesmos açúcares ou glicanos. Via de regra sugere-se que o reconhecimento e a ligação desses carboidratos seja de extrema importância para as plantas (PEUMANS *et al*, 2000b).

## 1.2. Glicanos Alvo de Lectinas de Plantas

Uma das questões chave sobre o papel fisiológico de lectinas de plantas diz respeito aos seus glicanos alvos naturais dentro do vegetal. Em sementes quiescentes de Leguminosae, as lectinas ocorrem junto com proteínas de estocagem em corpos protéicos. Na busca por parceiros endógenos de ligação de lectinas, as lectinas de sementes de lentilha (*Lens culinaris* L.) e ervilha (*Pisum sativum* L.) interagem com subpopulações ou proteínas de estocagem de mesma origem. Propondo que lectinas de ervilha, lentilha e possivelmente outras lectinas de sementes devam auxiliar no depósito de proteínas de estocagem durante o desenvolvimento da semente (WENZEL & RÜDIGER, 1995; SCHECHER & RÜDIGER, 1994; RÜDIGER & SCHECHER, 1993), indicando que receptores endógenos são importantes para interações específicas *in vivo* entre uma lectina de planta e o glicano da própria planta onde a mesma se encontra. Além disso, uma revisão da especificidade de lectinas de plantas também indicou que a maioria não é relacionada com carboidratos típicos de planta, mas de preferência com glicanos que estão ausentes em plantas. Por exemplo, lectinas específicas por ácido siálico são completamente direcionadas a um açúcar que não é encontrado em plantas, mas é um componente freqüente de glicanos animais, ligados por glicosilações do tipo N ou O. Lectinas que se ligam à quitina também reconhecem um polissacarídeo que não ocorre tal qual em plantas mas é o maior componente da parede celular fúngica e do exoesqueleto de insetos. Além disso, numerosas lectinas específicas por Gal/GalNAc e a princípio todas as lectinas com especificidade para glicanos complexos de animais não têm receptores endógenos para glicanos próprios.

Uma vez que pelo menos sete estruturas repetitivas foram conservadas durante a evolução, o reconhecimento de glicanos incomuns deve ser de grande importância para as plantas. Um exame restrito de carboidratos alvo de diferentes lectinas de plantas promove indicativo de que as plantas desenvolverem estruturas repetitivas múltiplas



para reconhecerem alguns glicanos particulares. É impressionante, de fato, que manose e quitina são reconhecidos por três diferentes estruturas repetitivas de ligação, e o dissacarídeo do antígeno T por quatro estruturas repetitivas. Embora ainda especulativas, essas observações sugerem que o reconhecimento e a ligação de manose, quitina e antígeno T são em geral, por algum motivo, muito importantes para as plantas (PEUMANS *et al*, 2000b).

A preferência óbvia e até mesmo a especificidade exclusiva para glicanos levanta questões sobre o papel fisiológico de lectinas de plantas. De acordo com novos conceitos diretos, o desenvolvimento de estruturas repetitivas múltiplas para reconhecer glicanos estranhos deve ser interpretado em termos de defesa de plantas especialmente contra invertebrados fitófagos e animais herbívoros. Assim, a idéia básica é que plantas acumulam grande quantidade de lectinas, que depois de ingeridas interagem com glicanos receptores expostos ao longo do trato intestinal de herbívoros ou invertebrados fitófagos, provocando toxicidade suficiente ou desconforto para repelir os organismos desafiadores. O conceito de lectinas como proteínas de defesa de plantas não é somente especulativo, mas é suportado por evidências experimentais. Algumas lectinas (exemplo geral, lectinas de leguminosas de *Phaseolus vulgaris* e *Robinia pseudoacacia*, bem como as RIP tipo 2) provocam desconforto severo em animais experimentais sobre administração oral <sup>2</sup>. Igualmente, diversas lectinas (exemplo geral, WGA, GNA e algumas lectinas de monocotiledôneas) interferem no crescimento e desenvolvimento de insetos quando adicionados artificialmente a dietas (RAHBÉ *et al*, 1995). Desde que a expressão dessas lectinas em plantas transgênicas também resultou no aumento da proteção contra insetos, a função de defesa das lectinas tem se tornado óbvio.

Os estudos de mecanismos para reconhecimento de açúcar têm ajudado a elucidar independentemente a estrutura de diversas proteínas. A base estrutural e termodinâmica do reconhecimento seletivo a açúcares tem sido calculada por análise cristalográfica em raios X de uma grande variedade de lectinas e seus complexos com carboidratos (BOUCKAERT *et al*, 1999) e por titulação calorimétrica isotérmica (DAM *et al*, 1998; DAM *et al*, 2000). Embora uma variedade de estruturas de novas lectinas tenha sido elucidada, tais como as de plantas monocotiledôneas (lectinas de bulbo de Amaryllidaceae, Liliaceae, Alliaceae, e Orchidaceae específicas por manose) e dicotiledôneas (lectinas de espécies de Moraceae e Amaranthus específicas por GalNAc e as lectinas de Convolvulaceae específicas por manose/maltose) (CHANDRA *et al*,

2- Pusztai, A., & Bardocz, S. (1996) Trends Glycosci. Glycotechnol. 8: 149-165. Apud Peumans, W. J., Barre, A., Hao, Q., Rougé, P. & Van Damme, E. J. M. (2000a) Higher plants developed structurally different motifs to recognize foreign glycans. Trends in Glycoscience and



1999), a família de lectinas mais ampla e melhor caracterizada é a de sementes de plantas de leguminosas. A maioria dos estudos de lectinas de Leguminosae envolvendo membros da tribo Phaseoleae da subfamília Papilionoideae e investigações de lectinas de outras duas subfamílias Caesalpinioideae e Mimosoideae são escassos.

A família Leguminosae (ou Fabaceae) compreende 650 gêneros e 18000 espécies. É a maior família florífera depois das Compositae e Orchidaceae (POLHILL *et al.*, 1981). Caracteriza-se por ser uma família extremamente abrangente, podendo ser encontradas desde árvores gigantes de florestas até exemplares efêmeros, com grande diversidade na maneira de atingir o crescimento e nos modos de reprodução e defesa. Ainda mais, a família encontra-se distribuída em todo o habitat terrestre, desde o Equador até os confins dos desertos secos e gelados. Possui a maior parte da sua diversidade centralizada em áreas de topografia variada com variações climáticas sazonais. Cerca de um terço das espécies encontra-se contido em seis gêneros, (Acacia, Astragalus, Cassia, Crotalaria, Indigofera e Mimosa), todos característicos de locais abertos e sujeitos a distúrbios geológicos. A versatilidade das leguminosas mostra grande importância econômica que parece aumentar à medida que as necessidades humanas fazem uso efetivo de suas propriedades. Um exemplo disso é a grande versatilidade de utilização de leguminosas, podendo ser usadas na fixação do N<sub>2</sub>, conservação de solos, provimento de madeira, combustível, pesticida e também como fonte de carboidratos, proteínas e lipídios (POLHILL *et al.*, 1981).

A classificação da família Leguminosae passou por várias alterações segundo as idéias ou conceitos de vários autores, sendo que a sugestão final coloca as subfamílias Mimosoideae, Caesalpinioideae e Papilionoideae como famílias Mimosaceae, Caesalpinaceae e Papilionaceae. Segundo BRENAN (1967), o reconhecimento de uma ou três famílias dentro das leguminosas permanece como um problema de opinião. Entretanto, nas descrições, a seguir, estas taxa permanecem sendo considerados como subfamílias (FERNANDES, 1991).

A subfamília Mimosoideae contém aproximadamente 50 - 60 gêneros, distribuídos em regiões tropicais, subtropicais e temperadas-quentes, com alguns gêneros encontrados em regiões temperadas. Esta subfamília é subdividida em tribos de acordo com a opinião de diversos autores como mostrado na TABELA 01 (POLHILL *et al.*, 1981). Dentro destas tribos, os gêneros Acacia (1200 spp.), Mimosa (400 - 500



spp.) e *Inga* (350 – 400 spp.) (ELIAS, 1974), ocupam posição de destaque em número de espécies, e todas parecem ter origem na América do Sul (BURKART, 1979).

TABELA 02 – Tribos da sub-família Mimosoideae.

BENTHAN (1875)	TAUBERT (1891)	SCHULZE-MENZ (1964)	HUTCHINSON (1964)
Parkieae	Ingeae	Ingeae	Mimozigantheae
Piptadenieae	Acacieae	Acacieae	Parkieae
Adenanthereae	Eumimoseae	Mimoseae	Acacieae
Eumimoseae	Adenanthereae	Adenanthereae	Adenanthereae
Acacieae	Piptadenieae	(incluindo Piptadenieae)	(incluindo Piptadenieae)
Ingeae	Parkieae	Mimozigantheae Parkieae	Ingeae

POLHILL *et al.*, 1981

Na subfamília Mimosoideae somente as lectinas de sementes de *Parkia speciosa* (SUVACHITTANONT & PEUTPAIBOON, 1992), *Parkia javanica* (UTARABHAND & AKKAYANONT, 1995), *Parkia platycephala* (CAVADA *et al.*, 1997; RAMOS *et al.*, 1999) e *Parkia discolor* (CAVADA *et al.*, 2000) foram isoladas e caracterizadas bioquimicamente. Marcadamente, nenhum dado estrutural de nenhuma lectina de Mimosoideae tem sido determinado e desta forma a classificação estrutural dessas lectinas permanece obscura. Faz-se necessário, para tanto, que novas lectinas desta subfamília sejam purificadas e, além disto, que se realize estudos estruturais, tanto de seqüência, como de cristalografia, para se conseguir efetivamente a caracterização estrutural de um número expressivo e representativo de lectinas deste grupo de leguminosas.

### 1.3. Especificidade da Lectina de *Parkia platycephala* Benth por Carboidratos.

A lectina de sementes de *Parkia platycephala* é glicose/manose específica, com maior especificidade por manose e outros monossacarídeos derivados da manose por

substituição na hidroxila do carbono 1 do anel piranosídico também são inibidores, tais como  $\alpha$ -metil manosídeo ou *p*-nitrofenil-manosídeo. Sua especificidade de interação por glicoconjugados presentes em estruturas glicoprotéicas é mais complexa, e a lectina apresenta a capacidade de reconhecer estruturas glicanas dos tipos oligomanosídica e *N*-acetillactosamina. Entretanto estas reações não são generalizadas. Para a família dos oligomanosídeos, PPL reconhece e se complexa exclusivamente com a estrutura Man5 e somente quando esta encontra-se ligada pelo menos a um resíduo de asparagina da proteína. Estes resultados demonstram claramente que a PPL é incapaz de reconhecer uma estrutura oligomanosídica contendo resíduos de manose ligados em  $\alpha$ -1,2. Devido ao fato da lectina reconhecer Man5-Asn e não reconhecer Man6-Asn, sugere-se que estes dois glicopeptídicos sejam consideravelmente diferentes no plano tridimensional, embora sejam quase idênticos no plano linear. A interação da PPL se dá também com diferentes glicoproteínas tais como avidina, fetuína e mucina de porco imobilizadas em gel. Estas proteínas exibem em suas estruturas glicanos dos tipos *N*-acetillactosamina e complexos. A PPL interagiu com fetuína (possui glicanos do tipo *N*-acetillactosamina de alta heterogeneidade e de três antenas) e asialofetuína imobilizadas em sensor chips. Devido ao fato do monossacarídeo manose ocorrer apenas no núcleo trimanosídeo comum a todas as *N*-glicosilações, a PPL deve interagir com um dos resíduos de manose ligados em  $\alpha$ -1,3 ou  $\alpha$ -1,6 do núcleo trimanosídeo, no interior da molécula glicídica. Como a PPL reconhece com menor intensidade as glicoproteínas PHA-E, ARC-1 e tiroglobulina e é quase inativa para lactotransferrina humana, sorotransferrina humana e orosomucoide, sugere-se que a interação da lectina com estruturas complexas depende primariamente da presença de um resíduo de manose interno de natureza estrutural comum aos *N*-glicanos. Foram encontradas interações mais expressivas da lectina com as glicoproteínas ribonuclease b (possui exclusivamente oligomanosídeos) e lactotransferrina bovina (possui oligomanosídeos e *N*-acetillactosaminas), pois reconhece melhor resíduos internos em oligomanosídeos, o que contraria o efeito da lectina não reconhecer estas estruturas se houver ligação de manose com  $\alpha$ -1,2. De acordo com os estudos de afinidade dos glicopeptídeos e oligossacarídeos com a PPL, esta parece reconhecer o resíduo de manose ligado em  $\alpha$ -1,6 sobre o núcleo trimanosídeo, e diferenças estruturais mínimas, tais como a forma oligomanosídica livre ou a adição de um único resíduo de manose sobre Man5-Asn impede o reconhecimento. Assim, torna-se evidente que embora Man5-Asn seja reconhecido, o núcleo



trimanosídico pode reverter este complexo tão bem quanto uma estrutura pentamansídica. A especificidade de ligação da PPL estudada com glicanos purificados demonstra que PPL reconhece oligomansídeos de forma completamente distinta de outras lectinas como a ConA.

Ao ser injetada por via intravenosa, a PPL foi capaz de interferir no processo inflamatório estimulado pelo agente carragenina administrado na cavidade peritoneal de ratos e que induz a migração de polimorfonucleares para a região, alterando assim o funcionamento do sistema imune. Imagina-se que esta atividade envolva alguma sinalização da lectina mediada por seus sítios de ligação a carboidratos. Neste caso específico, supõe-se que a PPL pode reconhecer como receptor de alta afinidade, glicoconjugados oligomansídicos contendo no máximo cinco resíduos de manose e que a interação se faz através do resíduo de manose ligado em  $\alpha$ -1,6 do núcleo trimansídeo do receptor, mesmo que este seja uma estrutura do tipo Man5. O aumento do fluxo de migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, mesmo em presença de PPL, porém administrada com glicose 100 mM reforça o conceito de que, a atividade da lectina é responsável pelos efeitos observados e que embora a glicose não seja inibidora da atividade hemaglutinante, a lectina possui afinidade por este monossacarídeo, pois se liga em coluna de Sephadex G-100.

Estes efeitos distinguem a lectina de sementes de *Parkia platycephala* de qualquer outra lectina glicose/manose específica já citada na literatura, e fortalece a hipótese das lectinas expressarem suas diferenças funcionais de forma bastante sutil e que sua especificidade de ligação a monossacarídeos define apenas a natureza estrutural do resíduo reconhecido em uma seqüência oligossacarídica e não define o epítipo reconhecido. Todos os resultados citados nesta “seção” foram recentemente descrito por BOMFIM (2001).

#### 1.4. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo central o estabelecimento da estrutura primária e cristalização da lectina PPL purificada de sementes de *Parkia platycephala* Benth (família: Leguminosae; sub-família: Mimosoideae; tribo: Parkieae).



## 2. MATERIAIS

### 2.1. Material Vegetal

Foram utilizadas sementes quiescentes (FIGURA 01) de *Parkia platycephala* Benth (Família: Leguminosae; Sub-família: Mimosoideae; Tribo: Parkieae), conhecida popularmente por visgueiro (FIGURA 02), que foram coletadas na Chapada do Araripe, município de Crato, Estado do Ceará.



FIGURA 01 – Vagem e sementes quiescentes de *Parkia platycephala* Benth



FIGURA 02- Exemplar da planta *Parkia platycephala* Benth na Chapada do Araripe-Ceará



## 2.2. Eritrócitos

Eritrócitos de coelhos albinos foram obtidos de animais adultos sadios e mantidos no Biotério do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

## 2.3. Reagentes

Acrilamida, N,N-metilenobisacrilamida, agarose, Coomassie brilliant blue R-250, pepsina, endoproteinase Lys-C (de *Achromobacter lyticus*; WAKO Chemicals GmbH, Neuss, Alemanha), termolisina (Merck, Darmstadt, Alemanha), endoproteinase Glu-C e endoproteinase Asp-N (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemanha), endoproteinase Arg-C (Roche), N- $\alpha$ -tosyl-L-phenylalanylchlorometano/tripsina,  $\alpha$ -quimotripsina (Sigma), pepsina (Sigma, Deisenhofen, Alemanha), eosina-5-iodoacetamida® (Molecular Probes, Inc.), carboidratos simples e complexos foram obtidos da Sigma Chemical Co., St Louis, USA, 2-mercaptoetanol e dodecil sulfato de sódio da Merck Darmstadt, Alemanha. Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

### 3- MÉTODOS

#### 3.1. Preparação da Farinha de Sementes de *Parkia platycephala* Benth

As sementes quiescentes de *P. platycephala* foram passadas em moinho elétrico do Tipo Wiley acoplado com peneira de 60 mesh. O material obtido foi repassado em moinho de café (Krupps Tipo 200) resultando em uma farinha bastante fina que, após delipidada por lavagens sucessivas com n-hexana e seca ao ar, foi então estocada em frascos hermeticamente fechados e mantidos a 4°C.

#### 3.2. Extração e Fracionamento de Proteínas

A farinha foi submetida à extração com acetato de sódio 0,05 M, pH 4,0 contendo NaCl 0,15 M na proporção 1:15 (m/v), sob agitação constante overnight à temperatura ambiente. A suspensão obtida foi centrifugada a 10.000 x g por 20 minutos a 5°C. O sobrenadante (extrato protéico) foi obtido por filtração em papel de filtro e o resíduo desprezado. O extrato protéico foi submetido à precipitação com sulfato de amônio a 40% de saturação por um período de 4 horas à temperatura ambiente com agitação ocasional. O precipitado resultante, obtido por centrifugação a 10.000 x g a 4°C por 20 minutos, foi ressuspenso e dialisado exaustivamente contra o tampão tris-HCl 50 mM, a pH 8,0 e submetido a cromatografia de afinidade para o isolamento da lectina (FIGURA 03).

#### 3.3. Dosagem de Proteínas Solúveis.

As determinações de proteínas nos extratos e diferentes frações foram feitas segundo o método de BRADFORD (1976). Em cada 100 µl de amostra, preparada em diferentes concentrações, foram adicionados 2,5 ml do reagente de Bradford. A mistura foi então deixada em repouso por dez minutos e em seguida determinada à absorvância a 595 nm, em um espectrofotômetro VIS LKB Novaspec II (Pharmacia). A concentração de proteínas foi determinada a partir de uma curva padrão obtida usando-se albumina sérica bovina.



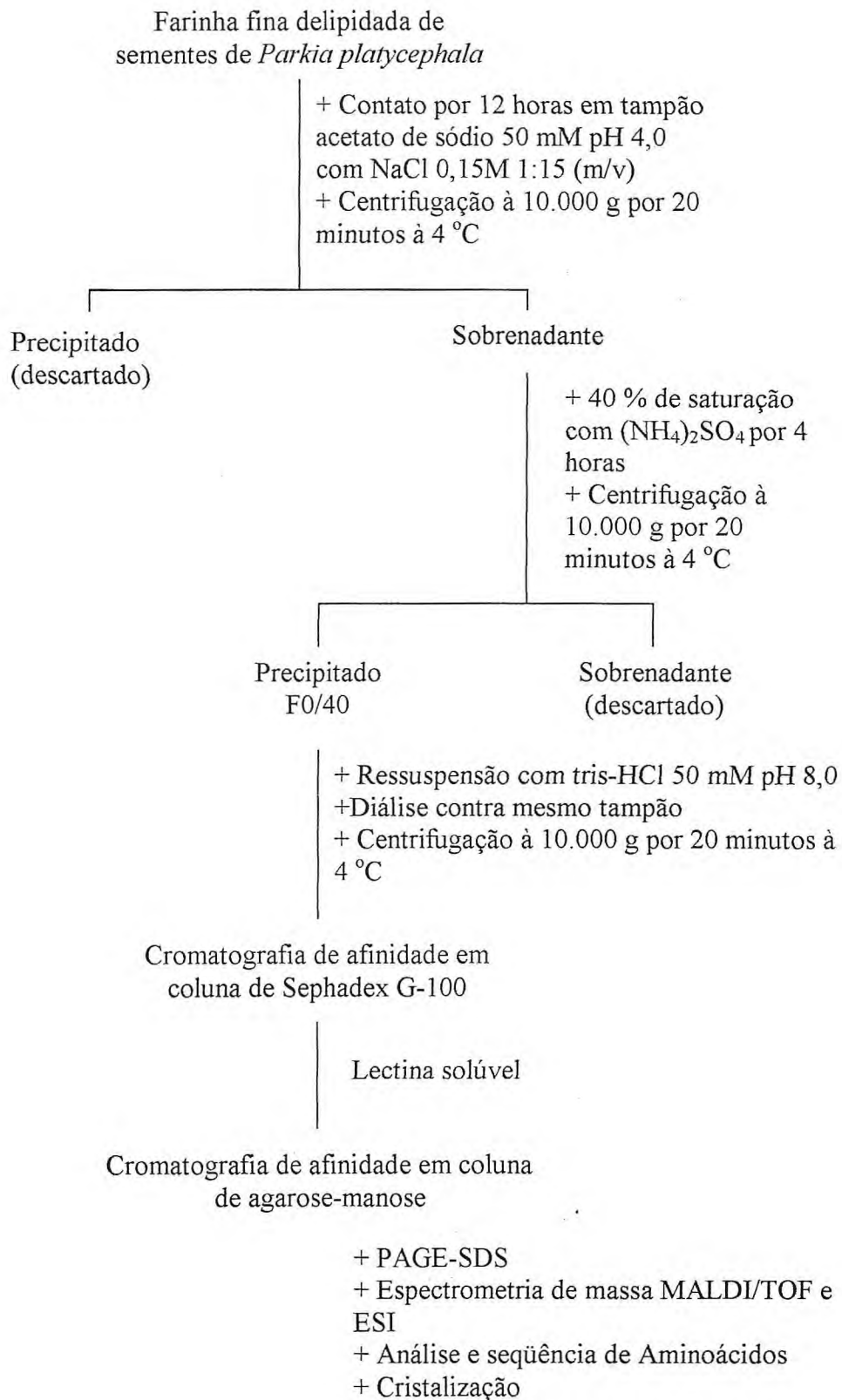


FIGURA 03 – Fluxograma de extração, isolamento, purificação e caracterização de proteínas de *Parkia platycephala* Benth.

A presença de proteínas nos eluatos cromatográficos foi avaliado por medida de absorvância a 280 nm em um espectrofotômetro UV/VIS Genesys 5 (Spectronic).

#### 3.4. Determinação de Atividade Hemaglutinante

Para a determinação da atividade hemaglutinante nos extratos e nas diferentes frações protéicas foi utilizado o método descrito por CAVADA (1980). As amostras a serem dosadas foram submetidas a diluições duplas seriadas (1:2, 1:4, 1:8, ...) em NaCl 0,15 M e, a 200 µL de cada diluição, foi adicionado igual volume de uma suspensão de eritrócitos a 2% em NaCl 0,15 M. Os ensaios foram então incubados a 37°C por 30 minutos e deixados em repouso à temperatura ambiente por mais 30 minutos, após o que, foram centrifugados a 1000 x g por 30 segundos à temperatura ambiente. Os títulos de hemaglutinação foram determinados como sendo o inverso da maior diluição ainda capaz de apresentar aglutinação visível a olho nú.

#### 3.5. Cromatografia de Afinidade em Coluna de Sephadex G-100.

A fração 0/40 foi submetida à cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-100 (2,5 x 30 cm) preparada segundo DETERMAN (1969) previamente equilibrada com tris-HCl 0,05 M, pH 8,0. Após a eluição do primeiro pico, que corresponde às proteínas que não interagiram com a matriz cromatográfica, o material retido (PII) foi então eluído com tris-HCl 0,05 M, pH 8,0 contendo glicose 0,1 M ou com tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 4,0, contendo NaCl 0,15 M. No caso da liberação da coluna utilizando o açúcar, o mesmo foi eliminado por diálise contra ácido acético 1M por 1 hora, seguido de diálise exaustiva contra tris-HCl 100 mM, pH 7,6 contendo 150 mM de NaCl. Por outro lado, quando a lectina foi eluída da coluna com o tampão acetato de sódio, o material foi dialisado contra água destilada, no caso de estocagem, ou contra o tampão Tris, no caso de ser utilizado logo após. O material insolúvel foi removido por centrifugação e o sobrenadante foi utilizado para a cromatografia de afinidade em coluna de Agarose-manose. No caso de estocagem de lectina, cada preparação, após a diálise contra ácido acético 1 M (no caso de desabsorção da lectina com a glicose), foi dialisada exaustivamente contra água destilada, liofilizada e armazenada a 4°C em frascos hermeticamente fechados.



### 3.6. Cromatografia de Afinidade em Coluna de Agarose-Manose

A lectina solúvel obtida por cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-100, foi submetida à cromatografia de afinidade em coluna de agarose-manose (Sigma). A coluna foi equilibrada com o tampão tris-HCl 0,1 M pH 7,6 contendo NaCl 0,15 M. A amostra dissolvida no tampão de equilíbrio foi aplicada na coluna e, após a eluição dos picos protéicos não retidos, foi aplicada uma solução do tampão de equilíbrio contendo  $\alpha$ -D-manose 0,1 M para a eluição do pico retido. A cromatografia foi realizada a fluxo constante de 15 ml/hora e os eluatos recolhidos em frações de 2 mL/tubo. A cromatografia foi acompanhada pela medida de absorbância a 280 nm e determinação da atividade hemaglutinante nas diversas frações.

### 3.7. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em Presença de SDS e 2-mercaptoetanol

Os experimentos de eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e 2-mercaptoetanol foram realizados segundo a técnica descrita por LAEMMLI (1970), adaptada para uso de géis de separação em placas. O gel de aplicação (contendo 3,5% de poliacrilamida) foi montado em tampão tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 e SDS a 1%. O gel de separação (contendo 15% de poliacrilamida) foi montado em tampão tris-HCl 3 M, pH 8,8 contendo SDS a 1%.

As amostras liofilizadas, a serem submetidas à eletroforese, foram dissolvidas em tampão tris-HCl 0,0625 M, pH 8,3, contendo SDS a 1%, na concentração de 2 mg/mL, e foram tratadas a 100°C por 10 minutos. Foi adicionado nas amostras o azul de bromofenol a 0,02% e cristais de sacarose antes de serem aplicadas ao gel. A corrida eletroforética foi realizada à voltagem constante (50 volts) por um período de 4 horas. Ao final da corrida, o gel foi corado com comassie brilliant blue R-250 a 0,05%, preparado em uma solução de metanol, ácido acético e água (1 : 3,5 : 8, v/v/v) e o excesso do corante retirado com uma solução de metanol, ácido acético e água (1 : 3,5 : 8, v/v/v), permitindo assim a visualização das bandas protéicas.

### 3.8. Ultracentrifugação Analítica

A massa molecular aparente da lectina de *Parkia platycephala* foi determinada em soluções tamponadas a diferentes valores de pH e submetidas a ultracentrifugação

analítica por equilíbrio de sedimentação, usando uma centrífuga Beckman XL-A com scanner UV de absorção óptica. Os experimentos foram realizados a 20°C a 13.000 rpm usando um rotor Ti NA-50. A lectina foi dissolvida a aproximadamente 0,1 mg/ml nos seguintes tampões: acetato de sódio 20mM, pH 4,5; Mes 20 mM, pH 5,5; Mes 20 mM, pH 6,4; Hepes 20 mM, pH 7,5 e tris-HCl 20 mM, pH8,5, cada um contendo 100 mM de NaCl, 10 mM de  $Cl_2Mn$  e 10mM de  $Cl_2Ca$ .

### 3.9. Espectrometria de Massa

A massa molecular da lectina purificada de sementes de *Parkia platycephala* foi determinada por espectrometria de massa do tipo eletrospray (ESI/MS) usando um instrumento triplo quadrupolo Sciex API-III LC-MS/MS. As massas moleculares dos peptídeos foram determinadas por espectrometria de massa MALDI-TOF/MS (**M**atrix-**A**ssisted **L**aser-**D**esorption **I**onization **T**ime-**O**f-**F**light **M**ass **S**pectrometry) usando um instrumento Applied Biosystem DE-Pro e ácido diidroxibenzóico (DHB dissolvido em etanol a 10%) como matriz, ou espectrometria de massa por ionização do tipo eletrospray com um espectrômetro de massa triplo quadrupolo PE-Sciex API365. O padrão de fragmentação do peptídeo C-terminal CB2, derivado do brometo de cianogênio foi analisado usando a ferramenta MS-PRODUCT do programa PROTEINPROSPECTOR v3.4.1. do UCSF Mass Spectrometry Facility (<http://prospector.ucsf.edu/ucshtml3.4/msprod.htm>).

### 3.10. Degradações Químicas e Enzimáticas

Nas degradações químicas foram realizadas clivagem das ligações Met-Aa<sup>x</sup> com um pequeno cristal de brometo de cianogênio (CNBr) que foi adicionado à solução de proteínas (aproximadamente 10 mg/mL em 70% de ácido fórmico) e a mistura foi incubada a 23°C por 24 horas na ausência de luz e clivagens das ligações Asn-Gly e Asp-Pro foram realizadas com hidroxilamina e ácido diluído respectivamente, usando o método descrito previamente (BORNSTEIN & BALIAN, 1977; JAUREGUI-ADELL & MARTI, 1975). A clivagem enzimática foi realizada por uma razão enzima/substrato de 1:100 a 23°C ou 37°C. A degradação foi realizada com pepsina em 5% de ácido acético por 6 horas. Foram realizadas clivagens com lisil endopeptidase por 16 horas (Lys-C) e com termolisina por 8 horas, em bicarbonato de amônio 0,1 M contendo uréia 4 M.



Clivagens com endoproteinasas Glu-C e Asp-N foram realizadas por 16 horas em bicarbonato de amônio 0,1 M contendo uréia 2 M. A proteólise por endoproteinase Arg-C foi realizada em bicarbonato de amônio 0,1 M contendo uréia 4 M, ditioneitol 1 mM e  $\text{CaCl}_2$  5 mM por 16 horas. Clivagens com N- $\alpha$ -tosil-L - fenilalanilclorometano/tripsina e  $\alpha$ -quimotripsina foram realizadas em bicarbonato de amônio por 18 horas. As reações enzimáticas foram concluídas por ajuste do pH da mistura reativa para um pH próximo de 8,0 com bicarbonato de amônio (para a pepsina) 2 M ou para pH próximo de 1,0 com ácido trifluoroacético (para todas as outras enzimas) e as amostras foram secas com jato de nitrogênio. Os produtos da reação foram ressuspensos no respectivo tampão inicial, centrifugados em centrífuga Eppendorf de bancada e utilizados para separação cromatográfica. Os fragmentos insolúveis foram novamente clivados utilizando-se a mesma metodologia descrita acima.

### 3.11. Isolamento de Peptídeos

Os peptídeos gerados nas diferentes hidrólises química e enzimáticas foram separados por cromatografia de exclusão molecular em colunas de Superose 12 (HR 10/30, Amersham-Pharmacia, Freiburg, Alemanha) acoplada a um sistema de FPLC (Pharmacia-LKB) ou Superdex (HR 10/30, Amersham-Pharmacia) acoplada a um sistema de FPLC (Pharmacia-LKB) equilibradas com ácido trifluoroacético 0,1% contendo 25% de acetonitrila em um fluxo de 0,3 mL/minuto, e/ou por HPLC de fase reversa usando (a) uma coluna C18 (Nucleosil 100-5 PPN, 250 x 4mm) (Macherey-Nagel) eluída a 1 mL/minuto com uma mistura de ácido trifluoroacético 0,1% (v/v) em água (solução A) e acetonitrila (solução B), primeiro em condições isocráticas (10% de B) por 5 minutos, seguido de um gradiente de 10-20% de B por 5 minutos, 20-40% por 60 minutos e 40-70% por 15 minutos ou (b) uma coluna C18 (Vydac, 250 x 3mm) eluída a 0,25 mL/minuto com um gradiente linear de 3-42% de B. A detecção dos picos foi realizada a 220 ou 214 nm e os picos foram coletados manualmente.

### 3.12. Análise de Aminoácidos e de Aminoaçúcares

As análises de aminoácidos e aminoaçúcares da lectina de *P.platycephala* intacta e reduzida e da lectina alquilada foram realizadas com um analisador de aminoácidos

System Gold (Beckman), após a hidrólise ácida com HCl 6 M a 110°C por 24 horas para aminoácidos e com HCl 4 M por 4 horas para aminoaçúcares e acondicionamento das amostras em ampolas lacradas. Para determinações de açúcares neutros e ácido siálico, amostras de 1 mg de lectina de *P.platycephala* foram hidrolisadas com HCl 2 M por 2 horas a 110°C e ácido trifluoroacético 0,2 M por 1 hora a 80°C, respectivamente. Depois que os monossacarídeos foram hidrolisados e secos em Speed Vac (Savant, Alemanha), os mesmos foram analisados em coluna CarboPac PA 1 (4 x 200mm), eluída a fluxo 1 mL/minuto com acetato de sódio 60 mM contendo NaOH 16 mM para açúcares neutros ou em acetato de sódio 60mM contendo NaOH 20 mM para ácido siálico, usando analisador Dionex DX-300 equipado com detector amperométrico de pulsação e software cromatográfico AI-450 (ANUMULA & TAYLOR, 1991).

### 3.13. Determinação da Seqüência de Aminoácidos

A estrutura primária da lectina de sementes de *Parkia platycephala* foi determinada por análise da seqüência N-terminal pelo princípio da degradação de Edman (usando seqüenciadores automáticos Applied Biosystem modelos 473A e 492) e por sobreposição das seqüências dos peptídeos gerados por clivagens química e proteolítica. A proteína na concentração de 1 a 5 mg foi dissolvida em 200 µl de tris-HCl 100 mM, pH 8,5 contendo hidrocloreto de guanidina 6 M e reduzido por adição de 10 µL de 2-mercaptoetanol a 50°C por 2 horas. A solução foi resfriada à temperatura ambiente, alquilada com 20 µL de vinilpiridina por 2 horas na ausência de luz, dialisada contra bicarbonato de amônio 200 mM e liofilizada. A busca por similaridade de seqüência de aminoácidos em banco de dados foi realizada com o programa BLASTP 2.0.5 (ALTSCHUL *et al.*, 1997) no endereço eletrônico <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

### 3.14. Determinação de Grupos Sulfidrilas e Pontes dissulfeto.

Para quantificação de resíduos de cisteína livres e presença de pontes dissulfeto, a proteína (2-5 mg/mL em tris-HCl 100 mM, pH 8,6 contendo EDTA 1 mM e hidrocloreto de guanidina 6 M) foi desnaturada a 80°C por 30 minutos, resfriada à temperatura ambiente, e incubada com iodoacetamida 10 mM por 1 hora à temperatura ambiente, ou com 2-mercaptoetanol a 1% por 2 minutos a 100°C, seguido de adição de



um excesso molar de 2,5 vezes de iodoacetamida em relação ao agente redutor e incubado por 1 hora à temperatura ambiente. As amostras foram dialisadas exaustivamente contra água, liofilizadas e hidrolisadas com HCl 6 M a 110°C por 24 horas e, posteriormente foram submetidas à análise de aminoácidos. Alternativamente a lectina de *P.platycephala* (em tris-HCl 10 mM, pH 8,0 e fosfato de sódio 100 mM, pH 8,0) foi incubada por 30 minutos à temperatura ambiente com um excesso molar de cinco vezes da sonda fluorescente tiol-reativa eosina-5-iodoacetamida®, e analisada por PAGE-SDS. As bandas de proteínas fluorescentes foram visualizadas usando lâmpada ultra-violeta (UV) e fotografadas antes de serem coradas com Coomassie Brilliant Blue.

### 3.15. Cristalização e Análise Preliminar de Difração de Raios X.

O método da matriz dispersa (JANCARIK & KIM, 1991), usando soluções de levantamento de cristais® fornecidas por Hampton Research (CA, USA), foi utilizado para a determinação das condições iniciais de cristalização. Os cristais foram produzidos pelo método de difusão a vapor a 22°C usando gotas pendentes constituídas de volumes iguais da solução da lectina (aproximadamente 2-4 mg/ml em Hepes/Na 50 mM, pH 8,0) e tampão de estoque (Hepes/Na 100 mM, pH 7,5, isopropanol a 10% e polietilenoglicol 4000 a 20%). Dados de difração de raios X foram coletados em um difratômetro de raios X, um MAR Research CCD com sistema de imaging-plate acoplado a um gerador de raios X Bruker AXS que trabalha a 50 KV e 90 mA, usando radiação CuK $\alpha$  monocromático gerada por um anodo de grafite rotatório. Dados complementares de difração foram obtidos utilizando-se um dos sincrotrons normalmente usados pelo grupo (DESY – Hamburgo, Grenoble e Trieste). A resolução das estruturas cristalinas (através da substituição molecular ou gerando derivados isomorfos de átomos pesados) foi resolvida no IBV (Instituto de Biomedicina de Valência), que está dotado de estações gráficas e dos programas de informática necessários para o tratamento de dados de difração e interpretação dos mapas de densidade eletrônica.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Caracterização da Planta e das Sementes de *Parkia platycephala* Benth.

As sementes de *Parkia platycephala*, uma espécie pertencente à família Leguminosae, sub-família Mimosoideae, gênero *Parkia* apresentam-se em vagens de aproximadamente  $13,0\text{cm} \pm 0,7$  de comprimento e em número de  $21 \pm 2$  sementes por vagem (FIGURA 01). Caracterizam-se por possuir forma elíptica com tegumento marrom unido firmemente à amêndoa, com a parte central do tegumento escura. Pesam em média  $0,1\text{g} \pm 0,01$ , apresentando comprimento em torno de  $0,85\text{cm} \pm 0,06$ , largura aproximada de  $0,49\text{cm} \pm 0,04$  e  $0,38\text{cm} \pm 0,03$  de espessura (SANTOS, 1992).

Um fato curioso observado durante as coletas na Chapada do Araripe (Crato-CE) demonstrou a coexistência de árvores produzindo vagens de diferentes colorações. Entretanto, a análise botânica das diferentes exsiccatas não evidencia a ocorrência de variedades diferentes.

### 4.2. Purificação da Lectina de Sementes de *Parkia platycephala* Benth.

Para purificar a lectina de sementes maduras de *P.platycephala*, foi realizada inicialmente uma cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-100, da Fração 0/40, obtida por precipitação do extrato bruto com 40% de saturação com sulfato de amônio. Esta cromatografia de afinidade originou um pico retido ativo na matriz cromatográfica que foi eluído com o tampão de equilíbrio contendo glicose 0,1M ou com tampão acetato de sódio 0,05M, pH 4,0, contendo NaCl 0,15M (FIGURA 04). Com o objetivo de aumentar o grau de pureza da lectina de *P.platycephala* e tendo em vista que ensaios prévios (SANTOS, 1992) indicaram ser a manose um potente inibidor da atividade hemaglutinante em relação à glicose, o pico retido em coluna de Sephadex G-100 foi recromatografado em coluna de agarose-manose. Esta nova cromatografia de afinidade apresentou um pico ativo retido que foi eluído com o tampão de equilíbrio contendo manose 0,1M ou com tampão acetato de sódio 0,05M, pH 4,0, contendo NaCl 0,15M (FIGURA 05). Esta lectina de sementes de *P.platycephala*, quando caracterizada parcialmente, apresentou um coeficiente de extinção molar de 7,6 que é ligeiramente menor que o de outras lectinas como lectina de Con A que é de 11,4 (BECKER *et al.*,



1975), de *Canavalia bonariensis* 9,0 (CAVADA et al., 1996), de *Dioclea grandiflora* 12,0 (RICHARDSON et al., 1984), de *Dioclea guianensis* 11,5 (VASCONCELOS et al., 1991), de *Canavalia brasiliensis* 13,5 (MOREIRA & CAVADA, 1984) e de *Cratylia floribunda* 11,4 (OLIVEIRA et al., 1991), provavelmente devido ao seu baixo teor de aminoácidos aromáticos e, em condições não desnaturantes, indicou ocorrer em pH fisiológico como uma mistura de cerca de 70% de dímeros (com massa molecular aparente de 77,6 kDa) e 30% de tetrâmeros (com massa molecular aparente de 141,2 kDa) (CAVADA et al., 1997).

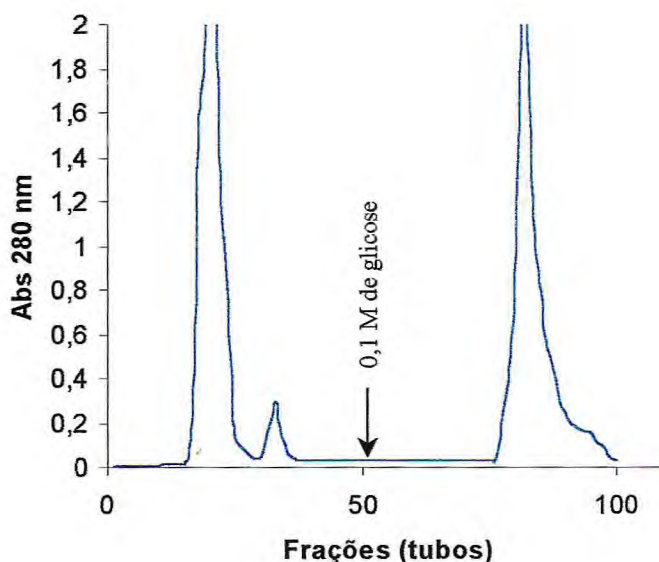


FIGURA 04- Cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-100 da fração 0/40 de sementes de *Parkia platycephala* Benth. Amostra: F(0/40) redissolvida e dialisada exaustivamente contra tampão tris-HCl 50mM, pH 8,0; fluxo 60mL/h, frações 5mL/tubo; coluna 36 X 2,6cm.

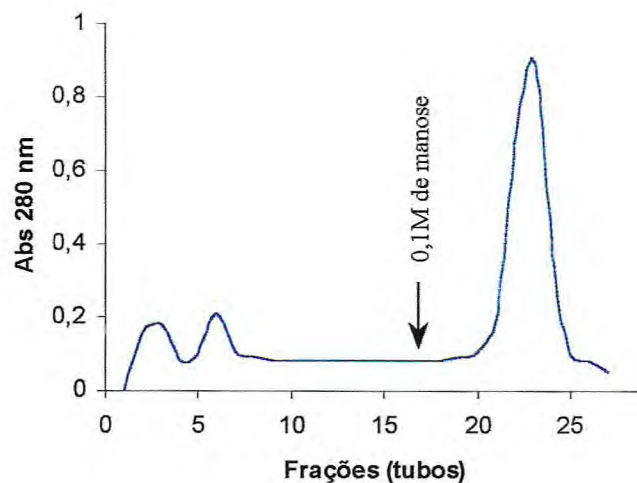


FIGURA 05- Cromatografia de afinidade em coluna de agarose-manose da lectina solúvel obtida em Sephadex G-100. Amostra: 1,6mg/mL de Lectina solúvel em tampão tris-HCl 0,1M pH 7,5 contendo NaCl 0,15 M; fluxo 15mL/h; frações 2mL/tubo; coluna 4,8 X 1,4cm.

#### 4.3. Eletroforese em PAGE-SDS em presença de 2-mercaptoetanol da Lectina de sementes de *Parkia platycephala* Benth.

A lectina purificada de sementes de *P.platycephala*, específica por manose/glicose, quando submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e  $\beta$ -mercaptoetanol, apresentou uma única banda protéica com massa molecular aparente de 50 kDa (FIGURA 06). resultados estes semelhantes aos obtidos com a lectina de *Parkia speciosa*, que por PAGE-SDS apresentou-se como uma única banda protéica de 47,3kDa (SUVACHITTANONT & PEUTPAIBOON, 1992). Por outro lado, a lectina de *Parkia javanica* apresentou, também em eletroforese em gel em condições desnaturantes, duas bandas protéicas de 45,7 e 47,9kDa (UTARABHAND & AKKAYANONT, 1995).



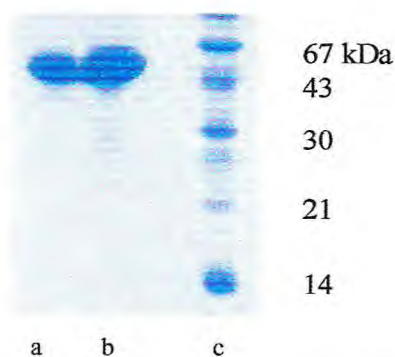


FIGURA 06- Eletroforese em PAGE-SDS e 2-mercaptoetanol da lectina de *Parkia platycephala* Benth em 15% de concentração. Poço a e b: Lectina purificada; Poço c: Marcadores de massa molecular 67kDa albumina sérica bovina, 43kDa ovoalbumina, 30kDa. anidrase carbônica, 21kDa inibidor de tripsina de soja, 14kDa lisozima.

#### 4.4. Composição de Aminoácidos da Lectina de Sementes de *Parkia platycephala*.

A composição de aminoácidos da lectina de *Parkia platycephala*, na TABELA 03, mostrou que a lectina é particularmente rica nos resíduos de aminoácidos glicina, prolina, ácido aspártico/asparagina, serina, isoleucina, treonina e alanina. Comparando-se a composição de aminoácidos da lectina de *P.platycephala* com os teores de outras três lectinas de *Parkia* já estudadas, constata-se que, em geral, os valores de conteúdo percentual de cada aminoácido são semelhantes, destacando-se uma maior quantidade de prolina na lectina de *P.platycephala* e um maior conteúdo de ácido glutâmico/glutamina na lectina de *P.discolor*.

#### 4.5. Estudos da Estrutura Molecular da Lectina de sementes de *Parkia platycephala*.

A massa molecular da lectina de *Parkia platycephala* foi determinada por espectrometria de massa do tipo ESI (EletroSpray Ionization) e MALDI-TOF que apresentaram  $47.946 \pm 6\text{Da}$  e  $47.951 \pm 9\text{Da}$ , respectivamente. Na análise da lectina nativa de *P.platycephala* por espectrometria de massa do tipo ESI revelou uma mistura

TABELA 03- Comparação da composição de aminoácidos da lectina de sementes de *Parkia platycephala* com a de outras lectinas do gênero *Parkia*.

Resíduo	nmoles % de aminoácido		
	Lectina de <i>P.platycephala</i>	Lectina de <i>P.discolor</i> *	Lectina de <i>P.speciosa</i> **
ASN/ASP	9,8	9,9	11,3
GLN/GLU	4,7	10,2	5,1
CYS	0,0	0,1	0,5
SER	9,1	7,9	9,2
GLY	15,4	12,8	15,8
HIS	2,1	1,7	2,5
THR	6,3	6,0	7,1
ALA	6,0	7,3	5,6
PRO	13,7	9,1	5,4
ARG	1,2	3,3	2,7
TYR	4,3	4,0	4,3
VAL	4,5	4,4	5,7
MET	0,4	0,5	0,5
ILE	7,3	5,9	9,2
LEU	3,8	6,2	4,9
PHE	5,7	5,0	6,2
LYS	5,6	5,6	4,5
TRP	Nd	Nd	Nd
GlcNAc	0,0	0,9	-

\* CAVADA et al., 2000

\*\* SUVACHITTANONT & PEUTPAIBOON, 1992

complexa de íons correspondendo a massas moleculares ( $m/z$ ) obtidas das séries de íons de 1713.4Da ( $M + 28H$ )<sup>28+</sup>, 1776.8Da ( $M + 27H$ )<sup>27+</sup>, 1845.1Da ( $M + 26H$ )<sup>26+</sup>, 1918.9Da ( $M + 25H$ )<sup>25+</sup>, 1998.8Da ( $M + 24H$ )<sup>24+</sup>, 2085.7Da ( $M + 23H$ )<sup>23+</sup>, 2180.5Da ( $M + 22H$ )<sup>22+</sup>, 2284.5Da ( $M + 21H$ )<sup>21</sup>(FIGURA 07). A massa da proteína foi calculada através de algoritmo por computador acoplado ao Eletrospray a partir da série de íons obtidos, o que possibilitou a obtenção de uma maior exatidão do valor real da massa calculada que resultou em um único pico de  $47.946 \pm 6$ Da.



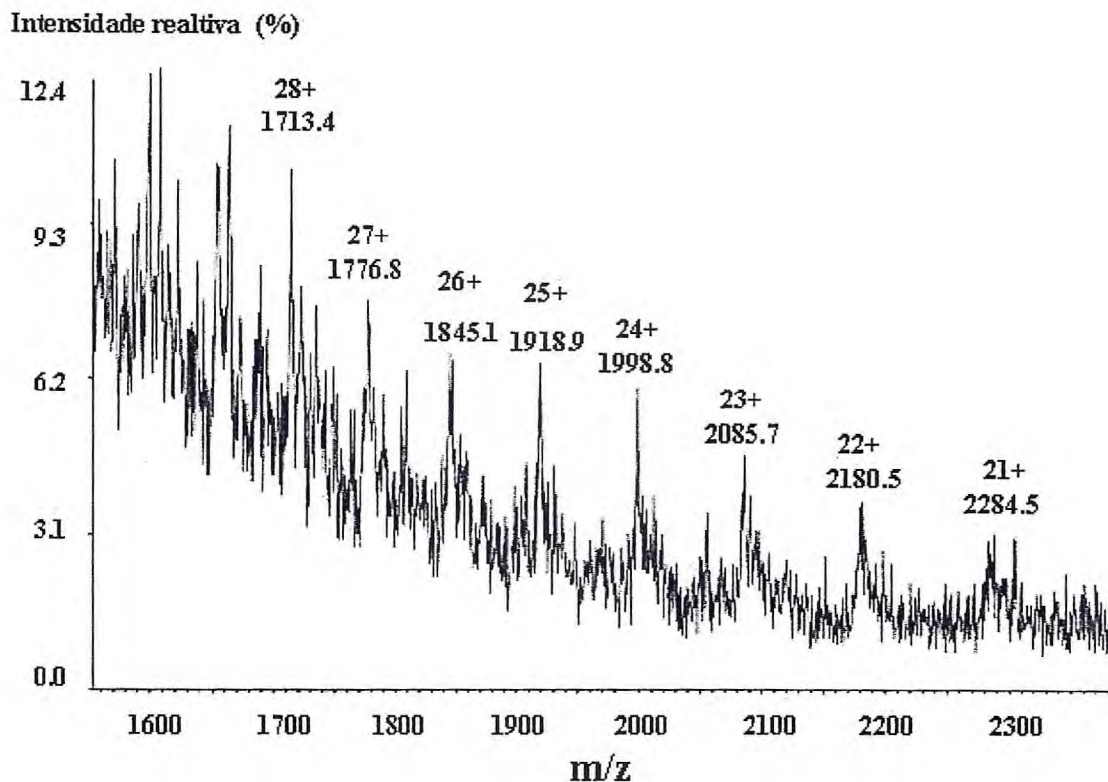


FIGURA 07- Espectro de massa ESI/MS da lectina de sementes de *Parkia platycephala* Benth. da série de íons de  $(M + 21H)^{21+}$  ao  $(M + 28H)^{28+}$ . A massa molecular isotópo médio foi calculada em  $47.496 \pm 6$ Da.

A heterogeneidade da seqüência da lectina de *P. platycephala* foi detectada em três posições: 70(I/V), 227(K/R) e 296(D/N). Entretanto, todas as três substituições são conservativas e indicam que a lectina de *P. platycephala* constitui, na verdade, uma mistura de isolectinas altamente homólogas entre si. Após a clivagem da proteína (lectina carboximetilada intacta ou reduzida) com CNBr para a obtenção de peptídeos para o sequenciamento, e a subsequente separação dos peptídeos produzidos por cromatografia de fase reversa em coluna C18 acoplada a um sistema de HPLC, o fragmento N-terminal (SLKGM) e o peptídeo C-terminal CB<sub>2</sub> da seqüência mostrada na FIGURA 08 foram caracterizados por espectrometria de massa MALDI-TOF e por análise MS/MS. A espectrometria de massa MALDI-TOF da seqüência de aminoácidos de CB<sub>2</sub> ( $M + H^+ = 2.618,3$ Da) foi 99,5Da maior que a determinada por degradação de Edman (VVGFGHGRAGDYLDIAIGIFVKPDTA, com  $M = 2.518,8$ Da). Esse resultado indicou claramente a presença de uma valina adicional no C-terminal CB<sub>2</sub> não detectado

no sequenciamento N-terminal obtido por degradação de Edman. O íon  $(M + 3H)^{3+}$  de  $CB_2$  ( $m/z = 873,6Da$ ) foi submetido à análise MS/MS e o espectro do fragmento produziu y-íons do C-terminal e b-íons do N-terminal, de acordo com nomenclatura padrão (ROEPSTORFF & FOHLMAN, 1984; BIEMANN, 1990), confirmando assim, na extremidade C-terminal do peptídeo, a presença de uma valina, determinada anteriormente por espectrometria de massa MALDI-TOF.

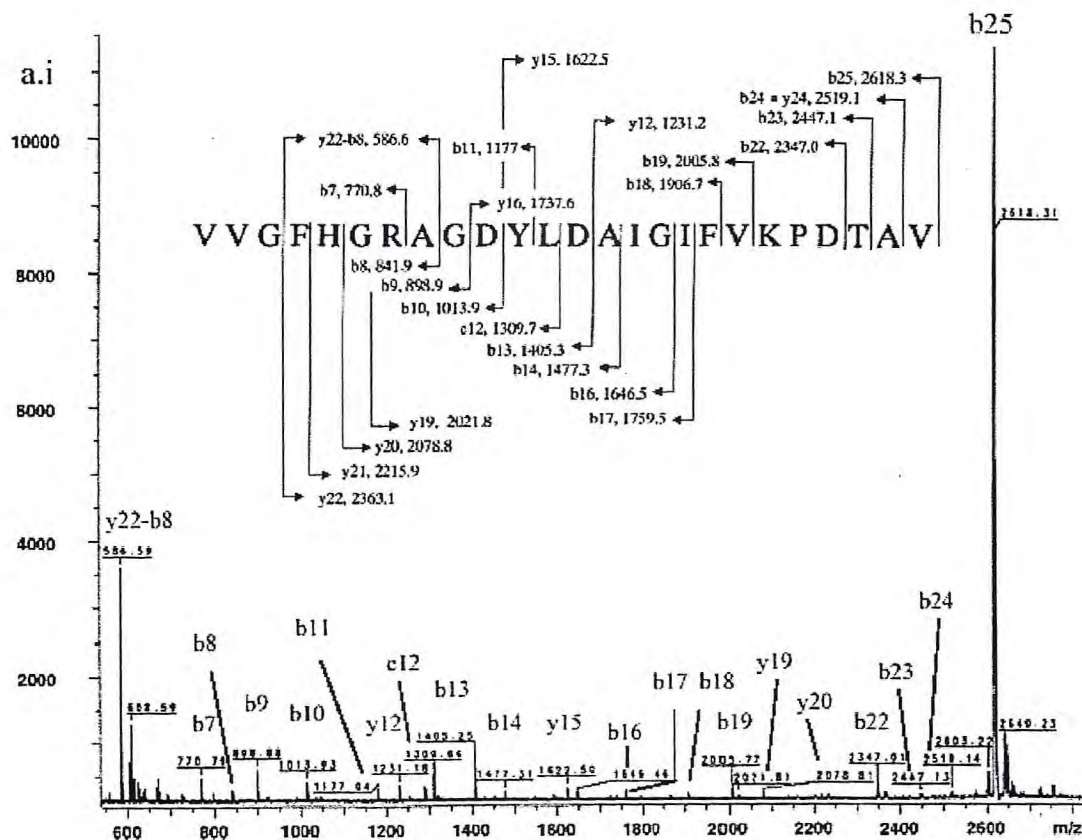


FIGURA 08- Espectro de massa MS/MS do fragmento C-terminal  $CB_2$  da lectina de sementes de *Parkia platycephala* Benth. Inserido: Seqüência determinada através do espectro do fragmento pela análise dos y-íons do C-terminal e dos b-íons do N-terminal.

Para caracterizar pontes dissulfeto ou cisteína livre, a lectina foi alquilada com iodoacetamida e quantitativamente recuperada na forma de derivados carboximetilcisteína em hidrolisados da proteína, que foram incubados previamente em condições desnaturantes, porém não reduzidas, para que a proteína pudesse expor a



cisteína. Posteriormente, quando a lectina foi incubada com eosina-5-iodoacetamida (uma sonda fluorescente específica para grupos tióis) foi observada uma banda fluorescente quando submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e 2-mercaptoetanol (FIGURA 09).

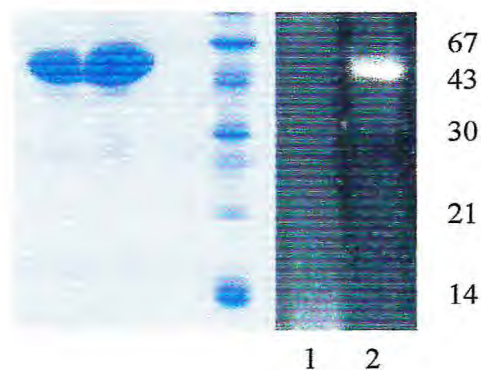


FIGURA 09- Eletroforese em gel de poliacrilamida 15% em presença de SDS e 2-mercaptoetanol com detecção UV de marcação fluorescente da lectina de *Parkia platycephala*. Poço 1: Lectina incubada com iodoacetamida antes do tratamento com eosina-5-iodoacetamida; Poço 2: Lectina após a incubação com eosina-5-iodoacetamida.

Nenhuma marcação fluorescente foi observada por tratamento prévio com iodoacetamida, pois para que houvesse a ligação do grupo tiol da cisteína com a eosina era necessário que a cisteína estivesse livre. Estes resultados, juntamente com a observação da mobilidade eletroforética aparente da lectina foram os mesmos tanto na presença como na ausência de agente redutor, mostrando claramente que o único resíduo de cisteína não estava envolvido na formação de ponte dissulfeto (ponte S-S). A massa molecular da lectina de *P.platycephala* foi determinada por espectrometria de massa do tipo ESI e MALDI-TOF que apresentaram  $47.946 \pm 6\text{Da}$  e  $47.951 \pm 9\text{Da}$ , respectivamente. Por degradação de Edman, a massa isótopo-média calculada pelo sequenciamento dos 447 aminoácidos foi de  $47.521\text{Da}$  que é cerca de  $425\text{Da}$  menor que a massa determinada por espectrometria de massa devido à retirada do N-terminal bloqueado. O fato da lectina não conter nenhum outro aminoácido modificado confirma a presença da extremidade N-terminal bloqueada indicando que os  $425\text{Da}$  que faltaram, correspondem a um fragmento N-terminal que, dependendo do grupo bloqueado e da composição de aminoácidos, deve conter de 3 a 5 aminoácidos. Tentativas foram

realizadas para desbloquear o N-terminal da proteína com ácido por desacetilação e desformilação (KAWASAKI & ITANO, 1972), mas não foi obtido sucesso devido à intensa clivagem interna resultando em uma grande quantidade de ciclos de Edman que não puderam ser interpretados. Usando tratamento da proteína com a enzima piroglutamato aminopeptidase também não tornou a extremidade N-terminal livre. Nenhum fragmento contendo o resíduo N-terminal bloqueado da lectina de *P.platycephala* foi encontrado, sugerindo que o mesmo deva ser muito hidrofóbico não podendo, assim, ser eluído da coluna de fase reversa.

#### 4.6. Composição de Aminoácidos da Lectina de Sementes de *Parkia platycephala* Benth.

A análise de carboidratos não mostrou a presença de aminoácidos (glicosamina, galactosamina), açúcares neutros (manose, galactose, fucose) ou ácido siálico, indicando que provavelmente a proteína não é glicosilada.

#### 4.7. Estrutura Primária da Lectina de Sementes de *Parkia platycephala* Benth.

A estrutura primária da lectina de sementes de *Parkia platycephala* (FIGURA 10) apresentou um total de 447 resíduos de aminoácidos e foi montada por sobreposição interna das seqüências obtidas de peptídeos isolados por FPLC e por HPLC e que foram previamente gerados por clivagens químicas e enzimáticas.

#### 4.8. Homologia de Seqüência Entre a Lectina de Sementes de *Parkia platycephala* Benth e Outras Lectinas.

A análise da seqüência de aminoácidos revelou que a estrutura da lectina de *Parkia platycephala* pode ser dividida em três repetições de 145 a 150 resíduos de aminoácidos (chamados de Pk1, Pk2 e Pk3) que compartilham 66 resíduos de aminoácidos idênticos (45% de identidade). Cada uma das repetições Pk mostra, por outro lado, uma significativa identidade de seqüência com o grupo de lectinas manose específicas relacionadas a jacalina (*Artocarpus integrifolia*) identificadas em rizomas de *Calystegia sepium* e *Convolvulus arvensis*, Convolvulaceae (VAN DAMME *et al*, 1996a; VAN DAMME *et al* 2000), em tubérculos de alcachofra de Jerusalém



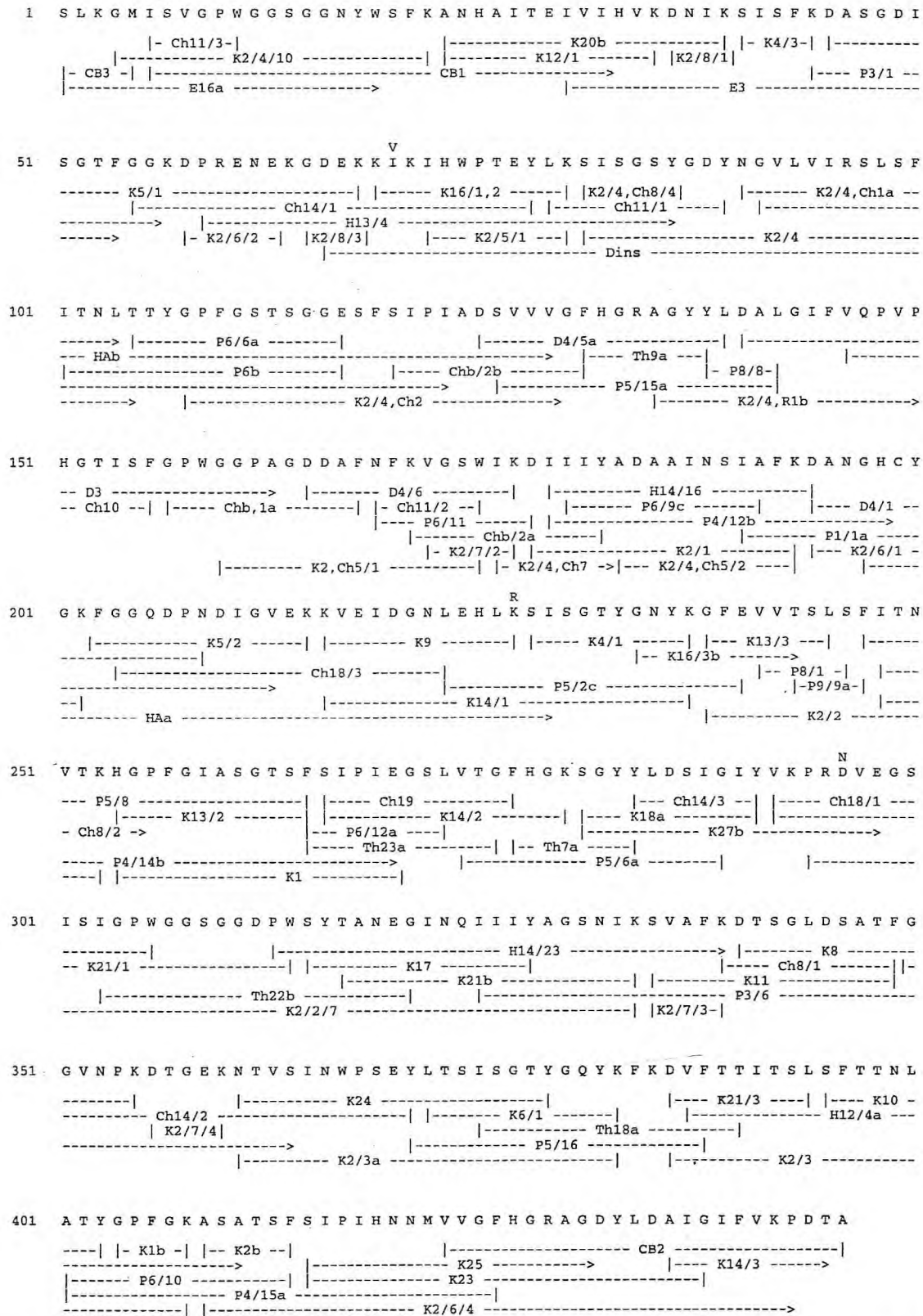


FIGURA 10 – Sequência primária da lectina de sementes de *Parkia platycephala* obtida por sobreposição de peptídeos produzidos por clivagens com brometo de cianogênio (CB-), hidroxilamina (H-), quimiotripsina (Ch-), pepsina (P-), termolisina (Th-) e endoproteinasas Lys-C (K-), Glu-C (E-), Asp-N (D-). Dins é um fragmento insolúvel da digestão com Asp-N. A heterogeneidade na sequência foi encontrada em 3 posições, (I/V)70, (K/R)227, (D/N)296. A massa determinada dos 447 aminoácidos da sequência por degradação de Edman é menor  $\approx$  425 Da. que a massa determinada por espectrometria de massa (FIGURA 01), indicando que o resíduo N-terminal bloqueado de 3 a 5 aminoácidos são perdidos da porção N-terminal da proteína. O peptídeo C-terminal (CB<sub>2</sub>) foi analisado por espectrometria de massa, o qual indica uma valina adicional na extremidade C-terminal não determinado pela sequenciamento de Edman.

(*Heliantus tuberosus*, Asteraceae) (VAN DAMME *et al* 1999), em frutos de bananeira (*Musa acuminata*, Musaceae) (PEUMANS *et al* 2000b), em sementes de noz japonesa (*Castanea crenata*, Fagaceae) (NOMURA *et al*, 2000), em folhas e caules de plantas de arroz submetidas a estresse salino (*Oryza sativa*, Gramineae) (ZHANG *et al*, 2000), e a uma proteína de batata doce (*Ipomoeas batata*, Convolvulaceae), induzida por jasmonato e de função desconhecida. Os domínios Pk da lectina de *Parkia platycephala* também apresentam uma grande similaridade com proteínas de plantas de várias monocotiledôneas, como exemplo, proteínas induzidas por estresse de luz presentes em cevada (*Hordeum vulgare*) (POTTER *et al*, 1996), milho (*Zea mays*) e trigo (*Triticum aestivum*). Além disso, os domínios da lectina de *P. platycephala* são estruturalmente semelhantes a várias proteínas induzidas por jasmonato, proteínas de dicotiledôneas que se ligam a mirosinase, como exemplo em *Arabidopsis thaliana* (LIN *et al*, 1999). Todas essas proteínas contêm de 1 a 6 repetições do domínio  $\beta$  prisma relacionados a jacalina. Cada uma das repetições da lectina de *P. platycephala* contém 11 resíduos invariáveis e 23 resíduos conservados que definem provavelmente a curvatura do domínio  $\beta$  prisma apresentadas na FIGURA 11 (Para um alinhamento múltiplo e organização do domínio dos 152 registros consultados do servidor Pfam em <http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/Pfam/getacc?PF01419>).

#### 4.9. Estudos de Difração de Raios X de Cristais da Lectina de Sementes de *Parkia platycephala* Benth.

Os cristais da lectina de *Parkia platycephala* que apresentam simetria do tipo ortorrômbicos são apropriados para experimentos de difração de raios X (dimensões máximas de  $0,6 \times 0,3 \times 0,1 \text{ mm}^3$ ) e cresceram em quatro semanas. Os cristais pertencem ao grupo espacial  $P2_12_12$  ou  $P2_12_12_1$ , tiveram célula unitária de  $a = 63 \text{ \AA}$ ,  $b = 68 \text{ \AA}$ ,  $c = 214 \text{ \AA}$ ;  $\alpha = \beta = \lambda = 90^\circ$ , e difrataram em uma resolução máxima de  $2,7 \text{ \AA}$ .

#### 4.10. Estrutura Quaternária da Lectina de sementes de *Parkia platycephala* Benth.

Como observado por SDS-PAGE, a lectina de sementes de *Parkia platycephala* apresenta uma subunidade simples com massa molecular aparente de 50kDa confirmada por espectrometria de massa do tipo ESI e MALDI-TOF que apresentaram uma massa



molecular nas diferentes preparações da lectina, indicando que a lectina de *P. platycephala* é composta por uma única cadeia polipeptídica. Em solução, e a diferentes valores de pH (faixa de 4,5 a 8,5), a massa molecular aparente da lectina, determinada por ultracentrifugação analítica, foi de  $94 \pm 3$  kDa. Estes resultados indicaram claramente que a lectina de *Parkia platycephala* comporta-se como um dímero não dependente de pH.

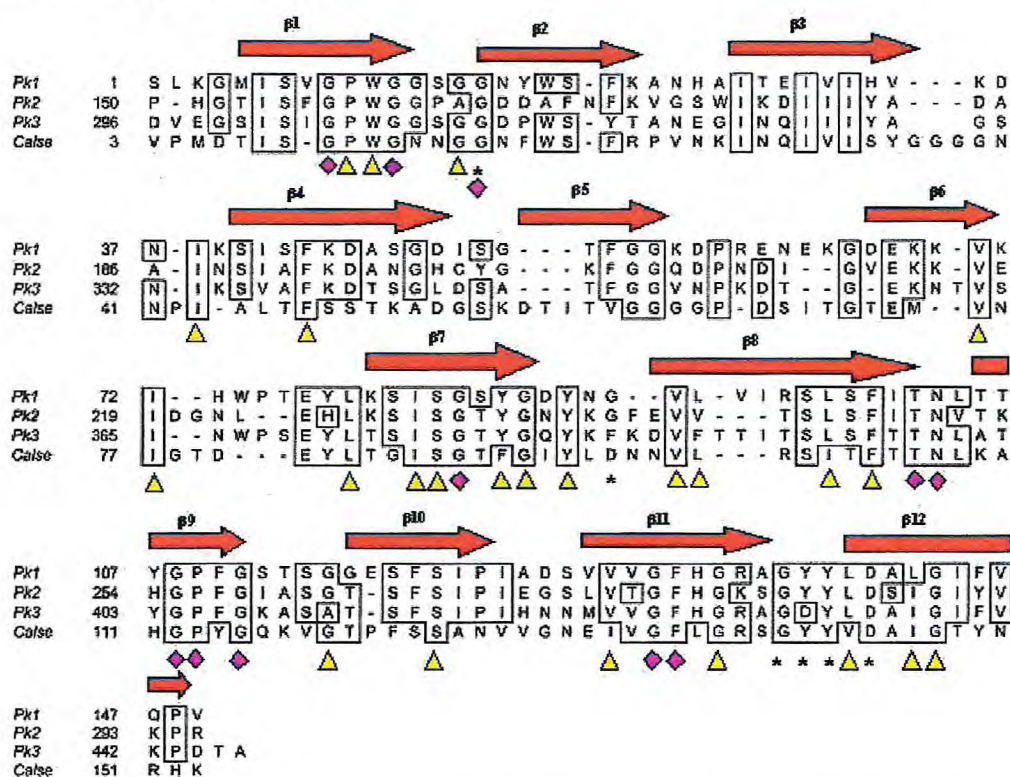


FIGURA 11- Alinhamento da seqüência de aminoácidos dos três domínios repetitivos da lectina de *Parkia platycephala* com uma lectina relacionada a jacalina de *C. sepium* (VAN DAMME, *et al*, 1996a). Resíduos idênticos encontrados nas quatro seqüências aparecem delimitados geometricamente. Resíduos invariáveis e conservados de proteínas relacionadas a jacalina, os quais definem a topologia do domínio  $\beta$  prisma, são representados por losangos púrpuros e triângulos amarelos, respectivamente. As posições correspondentes dos aminoácidos nos 12 segmentos de estrutura secundária  $\beta$  do domínio  $\beta$  prisma foram identificadas na estrutura cristalográfica da lectina de *Helianthus tuberosus* (BOURNE *et al*, 1999) são mostrados acima do alinhamento de seqüência. São ilustradas com um asterisco as posições dos resíduos de aminoácidos da estrutura cristalográfica de *H. tuberosus* os quais interagem na ligação com manose.



## 5. DISCUSSÃO

A subfamília de plantas leguminosas Mimosoideae contém seis tribos (Adenanthereae, Mimoseae, Mimosygantheae, Parkiae, Acavieae e Ingeae) que englobam no total 56 gêneros. A tribo Parkiae constitui, na verdade, a menor de todas estas tribos, englobando apenas os gêneros *Parkia* e *Penthaclera*. A espécie *Parkia platycephala*, pertencente ao gênero *Parkia*, é uma espécie amplamente distribuída nas regiões serranas do nordeste brasileiro e de grande importância sócio-econômica, pois além de grande resistência à seca, seus frutos amadurecem e caem quando a forragem está escassa e de baixo valor nutritivo. Seus frutos são usados para a alimentação de ruminantes, porém a casca de suas vagens apresenta efeito tóxico para animais monogástricos (CARVALHO & RAMOS, 1982), talvez devido à presença de fatores antinutricionais. Na atualidade, a tribo Parkiae é um dos poucos taxa de Mimosoideae do qual lectinas foram caracterizadas bioquimicamente.

Este trabalho apresenta dados de determinação da estrutura primária da primeira lectina de Mimosoideae que foi previamente isolada de sementes de *P. platycephala*, bem como os dados cristalográficos preliminares desta proteína. Esta proteína é formada por três domínios homólogos arranjados em série, onde cada domínio exibe semelhança com a sequência de aminoácidos da jacalina, uma lectina das sementes de *Artocarpus integrifolia* que possui topologia em  $\beta$  prisma descrita através da sua estrutura cristalográfica (SANKARANARAYANAN, *et al.*, 1999). Com exceção da lectina de castanha japonesa (*Castanea crenata*), que é composta de dois domínios repetitivos de  $\beta$  prisma (NOMURA *et al.*, 2000), as lectinas de plantas relacionadas a jacalina são proteínas de aproximadamente 15 kDa e apresentam um simples domínio de  $\beta$  prisma. A estrutura primária da lectina de sementes de *P. platycephala* contém um resíduo N-terminal bloqueado, um fato raro em lectinas de leguminosas. Seu N-terminal bloqueado possui aproximadamente 3 a 5 resíduos de aminoácidos que não puderam ser determinados. Porém, semelhante a lectina de sementes de *P. platycephala*, a aglutinina de *Castanea crenata* (Leguminosae) apresenta um resíduo de metionina acetilado na extremidade N-terminal (NOMURA *et al.*, 2000), a lectina de rizomas de *Calystegia sepium* (Convolvulaceae) possui uma metionina bloqueada na porção N-terminal (VAN DAMME *et al.*, 1996), e a KM<sup>+</sup>, uma lectina de *Artocarpus integrifolia* (Moraceae) que



se liga a manose, contêm um resíduo de alanina acetilado na extremidade N-terminal (ROSA *et al.*, 1999).

O domínio Pk2 da lectina de *P.platycephala* possui um resíduo de cisteína na posição 199. Resíduos de cisteína são raros nas seqüências primárias de lectinas relacionadas a jacalina. A lectina Heltuba (*Helianthus tuberosus*, Asteraceae) de tubérculos de alcachofra de Jerusalém, específica por manose, contêm um resíduo de cisteína na posição 40 no início da cadeia  $\beta$ 4 (VAN DAMME *et al.*, 1999), e o N-terminal do domínio  $\beta$  prisma da aglutinina de castanha japonesa também possui uma cisteína no meio da cadeia  $\beta$ 4 (NOMURA *et al.*, 2000). Na lectina de *P.platycephala* a Cys 199 é predita residir na curva de ligação da estrutura  $\beta$ 4 e $\beta$ 5. Desta forma, a posição do resíduo de cisteína não é conservada na topologia  $\beta$  prisma. Na estrutura cristalográfica da lectina de *H.tuberosus* (BOURNE *et al.*, 1999) e, provavelmente, também na aglutinina de *C.crenata*, cuja seqüência de aminoácidos foi recentemente estabelecida (NOMURA *et al.*, 2000), o resíduo de cisteína, que está localizado no lado oposto do sítio de ligação a manose, também não é acessível ao solvente. O resíduo de cisteína da lectina de *P.platycephala* não está envolvido na formação de ponte dissulfeto (S-S), pois na presença de iodoacetamida sem agente redutor ela tornou-se alquilada (carboximetilcisteína) e na presença de eosina-5-iodoacetamida na ausência de agentes desnaturantes, apresentou uma banda fluorescente em PAGE/SDS, indicando que o grupo tiol está exposto ao solvente, ou seja, está livre.

Embora representadas por um restrito grupo de lectinas pertencentes a um pequeno gênero da família Moraceae, as lectinas relacionadas a jacalina são encontradas também em famílias que não se relacionam taxonomicamente, incluindo dicotiledôneas (Convolvulaceae, Asteraceae e Fagaceae) e monocotiledôneas (Gramineae e Musaceae). Os resultados mostram que uma lectina de sementes de um representante da sub-família Mimosoideae, o mais primitivo grupo dentro das plantas leguminosas (HEYWOOD, 1971), também pertence ao grupo de lectinas relacionadas a jacalina, indicando que a estrutura  $\beta$  prisma representa uma armação tridimensional muito difundida entre as plantas superiores. Todavia, as lectinas relacionadas a jacalina podem ser subdivididas em dois diferentes subgrupos, o tão conhecido subgrupo com especificidade por galactose, constituído por jacalina e por outras lectinas de Moraceae e o pequeno subgrupo de lectinas que se ligam a manose que ocorrem em diferentes famílias de plantas. As lectinas do primeiro subgrupo, a jacalina e aglutinina MPA de "Osage



orange” (*Machura pomifera*) (LEE *et al.*, 1998), contêm subunidades de duas cadeias dentro de um fragmento de  $\beta$  prisma. O processamento proteolítico de pro-proteínas gera uma Gly 1 no N-terminal através da qual o seu grupo amino intermedia uma ponte de hidrogênio com o O4 axial da galactose que é responsável pela especificidade de ligação da jacalina e da MPA à galactose. Contrastando, o subgrupo específico por manose das lectinas relacionadas a jacalina consiste de uma única cadeia polipeptídica na estrutura funcional do  $\beta$  prisma. A conformação do sítio de ligação à manose na estrutura cristalográfica da alcachofra de jerusalém (*H. tuberosus*) é mantida pela presença de seqüência específica de resíduos de aminoácidos que ocorrem entre  $\beta 1$  e  $\beta 2$  e são resíduos chave na ligação a manose. Estes resíduos são ausentes em lectinas relacionadas a jacalina que se ligam a galactose. Especificamente, o resíduo Gly 18 está localizado na alça (“loop”) acopladora entre  $\beta 1$  e  $\beta 2$  e estabelece uma ponte de hidrogênio com o átomo O3 e interações de Van der Waals com o O4 equatorial, conferindo assim, especificidade por manose. Este resíduo é conservado em todos os três domínios relacionados a jacalina na lectina de *P.platycephala* (G<sup>16</sup>, G<sup>164</sup>, G<sup>311</sup> em Pk1, Pk2 e Pk3, respectivamente, FIGURA 11), o que também indica que eles compartilham caráter estrutural e funcional com o subgrupo manose-específico de lectinas relacionadas a jacalina. Todavia, outras cadeias laterais de aminoácidos que interagem com resíduos de manose na estrutura cristalográfica da lectina de *H.tuberosus* são muito variáveis entre lectinas relacionadas a jacalina e não são absolutamente conservadas nas três repetições da estrutura da lectina de *P.platycephala*. Na estrutura primária da lectina de *H. tuberosus* estes resíduos são Gly<sup>135</sup>, Asp<sup>136</sup>, Val<sup>137</sup> e Asp<sup>139</sup> que pertencem à superfície exposta da curva  $\beta 11$ - $\beta 12$  e criam uma rede de pontes de hidrogênio com o O6, O5 e O4 dos grupos hidroxila da manose, e Met<sup>92</sup> da curva  $\beta 7$ - $\beta 8$  que empilha contra a face B do anel de piranose (BOURNE *et al.*, 1999). Os resíduos topologicamente equivalentes nas repetições na lectina de *P.platycephala* são marcados com \* na FIGURA 11. Três dos quatro resíduos da lectina de *H. tuberosus* que se ligam a manose são conservados apenas no terceiro domínio  $\beta$  prisma da lectina de *P.platycephala*. Estes resíduos são Gly<sup>431</sup>, Asp<sup>432</sup> e Asp<sup>435</sup>. Além disso, a Phe<sup>384</sup> parece ser um bom candidato para mediar o acúmulo de interações com a face B da manose. Embora a estequiometria da ligação ao açúcar esteja estabelecida, ainda é obscuro se todos os três domínios estruturais  $\beta$  prisma relacionados a jacalina de *P.platycephala* fazem ligação com carboidratos. Os resíduos marcados com asteriscos que se ligam a



manose de Pk1 e Pk2 dos domínios  $\beta$  prisma são conservados na estrutura da lectina manose específica de *C.sepium*. Portanto a lectina de *P.platycephala* pode ser considerada como um mosaico protéico composto de dois domínios da jacalina-like *C.sepium* seguido por um domínio de outra jacalina-like *H. tuberosus*. A medida de RPS (Ressonância Plasmônica de Superfície) tem demonstrado que a lectina de *H.tuberosus* reage especificamente com manose, oligomanosídeos e glicanos com alto teor de manose, e que  $\text{Man}\alpha 1\text{-}2\text{Man}$  e  $\text{Man}\alpha 1\text{-}3\text{Man}$  são excelentes inibidores. A estrutura cristalográfica da lectina no complexo com estes dois dimanosídeos, demonstrou que o sítio de ligação a carboidratos da lectina de *H.tuberosus* não pode acomodar mais que duas unidades de açúcar (BOURNE *et al.*, 1999). Entretanto, a forte inibição da lectina de *P.platycephala* com glicoproteínas foi realizada com  $\text{Man}\alpha 1\text{-}6\text{Man}$  e  $\text{Man}\alpha 1\text{-}6\text{Man}(\text{Man}\alpha 1\text{-}3)\text{Man}$  (RAMOS *et al.*, 1999). Isto indica claramente que existem diferenças estruturais sutis entre os sítios de reconhecimento de açúcar das duas lectinas.

O equilíbrio de sedimentação por ultracentrifugação analítica indicou que a lectina de *P.platycephala* ocorre como um dímero nas soluções na faixa de pH 4,5 – 8,5. Todavia, nenhuma orientação relativa dos três domínios  $\beta$  prisma do monômero da lectina de *P.platycephala*, nem a topologia dos seis prováveis sítios de ligação a manose, em comparação com a lectina de *H.tuberosus*, na estrutura quaternária da lectina são ainda conhecidas. Ainda existem questões abertas a respeito de cada domínio  $\beta$  prisma possuírem um sítio equivalente de ligação a manose que se liga independentemente ao açúcar e de sítios de ligação a carboidratos adicionais ou estendidos serem produzidos por associações de domínios terciários ou quaternários. Evidentemente, são necessárias estruturas tridimensionais de complexos lectina-carboidratos para estabelecer definitivamente os determinantes de reconhecimento a carboidrato do domínio triplo da lectina de *P.platycephala*. Para finalizar, obtemos cristais da lectina nativa de *P. platycephala* que tem uma difração na resolução de 2,5Å. Os dados processados inicialmente indicaram que a estrutura cristalográfica da lectina de *P.platycephala* pode ser esclarecida por substituição molecular usando a estrutura  $\beta$  prisma da lectina de *H.tuberosus*.

O papel das lectinas manose específicas relacionadas a jacalina é ainda pouco entendido. Sugere-se que a expressão da especificidade de ligação a manose, um açúcar constituinte de glicoproteínas na superfície de vírus, bactérias e fungos, pode refletir na

função das lectinas constitutivas de plantas como proteína de estocagem com papel de defesa potencial contra herbívoros e patógenos (VAN DAMME *et al.*, 1998). Outras funções de defesa têm sido detectadas na lectina de *Galanthus nivalis* (GNA) que, em plantas transgênicas expressou o seu gene demonstrando acentuada resistência contra insetos sugadores e *in vitro* apresentou-se como um potente inibidor de retrovírus. A ampla distribuição de proteínas que se ligam a manose entre plantas superiores sugere que o reconhecimento e ligação a glicanos que contêm manose são de grande importância biológica. Além disso, existe grande importância no eficiente sistema de reconhecimento a manose pelo fato das plantas superiores terem desenvolvido pelo menos três motivos (motifs) estruturalmente diferentes para reconhecer este açúcar: o  $\beta$  sanduíche de algumas lectinas de leguminosas, o  $\beta$  barril de lectinas que se ligam a manose de monocotiledôneas e o  $\beta$  prisma do subgrupo de lectinas manose específica de lectinas relacionadas a jacalina (BOURNE *et al.*, 1999). A percepção do aumento do número de lectinas de plantas de famílias não relacionadas taxonomicamente que compartilham um domínio estrutural encontrado em proteínas reguladas por sinais em resposta a reguladores de baixa massa molecular tais como jasmonato, ácido siálico, etileno ou a condições ambientais, isto é, estresse salino (REYMOND & FARMER, 1998) e a demonstração de uma lectina que se liga a manose relacionada a jacalina em arroz submetido a estresse salino reforçam a hipótese de um ancestral comum do tipo  $\beta$  prisma entre lectinas relacionadas a jacalina e em proteínas induzidas por estresse. Este fato também realça a provável importância de interações lectina-carboidratos em mecanismos de defesa de plantas contra agressões abióticas (meio ambiente) e bióticas (patógenos e herbívoros).



## 6. CONCLUSÃO

O presente trabalho descreve, de forma pioneira e inédita, o estabelecimento da primeira estrutura primária e os estudos cristalográficos preliminares de uma lectina (de sementes de *Parkia platycephala*) de leguminosa da sub-família Mimosoideae. O estabelecimento desta estrutura mostrou, também de forma inédita, que esta lectina apresenta homologia de seqüência com as lectinas de *Calystegia sepium* e *Helianthus tuberosus* (família das lectinas relacionadas a jacalina), embora apresentando somente 3 domínios repetitivos homólogos

## 7. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

Allen, A.K. (1979). A lectin from the exudate of the fruit of the vegetable marrow (*Cucurbita pepo*) that has a specificity for beta-1,4-linked N-acetylglucosamine oligosaccharides. **Biochem. J.**, 183(1): 133-137.

Altschul, S. F., Madden, T. L. , Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res**, 25: 3389-3402.

Anantharam, V., Patanjali, S. R., Swamy, M. J., Sanadi, A.R., Goldstein, I. J., Surolia, A. (1986) Isolation, macromolecular properties, and combining site of a chito-oligosaccharide-specific lectin from the exudate of ridge gourd (*Luffa acutangula*). **J. Biol. Chem.**, 261(31): 14621-14627.

Andersen, N. H., Cao, B., Rodriguez-Romero, A. & Arreguin. B. (1993) Hevein: NMR assignment and assessment of solution-state folding for the agglutinin-toxic motif. **Biochem.**, 32: 1407-1422.

Anumula, K. R. & Taylor, P. B. (1991) Rapid characterization of asparagine-linked oligosaccharides isolated from glycoproteins using a carbohydrate analyzer. **Eur. J. Biochem.**, 195: 269-280.

Balzarini, J., Neyts, J., Schols, D., Hosoya, M., Van Damme, E., Peumans, W. & De Clercq, E. (1992). The mannose-specific plant lectins from *Cymbidium hybrid* and *Epipactis helleborine* and the (N-acetylglucosamine)<sub>n</sub>-specific plant lectin from *Urtica dioica* are potent and selective inhibitors of human immunodeficiency virus and cytomegalovirus replication in vitro. **Antiviral Res.**, 18(2): 191-207.



- Barbieri, L., Batelli, G. B. & Stirpe, F. (1993) Ribosome-inactivating protein of plants. **Biochem. Biophys. Acta.**, 1154: 237-282.
- Becker, J. W., Reeke, G. N., Wang, J. L., Cunningham, B. A., & Edelman, G. M. (1975) The covalent structure of Concanavalin A III. Structure of the monomer and its interactions with metals and saccharides. **J. Biochem.**, 250: 1513-1524.
- Beintema, J.J. & Peumans, W.J. (1992). The primary structure of stinging nettle (*Urtica dioica*) agglutinin. A two-domain member of the hevein family, **FEBS Letters**, 299 (2): 131-134
- Biemann, K. (1990) Sequencing of peptides by tandem mass spectrometry and high-energy collision-induced dissociation. **Methods Enzymol.**, 193: 455-479.
- Bomfim, L. R. **Caracterização estrutural de receptores da lectina de sementes de *Parkia platycephala* e a correlação com suas atividades biológicas.** (2001) 98p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- Bornstein, P. & Balian, G. (1977) Cleavage at Asn-Gly bonds with hydroxylamine. **Methods Enzymol.**, 47: 132-145.
- Bouckaert, J., Hamelryck, T., Wyns, L. & Loris, R. (1999) Novel structures of plant lectins and their complexes with carbohydrates. **Curr. Op. Struct. Biol.**, 9: 572-577.
- Bourne, Y., Abergel, C., Cambillau, C., Frey, M., Rougé, P. & Fontecilla-Camps, J. C. (1990) X-ray crystal structure determination and refinement at 1.9Å resolution of isolectin I from the seeds of *Lathyrus ochrus*. **J. Mol. Biol.**, 214: 571-584.

Bourne, Y., Mazurier, J., Legrand, D., Rougé, P., Montreuil, J., Spik, G. & Cambillau, C. (1994). Structures of a legume lectin complexed with the human lactotransferrin N2 fragment, and with an isolated biantennary glycopeptide: role of the fucose moiety. **Structure**, 2(3): 209-219.

Bourne, Y., Zamboni, V., Barre, A., Peumans, W. J., Van Damme, E. J. M., & Rougé, P. (1999) *Helianthus tuberosus* lectin reveals a widespread scaffold for mannose-binding lectins. **Structure**, 7: 1473-1482.

Bradford, M. M. (1976) A rapid sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of proteins-dye binding. **Anal. Biochem.**, 72: 248-254.

Brenan, J. P. M.m (1967) Flora of tropical East Africa, Leguminosae subfamily Mimosoideae. **Crow Agents**, London.

Burkart, A. (1979) **Leguminosas**. In: P. R. Reitz, Flora Ilustrada Catarinense. Itajaí-SC. Parte I, (Legu) 304pp.

Carvalho, J. H. & Ramos G. M. (1982) Composição química e digestibilidade *in vitro* de vagens de faveira (*Parkia platycephala* Benth) Pesquisa em andamento nº 23, **Embrapa**, Teresina, Brasil.

Cavada, B. S. (1980) Lectinas de *Canavalia brasiliensis* Mart. **Isolamento, Caracterização Parcial e Comportamento durante a germinação**. Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 87pp.



Cavada, B. S., Madeira, S. V. F., Calvete, J. J., Sousa, L. A. G., Bomfim, L. R., Dantas, A. R., Lopes, M. C., Grangeiro, T. B., Freitas, B. T., Pinto, V. P. T., Leite, K. B. & Ramos, M. V. (2000) Purification, chemical and immunochemical properties of a new lectin from *Mimosoideae* (*Parkia discolor*) **Prep. Biochem. Biotech.**, 30: 271-280.

Cavada, B. S., Moreira-Silva, L. I. M., Grangeiro, T. B., Santos, C. F., Pinto, V. P. T., Barral-Neto, M., Roque-Barreira, M. C., Gomes, J. C., Martins, J. L., Oliveira, J. T. A. & Moreira, R. A. (1996) Purification and biological properties of a lectin from *Canavalia bonariensis* Lind. Seeds. In: **Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**. (Eds. Van Driessche, E., Fisher, J., Jeeckmans, S. & Bog-Hansen, T. C.) Textop, Hellerup-Denmark, 11: 74-80.

Cavada, B. S., Santos, C. F., Grangeiro, T. B., Moreira da Silva, L. I. M., Campos, M. J. O. de Sousa, F. A. M. & Calvete, J. J. (1997) Isolation and partial characterization of a lectin from *Parkia platycephala* Benth seeds. **Physiol. Mol. Biol. Plants**, 3: 109-115.

Chandra, N. R., Ramachandraiah, G., Bachhawat, K., Dam, T. K., Surolia, A. & Vijayan, M. (1999) Crystal structure of a dimeric mannose-specific agglutinin from garlic: quaternary association and carbohydrate specificity. **J. Mol. Biol.**, 285: 1157-1168.

Dam, T. K., Cavada, B. S., Grangeiro T. B., Santos, C. F., Ceccato, V. M., de Sousa, F. A. M. Oscarson, S. & Brewer, C. F. (2000) Thermodynamic binding studies of lectins from the Diocleinae subtribe to deoxy analogs of the core trimannoside of asparagine-linked oligosaccharides and differential specificities for complex carbohydrates. **J. Biol. Chem.**, 275: 16119-16126.

Dam, T. K., Cavada, B. S., Grangeiro T. B., Santos, C. F., de Sousa, F. A. M. Oscarson, S. & Brewer, C. F. (1998) Diocleinae lectins are a group of proteins with conserved binding sites for the core trimannoside of asparagine-linked oligosaccharides and differential specificities for complex carbohydrates. **J. Biol. Chem.**, 273: 12082-12088.

Determan, H. **Gel Chromatography**. 2<sup>nd</sup> Ed., Springer-Verlag, New York, 1969.

Elias, T. S. (1974) The genera of Mimosoideae (Leguminosae) in the Southeastern United States. **J. Arn. Arbor.**, 55(1): 67-118.

Fernandes, A. (1991) **Indivíduos/espécies e seu significado biológico**. Fortaleza. UFC. 133pp.

Gabius H.-J., & Gabius S., eds (1997) **Glycoscience Status and Perspectives**. Chapman & Hall, Weinheim, Germany.

Hatakeyama, T., Yamasaki, N., & Funatsu, G. (1986) Identification of the tryptophan residue located at the low affinity saccharide binding site of ricin D. **J. Biochem.** 100: 781-788.

Hester, G., Kaku, H., Goldstein, I. J. & Wright, C. S. (1995) Structure of mannose-specific snowdrop (*Galanthus nivalis*) lectin is representative of a new plant lectin family. **Nat. Struct. Biol.**, 2: 472-479.

Heywood, V. H. (1971) Xxxx. **Chemotaxonomy of the Leguminosae** (Harborne, J. B. & Boulter, D., eds), 1-29. Academic press, London.



Hirabayashi, J. **Introduction to "Lectin"** (1997) Japan: GlyccoWord index, 2002. Disponível em < <http://D:\LectinsThorkild\Glycoword-Lectin-0.htm> > Acesso em: 01 março 2002.

Jancarik, J. & Kim, S. H. (1991) Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. **J. Appl. Crystallogr.**, 24: 409-411.

Jauregui-Adell, J. & Marti, J. (1975) Acid cleavage of the aspartyl-proline bond and the limitations of the reaction. **Anal. Biochem.**, 69: 468-473.

Kaku, H., Van Damme, E.J., Peumans, W.J. & Goldstein, I.J. (1990). Carbohydrate-binding specificity of the daffodil (*Narcissus pseudonarcissus*) and amaryllis (*Hippeastrum hybr.*) bulb lectins. **Arch. of Biochem. and Biophys.**, 279(2): 298-304.

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly to the bacteriophage T<sub>4</sub>. **Nature**, 227: 680-685.

Lee, X., Thompson, A., Zhang, Z., Ton-that, H., Biesterfeldt, J., Ogata, C., Xu, L., Johnston, R. A. Z. & Young, N. M. (1998) Structure of the complex of *Machura pomifera* agglutinin and the T-antigen disaccharide, Gal $\beta$ 1,3GalNAc. **J. Biol. Chem.**, 273: 6312-6318.

Lin, X., Kaul, S., Rounsley, S. D., Shea, T. P., Benito, M. I., Town, C. D., Fujii, C. Y., Mason, T. M., Bowman, C. L., Barnstead, M. E., Feldblyum, T. V., Buell, C. R., Ketchum, K. A., Lee, J. J., Ronning, C. M., Koo, H., Moffat, K. s., Cronin, L. A., Shen, M., VanAken, S. E., Umayam, L., Tallon, L. J., Gill, J. E., Adams, M. D., Carrera, A. J., Creasy, T. H., Goodman, H. M., Somerville, C. R., Copenhaver, G. P., Preuss, D., Nierman, W. C., White, O., Eisen, J. A., Salzberg, S. L., Fraser, C. M. & Venter, J. C. (1999) Sequence and analysis of chromosome 2 of the plant *Arabidopsis thaliana*. **Nature**, 402: 761-768.

Moreira, R. A., Cavada, B. S. (1984) Lectin from *Canavalia brasiliensis* Mart. Isolation, characterization and behavior during maturation. **Biol. Plant.**, 26: 113-120.

Murzin, A. G., Lesk, A. M. & Chotia, C. (1992)  $\beta$ -trefoil fold: patterns of structure and sequence in the Kunitz inhibitors, interleukins- 1- $\beta$  and 1- $\alpha$  and fibroblast growth factors. **J. Mol. Biol.**, 223: 531-543.

Nomura, K., Nakamura, S., Fujitake, M. & Nakanishi, T. (2000) Complete amino acid sequence of Japanese chesnut agglutinin. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 276: 23-28.

Oliveira, J. T. A., Cavada, B. S. & Moreira, R. A. (1991) Isolation and partial characterization of a lectin from *Cratylia floribunda* Mart. Seeds. **Rev. Bras. Botânica.**, 14: 61-66.

Peumans, W. J., Barre, A., Hao, Q., Rougé, P. & Van Damme, E. J. M. (2000b) Higher plants developed structurally different motifs to recognize foreign glycans. **Trends in Glycoscience and Glycotech.**, 12(64): 83-101.

Peumans, W. J., Zhang, W., Barre, A., Houlos-Astoul, C., Balint-Kurti, P., Rovira, P., Rougé, P., May, G. D., Van Leuven, F., Truffa-Bachi, P. & Van Damme, E. J. M. (2000a) Fruit-specific lectins from banana and plantain. **Planta** 211: 546-554.

Peumans, W.J., De Ley, M., Broekaert, W.F. (1984). An unusual lectin from stinging nettle (*Urtica dioica*) rhizomes. **FEBS Lett.**, 177: 99-103.

Peumans, W.J., De Ley, M., Broekaert, W.F. (1985). Isolation and partial characterization of a new lectin from seeds of the greater celandine (*Chelidonium majus*). **Plant Physiol.**, 78: 379-383.



Peumans, W.J., Winter, H.C., Bemer, V., Van Leuven, F., Goldstein, I.J., Truffa-Bachi, P. & Van Damme, E.J. (1997). Isolation of a novel plant lectin with an unusual specificity from *Calystegia sepium*. **Glycoconjugate J.**, 14(2): 259-265.

Peumans, W.J. & Van Damme, E.J. (1995) Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiol.**, 109: 347-352.

Polhill, R. M., Raven, P. H., Stirton, C. H. (1981) Evolution and sistematics of the Leguminosae. In: Polhill & Raven Eds: **Advances in Legume Sistematics**. Richmond, England, I: 425pp.

Potter, E., Beator, J. & Kloppstech, K. (1996) The expression of mRNAs for light-stress proteins in barley: inverse relationship of mRNA levels of individual genes within the leaf gradient. **Planta**, 1999: 314-320.

Rahbé, Y., Sauvion, N., Febvay G., Peumans, W.J., Gatehouse A.M.R. (1995). Toxicity of lectins and processing of ingested proteins in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. **Entomol. Exp. Appl.**, 76: 143-155.

Raikhel, N. V., Lee, H. I. & Broekaert, W. F. (1993) Structure and function of chitin-binding proteins. **Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.**, 44: 591-615.

Ramos, M. V., Cavada, B. S., Bomfim, L. R., Debray, H., Mazard, A. -M., Campos, M. J. O., Calvete, J. J., Grangeiro, T. B. & Rougé, P. (1999) Interaction of the seed lectin from *Parkia platycephala* (Mimosoideae) with carbohydrates and complex glicans. **Prot. Pept. Lett.**, 6: 215-222.

Ramos, M. V., Sampaio, A. H., Cavada, B. S., Calvete, J. J., Grangeiro, T. B., Debray, H. (2001) Characterization of the sugar-binding specificity of the toxic lectins isolated from *Abrus pulchellus* seeds. **Glycoconjugate J.**, 18: 391-400.

Reymond, P & Farmer, E. E. (1998) Jasmonate and salicylate as global signals for defence gene expression. **Curr. Op. Plant Biol.**, 1: 404-411.

Richardson, M., Campos, F. D. A. P., Moreira, R. A., Ainouz, I. L., Begbie, R., Watt, W. B. & Pusztai, A. (1984). The complete amino acid sequence of the major subunit of the lectin from the seeds of *Dioclea graniflora* Mart. **Eur. J. Biochem.**, 144: 101-111.

Rinderle, S.J., Goldstein, I.J., Matta, K.L., Ratcliffe, R.M. (1989). Isolation and characterization of amaranthin, a lectin present in the seeds of *Amaranthus caudatus*, that recognizes the T- (or cryptic T)-antigen, **The J. of Biol. Chem.**, 264(27): 16123-16131

Roepstorff, P. & Fohlman, J. (1984) Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. **Biomed Mass Spectrom.**, 11: 601.

Rosa, J.C., De Oliveira, P.S., Garratt, R., Beltramini, L., Resing, K., Roque-Barreira, M.C. & Greene, L.J. (1999). KM+, a mannose-binding lectin from *Artocarpus integrifolia*: amino acid sequence, predicted tertiary structure, carbohydrate recognition, and analysis of the beta-prism fold. **Protein Science**, 8(1): 13-24.

Rüdiger, H. & Schecher, G. (1993) The protein body membrane of soybean seeds as a possible lectin-binding component. **Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**, 8: 101-104.



Rutenber, E. & Robertus, J. D. (1991) Structure of ricin B-chain at 2,5 Å resolution. **Proteins.**, 10: 260-269.

Saito, K., Komae, A., Kakuta, M., van Damme, E.J., Peumans, W.J., Goldstein, I.J. & Misaki, A. (1993). The alpha-mannosyl-binding lectin from leaves of the orchid twayblade (*Listera ovata*). Application to separation of alpha-D-mannans from alpha-D-glucans, **Eur. J. of Biochem.**, 217(2): 677-681.

Santos, C. F., **Purificação e caracterização parcial de uma lectina de sementes de *Parkia platycephala* Benth.** (1992) 123p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

Sankaranarayanan, R., Sekar, K., Banerjee, R., Sharma, V., Surolia, A. & Vijayan, M. (1996) A novel mode of carbohydrate recognition in jacalin, a *Moraceae* plant lectin with a beta-prism fold. **Nat. Struct. Biol.**, 3: 596-603.

Sarkar, M., Wu, A.M. & Kabat, E A (1981). Immunochemical studies on the carbohydrate specificity of *Maclura pomifera* lectin. **Arch. of Biochem. Biophys.** 209(1): 204-218

Sastry, M.V., Banarjee, P., Patanjali, S.R., Swamy, M.J., Swarnalatha, G.V. & Surolia, A. (1986). Analysis of saccharide binding to *Artocarpus integrifolia* lectin reveals specific recognition of T-antigen (beta-D-Gal(1→3)D-GalNAc). **J. Biol. Chem.**, 261(25): 11726-11733

Schecher, G. & Rüdiger, H. (1994) Interaction of the Soybean (*Glycine max*) seed lectin with components of the soybean protein body membrane. **Biol. Chem. Hoppe-Seyler**, 375: 829-832.

Sharma, V., & Surolia, A. (1997) Analysis of carbohydrate recognition by legume lectins: size of the combining site loops and their primary specificity. **J. Mol. Biol.**, 267: 433-445.

Sharon, N. & Lis, H. (1990) Legume lectins – a large family of homologous proteins. **FASEB J.**, 4: 3198-3208.

Shibuya, N., Goldstein, I.J., Van Damme, E.J. & Peumans, W.J. (1998). Binding properties of a mannose-specific lectin from the snowdrop (*Galanthus nivalis*) bulb. **J. Biol. Chem.**, 263(2): 728-734.

Suvachittanont, W. & Peutpaiboon, A.(1992) Lectin from *Parkia speciosa* seeds. **Phytochem.**, 31: 4065-4070.

Transue, T. R., Smith, A. K., Mo, H., Goldstein, I. J. & Saper, M. A. (1997) *Amaranthus* lectin structure at 2.2 Å reveals T-antigen disaccharide bound to β-trefoil domains. **Nat. Struct. Biol.**, 10: 779-783.

Utarabhand, P.& Akkayanont, P.(1995) Purification of a lectin from *Parkia javanica* beans. **Phytochem.**, 38: 281-285.

Van Damme, E. J. M., Barre, A., Mazard, M.A., Verhaert, P. Horman, A., Debray, H., Rougé, P. & Peumans, W. J. (1999) Characterization and molecular cloning of the lectin from *Helianthus tuberosus*. **Eur. J. Biochem.**, 259: 135-142.

Van Damme, E. J. M., Barre, A., Verhaert, P., Rougé, P., & Peumans, W. J. (1996a) Molecular cloning of the mitogenic mannose/maltose specific rhizome lectin from *Calystegia sepium*. **FEBS Lett.**, 397: 352-356.



Van Damme, E. J. M., Peumans, W. J. Barre, A. & Rougé, P. (1998) Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Crit. Ver. Plant Sci.**, 17: 575-692.

Van Damme, E. J., Astoul, C. H., Barre, A., Rougé, P. & Peumans W. J. (2000) Cloning and Characterization of a monocot mannose-binding lectin from *Crocus vernus*. **Eur. J. Biochem.**, 267: 5067-5077.

Van Damme, E.J., Briké, F., Winter, H.C., Van Leuven, F., Goldstein, I.J. & Peumans, W.J. (1996b). Molecular cloning of two different mannose-binding lectins from tulip bulbs. **Eur. J. Biochem.**, 236(2): 419-427.

Van Damme, E.J.M., Allen, A.K., Peumans, W.J. (1987). Isolation and characterization of a lectin with exclusive specificity towards mannose from snowdrop (*Galanthus nivalis*) bulbs. **FEBS Lett.**, 215: 140-144.

Vasconcelos, I. M., Cavada, B. S., Moreira, R. A. & Oliveira, J. T. A. (1991) Purification and partial characterization of a lectin from the seeds of *Dioclea guianensis*. **J. Food Biochem.**, 15: 137-154.

Wah, D. A., Romero, A., Sol, F. Gallego Del, Cavada, B. S., Ramos, M. V., Grangeiro, T. B., Sampaio, A. H. & Calvete, J. J. (2001) Crystal Structure of Native and Cd/Cd-substituted *Dioclea guianensis* Seed Lectin. A novel Manganese-binding Site and Structural Basis of Dimer-tetramer Association. **J. Mol. Biol.** 310: 885-894.

Wenzel, M. & Rüdiger, H. (1995) Interaction of Pea (*Pisum sativum* L.) Lectin with Pea Storage Proteins. **J. Plant Physiol**, 145: 191-194.

Wright, C. S. & Hester, G. (1996) The 2,0 Å structure of a cross-linked complex between snowdrop lectin and a branched mannopentaose: evidence for two unique binding modes. **Structure.**, 4: 1339-1352.

Wright, C. S. (1997) New folds of plant lectin. **Curr. Op. Plant Biol.**, 7: 631-636.

Wright, C. S. (1977) The crystal structure of wheat germ agglutinin at 2,2 Å. **J. Mol. Biol.**, 111: 439-457.

Wright, C.S. (1987). Refinement of the crystal structure of wheat germ agglutinin isolectin 2 at 1.8 Å resolution. **J. Mol. Biol.**, 194(3): 501-529.

Wu, M. A., Lin, S. R. & Chin, L. K. (1992) Defining the Carbohydrate Specificities of *Abrus precatorius* Agglutinin as T (Galβ1→3GalNAc) > I/II (Galβ1→3GalNAc), **J. Biol. Chem.**, 267(27): 19130-19139.

Yamaguchi, K., Mori, A. & Funatsu, G. (1995). The complete amino acid sequence of lectin-C from the roots of pokeweed (*Phytolacca americana*), **Biosc., Biotech., and Biochem.**, 59(7): 1384-1385.

Yamaguchi, K., Mori, A. & Funatsu, G. (1996). Amino acid sequence and some properties of lectin-D from the roots of pokeweed (*Phytolacca americana*), **Biosc., Biotech., and Biochem.**, 60(8): 1380-1382.

Yamaguchi, K., Yurino, N., Kino, M., Ishiguro, M. & Funatsu, G. (1997). The amino acid sequence of mitogenic lectin-B from the roots of pokeweed (*Phytolacca americana*), **Biosc., Biotech., and Biochem.**, 61(4): 690-698.



Yamamoto, K. **Legume Lectins: Structures, Functions and Carbohydrate-binding Specificities**. Japan: Glycoword Index, 2002. Disponível em <<http://D:\LectinsThorkild\Glycoword-Lectin-3.htm>> Acesso em: 01 março 2002.

Yang, H., Czaplak, T. H. (1993). Isolation and characterization of cDNA clones encoding jacalin isolectins, **J. Biol. Chem.**, 268(8): 5905-5910.

Zhang, W., Peumans, W. J., Barre, A., Houles-Astoul, C., Rovira, P., Rougé, P., Proost, P., Truffa-Bacchi, P., Jalali, A. A. H. & Van Damme, E. J. M. (2000) Isolation and characterization of jacalin-related mannose-binding lectin from salt-stressed rice (*Oryza sativa*) plants. **Planta**, 210: 970-978.

## 8. ANEXO (Trabalhos completos publicados)

MANN, K; FARIAS, C M S A; SOL, F Gallego Del; SANTOS, C F; GRANGEIRO, T B; NAGANO, C S; CAVADA, Benildo Sousa; CALVETE, J J. The amino acid sequence of the glucose/mannose-specific lectin isolated from *Parkia platycephala* seeds reveals three tandemly arranged jacalin-related domains. **European Journal of Biochemistry**, Holanda, v. 268, p. 4414-4422, 2001.

SOL, F Gallego Del; MAIQUES, S Ramón; SANTOS, C F; GRANGEIRO, T B; NAGANO, C S; FARIAS, C M S A; CAVADA, Benildo Sousa; CALVETE, J J. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the seed lectin from *Parkia platycephala*. **Acta Crystallographica D**, Dinamarca, v. D58, n. 1, p. 167-169, 2002.



## The amino-acid sequence of the glucose/mannose-specific lectin isolated from *Parkia platycephala* seeds reveals three tandemly arranged jacalin-related domains

Karlheinz Mann<sup>1</sup>, Creuza M. S. A. Farias<sup>2</sup>, Francisca Gallego Del Sol<sup>3</sup>, Claudia F. Santos<sup>4</sup>, Thalles B. Grangeiro<sup>5</sup>, Celso S. Nagano<sup>5</sup>, Benildo S. Cavada<sup>5</sup> and Juan J. Calvete<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, Germany; <sup>2</sup>Universidade de Fortaleza, Fortaleza, Brazil; <sup>3</sup>Instituto de Biomedicina de Valencia, C.S.I.C., Valencia, Spain; <sup>4</sup>Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Brazil; <sup>5</sup>BioMol-Laboratory, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brazil

A mannose/glucose-specific lectin was isolated from seeds of *Parkia platycephala*, the most primitive subfamily of *Leguminosae* plants. The molecular mass of the purified lectin determined by mass spectrometry was  $47\,946 \pm 6$  Da (by electrospray ionization) and  $47\,951 \pm 9$  Da (by matrix-assisted laser-desorption ionization). The apparent molecular mass of the lectin in solutions of pH in the range 4.5–8.5 determined by analytical ultracentrifugation equilibrium sedimentation was  $94 \pm 3$  kDa, showing that the protein behaved as a non-pH-dependent dimer. The amino-acid sequence of the *Parkia* lectin was determined by Edman degradation of overlapping peptides. This is the first report of the primary structure of a *Mimosoideae* lectin. The protein contained a blocked N-terminus and a single, nonglycosylated polypeptide chain composed of three tandemly arranged

homologous domains. Each of these domains shares sequence similarity with jacalin-related lectin monomers from *Asteraceae*, *Convolvulaceae*, *Moraceae*, *Musaceae*, *Gramineae*, and *Fagaceae* plant families. Based on this homology, we predict that each *Parkia* lectin repeat may display a  $\beta$  prism fold similar to that observed in the crystal structure of the lectin from *Helianthus tuberosus*. The *P. platycephala* lectin also shows sequence similarity with stress- and pathogen-upregulated defence genes of a number of different plants, suggesting a common ancestry for jacalin-related lectins and inducible defence proteins.

**Keywords:** *Leguminosae*; *Mimosoideae*; *Parkia platycephala* seed lectin; mass spectrometry;  $\beta$  prism domain.

Lectins are a structurally heterogeneous group of carbohydrate-binding proteins of nonimmune origin comprising distinct families of evolutionarily related proteins [1]. Lectins are ubiquitous in nature and are found in all types of living organisms. Lectins play biological roles in many cellular processes, such as cell communication, host defence, fertilization, development, parasitic infection and tumour metastasis, by deciphering the glyco-codes encoded in the structure of glycans attached to soluble and integral cell membrane glycoconjugates [2].

Mechanisms for sugar recognition have evolved independently in diverse protein frameworks. The structural basis and thermodynamics of selective sugar recognition have been assessed by X-ray crystallographic analysis of a large variety of lectins and their complexes with carbohydrates [3–8] and by isothermal titration calorimetry [9–12]. Although the past few years have witnessed the

elucidation of a variety of novel lectin structures from monocotyledonous (mannose-specific bulb lectins from *Amaryllidaceae*, *Liliaceae*, *Alliaceae*, and *Orchidaceae*) and dicotyledonous plants (GalNAc-specific lectins from *Moraceae* and *Amaranthus* species and mannose/maltose-specific lectins from *Convolvulaceae*) [13–18], the largest and best characterized lectin family is that from seeds of leguminous plants (see the 3D Lectin Database at <http://www.cermav.cnrs.fr/databank/lectine>). Most studies on *Leguminosae* lectins involve members of the *Phaseoleae* tribe of the *Papilionoideae* subfamily, while investigations on lectins of the other two subfamilies, *Caesalpinioideae* and *Mimosoideae*, are scarce. Among the latter subfamily, only the seed lectins from *Parkia speciosa* [19], *Parkia javanica* [20], *Parkia platycephala* [21,22] and *Parkia discolor* [23] have been isolated and biochemically characterized. To date no structural data of any *Mimosoideae* lectin have been reported, and thus, the structural classification of these lectins remains obscure.

*Parkia* (*Leguminosae*, *Mimosoideae*), regarded as the most primitive group within *Leguminosae* plants [24], is a pantropical genus of trees comprising around 30 species found in the neotropics from Honduras to south-eastern Brazil, West Africa, the northern part of Malaysia and the south of Thailand. *P. platycephala* is an important forage tree growing in parts of north-eastern Brazil. The seed lectin from *P. platycephala* belongs to the mannose/glucose-specific group and mannose and oligomannosides with  $\alpha 1-3$  and  $\alpha 1-6$  branch linkages are its best inhibitors [22].

Correspondence to J. J. Calvete, Instituto de Biomedicina de Valencia, C.S.I.C., Jaime Roig 11, 46010 Valencia, Spain.

Fax: + 34 96 3690800, Tel.: + 34 96 3391775,

E-mail: jcalvete@ibv.csic.es or B. S. Cavada, Universidade Federal do Ceará, BioMol-Laboratory, Departamento de Biologia e Biologia

Molecular, Campus do PiCi, CP 6020, 60451-970 Fortaleza, Ceará, Brazil. Fax and Tel.: + 55 85 2889818,

E-mail: benildocavada@eudoramail.com.

Abbreviations: MPA, *Maclura pomifera* agglutinin

(Received 18 May 2001, revised 18 June 2001, accepted 21 June 2001)



The sugar binding specificity of this lectin towards mannose, an abundant building block of surface-exposed glycoconjugates of viruses, bacteria, and fungi, suggests a role for the *P. platycephala* lectin in the defence against plant pathogens [1]. To gain insight into structure–function correlations, we have determined the amino-acid sequence of the *P. platycephala* seed lectin. Our results, which represent the first report of the primary structure of a lectin from *Mimosoideae*, show that *P. platycephala* lectin is a 47.9-kDa single-chain nonglycosylated mosaic protein composed of three tandemly arranged homologous jacalin-related domains with predicted  $\beta$  prism folds. The possible involvement of the lectin in plant defence is discussed.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Purification of *P. platycephala* lectin

Mature seeds from *P. platycephala* were collected in the state of Ceará (northeast of Brazil) and ground in a coffee mill. The flour was defatted with *n*-hexane, air-dried at room temperature, and soluble proteins were extracted overnight at room temperature by continuous stirring with 1 : 50 (w/v) of 50 mM sodium acetate buffer, pH 4.0, containing 150 mM NaCl. Insoluble material was pelleted by centrifugation at 10 000 g at 5 °C for 20 min. The supernatant was fractionated by ammonium sulfate precipitation (40% saturation). The resulting precipitate, recovered by centrifugation at 10 000 g at 4 °C for 20 min, was resuspended in, and dialysed exhaustively against, 50 mM Tris/HCl, pH 8.0, and applied to a Sephadex G100 column (2.5 × 30 cm) equilibrated and developed with the same buffer. Unbound material was eluted by washing with equilibration buffer and the bound lectin was desorbed from the column eluting with equilibration buffer containing 0.1 M D-glucose. The lectin was freed from hapten by dialysis against 1 M acetic acid and then dialysed against 100 mM Tris/HCl, pH 7.6, containing 150 mM NaCl. Insoluble material was removed by centrifugation (as above) and the lectin in the clear supernatant was purified by affinity chromatography on a mannose–agarose column equilibrated with 100 mM Tris/HCl, pH 7.6, containing 150 mM NaCl. Mannose-bound lectin, recovered with running buffer containing 0.1 M D-mannose, was dialysed against MilliQ water and lyophilized. The apparent molecular mass and homogeneity of the purified *P. platycephala* seed lectin was estimated by SDS/PAGE.

### Mass spectrometry

The molecular mass of the purified *P. platycephala* seed lectin was determined by electrospray ionization mass spectrometry using a Sciex API-III LC-MS/MS triple quadrupole instrument. Molecular masses of peptides were determined by MALDI-TOF mass spectrometry using an Applied Biosystems DE-Pro instrument and dihydroxybenzoic acid as matrix, or electrospray ionization mass spectrometry with a PE-Sciex API365 triple quadrupole mass spectrometer. The fragmentation pattern of the C-terminal, cyanogen bromide-derived peptide CB2 was analysed using the MS-PRODUCT tool of the program PROTEINPROSPECTOR v3.4.1 from the UCSF Mass Spectrometry Facility (<http://prospector.ucsf.edu/ucsftml3.4/msprod.htm>).

### Analytical ultracentrifugation

The apparent molecular mass of the *P. platycephala* lectin in solutions of different pH was determined by analytical ultracentrifugation equilibrium sedimentation using a Beckman XL-A centrifuge with UV absorption scanner optics. Experiments were carried out at 20 °C and 13 000 r.p.m. using an AN-50 Ti rotor. The lectin was dissolved at  $\approx 0.1$  mg·mL<sup>-1</sup> in the following buffers, each containing 100 mM NaCl, 10 mM Cl<sub>2</sub>Mn, and 10 mM Cl<sub>2</sub>Ca: 20 mM sodium acetate pH 4.5; 20 mM Mes pH 5.5; 20 mM Mes pH 6.4; 20 mM Hepes pH 7.5, and 20 mM Tris/HCl pH 8.5.

### Compositional analyses

Amino-acid and amino-sugar analyses of intact and reduced and alkylated *P. platycephala* lectin were carried out with a System Gold (Beckman) Amino Acid Analyser after hydrolysis at 110 °C for 24 h with 6 M HCl and for 4 h with 4 M HCl, respectively, in sealed and evacuated ampoules. For neutral sugar and sialic acid determinations, samples of 1 mg of the *P. platycephala* lectin were hydrolysed with 2 M HCl for 2 h at 110 °C, and 0.2 M trifluoroacetic acid for 1 h at 80 °C, respectively. After drying the hydrolysates in a SpeedVac (Savant, Germany), monosaccharides were analysed on a CarboPac PA1 column (4 × 250 mm) eluting at 1 mL·min<sup>-1</sup> with either 16 mM NaOH (for neutral sugars) or with 20 mM NaOH in 60 mM sodium acetate (for sialic acid), using a Dionex DX-300 analyser equipped with pulsed amperometric detector and the AI-450 chromatographic software [25].

### Amino-acid sequence determination

The primary structure of the lectin *P. platycephala* seed lectin was established by N-terminal sequence analysis (using Applied Biosystems sequencers models 473A and 492) of overlapping peptides generated by chemical and proteolytic cleavages. The protein (1–5 mg) was dissolved in 200  $\mu$ L of 100 mM Tris/HCl buffer, pH 8.5, containing 6 M guanidinium hydrochloride and reduced at 50 °C for 2 h by addition of 10  $\mu$ L of mercaptoethanol. The solution was cooled to room temperature, alkylated with 20  $\mu$ L of vinylpyridine for 2 h in the dark, dialysed against 200 mM ammonium hydrogen carbonate and lyophilized.

For cleavage of Met–Xaa bonds, a small crystal of CNBr was added to the protein solution ( $\approx 10$  mg·mL<sup>-1</sup> in 70% formic acid) and the mixture was incubated at 23 °C for 24 h in the dark. Cleavages at Asn–Gly and Asp–Pro bonds with hydroxylamine and diluted acid, respectively, were performed as described previously [26,27].

Proteolytic cleavages were performed at an enzyme to substrate ratio of 1 : 100 at 23 °C or 37 °C. Degradation with pepsin (Sigma, Deisenhofen, Germany) was performed in 5% acetic acid for 6 h. Cleavages with lysyl endopeptidase (Lys-C from *Achromobacter lyticus*; WAKO Chemicals GmbH, Neuss, Germany), and thermolysin (Merck, Darmstadt, Germany) were performed in 0.1 M ammonium hydrogen carbonate containing 4 M urea for 16 h and 8 h, respectively. Endoproteinase Glu-C and endoproteinase Asp-N (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) cleavages were performed in 0.1 M



ammonium hydrogen carbonate, containing 2 M urea for 16 h. Endoproteinase Arg-C (Roche) proteolysis was performed in 0.1 M ammonium hydrogen carbonate, containing 4 M urea, 1 mM dithiothreitol and 5 mM CaCl<sub>2</sub> for 16 h. Cleavages with *N*- $\alpha$ -tosyl-L-phenylalanylchloromethane/trypsin and  $\alpha$ -chymotrypsin (Sigma) were performed in 0.1 M ammonium hydrogen carbonate for 18 h. Enzymatic reactions were terminated by adjusting the pH of the reaction mixture to pH  $\approx$  8 with 2 M ammonium hydrogen carbonate (pepsin) or to pH  $\approx$  1 with trifluoroacetic acid (all other enzymes) and drying under a stream of nitrogen. The reaction products were resuspended in the respective starting buffer for chromatographic separation (see below) and centrifuged in an Eppendorf bench top centrifuge. Insoluble fragments were dissolved in 70% formic acid and sequenced by Edman degradation. Selected starting buffer-insoluble fragments were further cleaved with one of the methods described above.

Peptides were separated by size-exclusion chromatography with Superose 12 (HR 10/30, Amersham-Pharmacia, Freiburg, Germany) or Superdex Peptide (HR 10/30, Amersham Pharmacia) columns in 0.1% trifluoroacetic acid containing 25% acetonitrile at a flow rate of 0.3 mL·min<sup>-1</sup>, and/or by reverse-phase HPLC using (a) a 250  $\times$  4 mm Nucleosil 100-5 C18 PPN column (Macherey-Nagel) eluting at 1 mL·min<sup>-1</sup> with a mixture of 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid in water (solution A) and acetonitrile (solution B), first isocratically (10% B) for 5 min, followed by 10–20% B for 5 min, 20–40% for 60 min, and 40–70% B for 15 min, or (b) a 250  $\times$  3 mm Vydac C18 column eluting at 0.25 mL·min<sup>-1</sup> with a linear gradient of 3–42% B. Detection was performed at 220 or 214 nm and peaks were collected manually.

Amino-acid sequence similarity searches were performed with BLASTP 2.0.5 [28] at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

#### Determination of sulfhydryl groups and disulfide bonds

For quantitation of free cysteine residues and disulfide bonds, the protein (2–5 mg·mL<sup>-1</sup> in 100 mM Tris/HCl, pH 8.6, containing 1 mM EDTA and 6 M guanidinium hydrochloride) was denatured at 80 °C for 30 min, cooled at room temperature, and incubated with either 10 mM iodoacetamide for 1 h at room temperature, or with 1% 2-mercaptoethanol for 2 min at 100 °C, followed by addition of a 2.5-fold molar excess of iodoacetamide over reducing agent and incubated for 1 h at room temperature. The samples were dialysed exhaustively against water, lyophilized, hydrolysed in 6 M HCl at 110 °C for 24 h, and subjected to amino-acid analysis. Alternatively, the *Parkia* lectin (in 10 mM Tris/HCl, 100 mM sodium phosphate, pH 8.0) was incubated for 30 min at room temperature with a fivefold molar excess of the fluorescent thiol-reactive probe eosin-5-iodoacetamide (Molecular Probes Inc.), and analysed by SDS/PAGE. Fluorescent protein bands were visualized using a UV lamp and photographed before Coomassie blue staining.

#### Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis

The sparse matrix method [29] using the crystal screen formulations supplied by Hampton Research (CA, USA) was utilized to perform initial screening of the crystallization

conditions. Crystals were grown at 22 °C by the vapour-diffusion method using hanging drops composed of equal volumes of protein solution ( $\approx$  2–4 mg·mL<sup>-1</sup> in 50 mM Hepes/Na, pH 8) and reservoir buffer (100 mM Hepes/Na, pH 7.5, 10% isopropanol and 20% polyethylene glycol 4000). X-ray diffraction data were collected on a SMART CCD detector mounted on a Bruker AXS X-ray generator operated at 50 kV and 90 mm, using cross-coupled Göbel mirror-monochromatized Cu K $\alpha$  radiation from a rotating anode. Diffraction data were collected as a series of discrete frames (0.3° oscillation; exposure time of 80 s) at a crystal to detector distance of 700 mm. The data were indexed, integrated and scaled using SMART, SAINT and PROSCALE.

## RESULTS

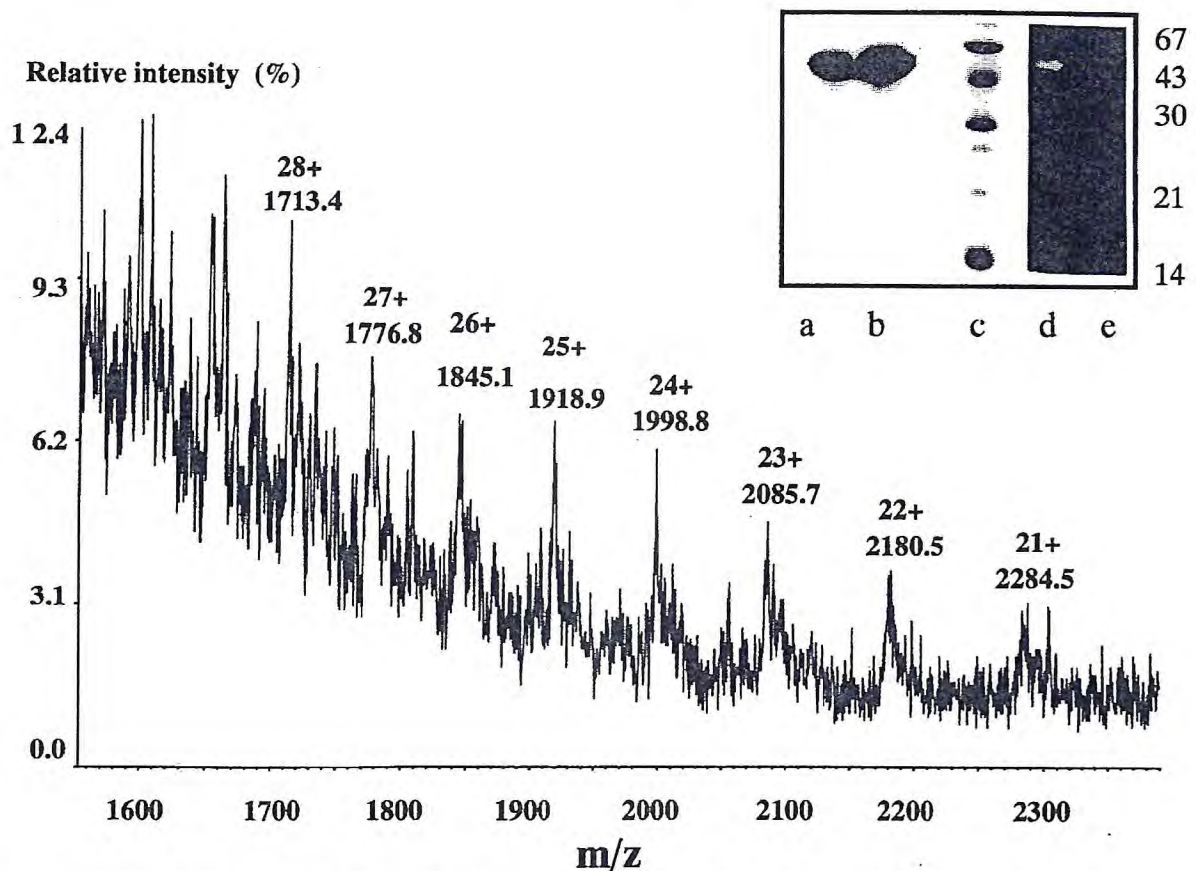
### The quaternary structure of *P. platycephala* lectin

The mannose/glucose-specific lectin purified from *P. platycephala* seeds migrated as a single electrophoretic band of apparent molecular mass of 50 kDa in SDS/PAGE (Fig. 1, insert). The molecular mass of the *Parkia* lectin, determined by ESI and MALDI-TOF mass spectrometry, was 47 946  $\pm$  6 Da (Fig. 1) and 47 951  $\pm$  9 Da, respectively. No low molecular mass peptide was detected in different lectin preparations, indicating that the *Parkia* lectin was composed of a single polypeptide chain. The apparent molecular mass of the lectin in solutions of different pH in the range 4.5–8.5 was 94  $\pm$  3 kDa as determined by analytical ultracentrifugation equilibrium sedimentation at 20 °C. The results clearly indicated that the *P. platycephala* lectin behaved as a non-pH-dependent dimer.

### The amino-acid sequence of *P. platycephala* lectin

Carbohydrate analyses did not show the presence of amino sugars (glucosamine, galactosamine), neutral sugars (mannose, galactose, fucose) or sialic acid, strongly indicating that the protein was not glycosylated. N-Terminal sequence analysis indicated that the lectin contained a blocked N-terminus. A polypeptide stretch comprising 447 residues was assembled from internal overlapping amino-acid sequences obtained from HPLC-isolated peptides generated by chemical and proteolytic degradations (Fig. 2). Sequence heterogeneity was found in three positions, (I/V)70, (K/R)227, and (D/N)296. All three are conservative substitutions and indicated that the *Parkia* lectin preparation contained highly homologous isolectins. Following cyanogen bromide cleavage of the intact or reduced and carboxymethylated lectin and reverse-phase HPLC separation of the generated peptides, the N-terminal fragment (SLKGM) and the C-terminal peptide CB2 of the sequence shown in Fig. 2 were characterized, respectively, by MS/MS and MALDI-TOF. The MALDI-TOF mass spectrum of CB2 ( $M + H^+ = 2618.3$  Da) was 99.5 Da greater than calculated from its amino-acid sequence determined by Edman degradation (VVGFGHGRAGDYLDIAIGIFVKPD<sub>TA</sub>, calculated  $M = 2518.8$  Da). This result clearly indicated the presence of an additional Val at the C-terminus of CB2 not detected by N-terminal sequencing. The ( $M + 3H$ )<sup>3+</sup> ion of CB2 ( $m/z = 873.6$ ) was subjected to MS/MS analysis and





**Fig. 1.** Electrospray ionization mass spectrum of *P. platycephala* seed lectin. From the series of ions  $(M + 21H)^{21+}$  to  $(M + 28H)^{28+}$  an isotope-averaged molecular mass of  $47946 \pm 6$  Da was calculated. Insert, lanes a and b, SDS/PAGE (7% acrylamide) of the purified *P. platycephala* lectin. Lane c, molecular mass markers, from top to bottom: bovine serum albumin, chicken egg ovalbumin, carbonic anhydrase, soybean trypsin inhibitor, and lysozyme. Molecular masses are indicated at the right. Lane d, UV detection of fluorescent label in SDS/PAGE of *P. platycephala* lectin after incubation with eosin-5-iodoacetamide. Lane e, the *Parkia* lectin was incubated with iodoacetamide before treatment with eosin-5-iodoacetamide.

the fragmentation spectrum yielded C-terminal y-ions and N-terminal b-ions, according to the standard nomenclature [30,31], that confirmed the structure of the peptide.

Attempts to deblock the protein with acid according to published deacetylation and deformylation protocols were unsuccessful because of massive internal cleavage leading to Edman cycles, which could not be interpreted. Treatment of the protein with pyroglutamate aminopeptidase did not yield a free N-terminus. A fragment containing the blocked N-terminus of the *Parkia* lectin was not found, however, suggesting that it could be too hydrophobic to elute from the reverse-phase column.

The *Parkia* lectin contains a single cysteine residue at position 199 (Fig. 2). In agreement with the sequencing result, 0.89 mol cysteine per mole of lectin were quantitated by amino-acid analysis. However, cysteine was quantitatively recovered as the carboxymethylcysteine derivatives in hydrolysates of the lectin, which had been previously incubated under denaturing but nonreducing conditions with iodoacetamide. Moreover, when the lectin was incubated with eosin-5-iodoacetamide, a thiol-specific fluorescent probe, a fluorescent band was observed by SDS/PAGE (Fig. 1, insert). No fluorescent label was incorporated by previous treatment with iodoacetamide. These results, along

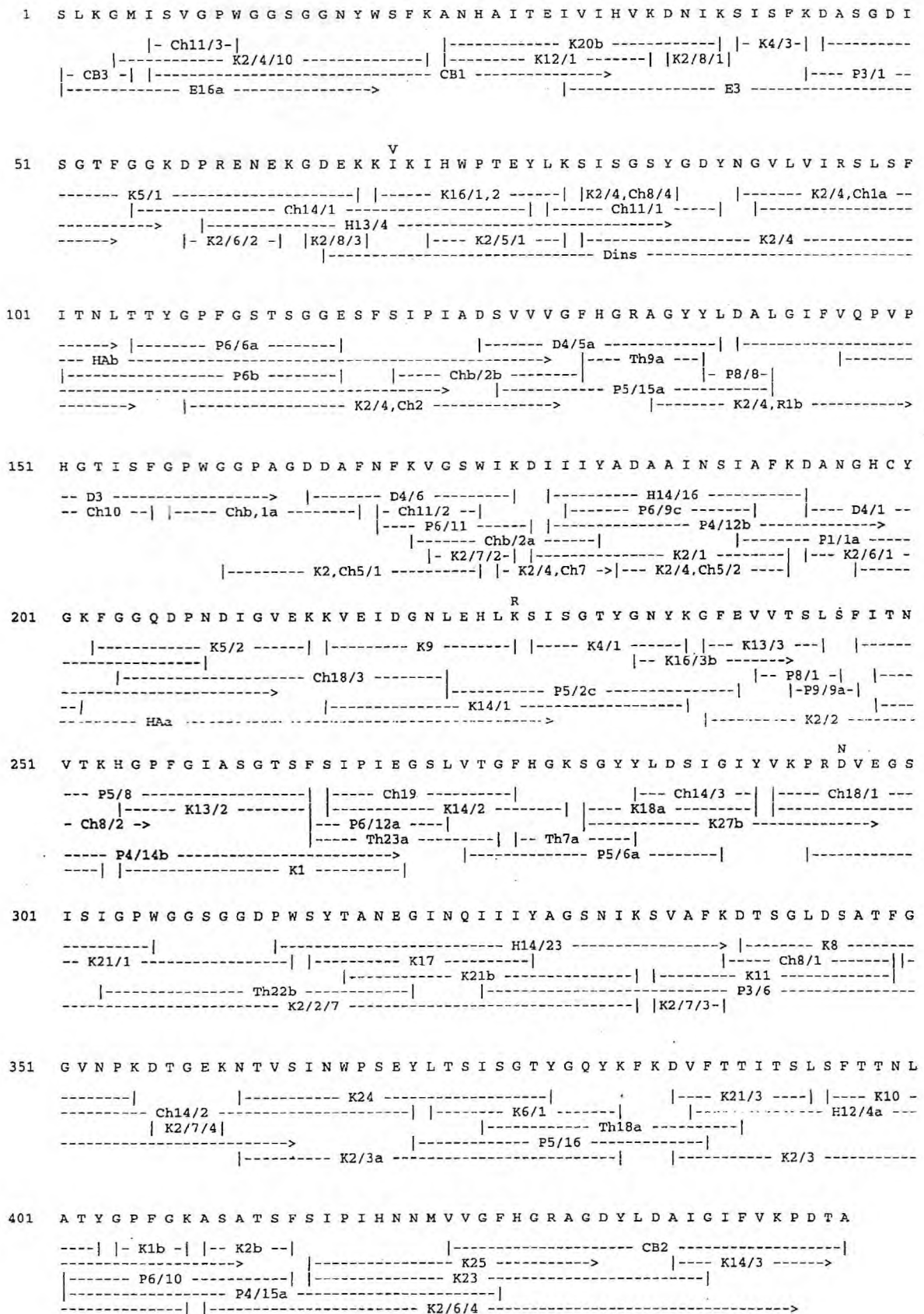
with the observation that the apparent electrophoretic mobility of the lectin was the same in the presence and in the absence of reducing reagent, clearly showed that the single cysteine residue was not involved in the formation of a disulfide bond.

The calculated isotope-averaged mass of the 447-amino-acid sequence was 47 521 Da, which is  $\approx 425$  Da lower than the mass determined by mass spectrometry. The fact that the lectin does not contain any modified amino acid other than the blocked N-terminus, indicated that the missing 425 Da corresponded to an N-terminal fragment which, depending on the size of the blocking group and the amino-acid composition, may contain 3–5 amino acids.

#### Repeated domain structure of *P. platycephala* lectin and homology with other proteins

Analysis of the amino-acid sequence revealed that the *P. platycephala* lectin structure could be divided into three repeats of 145–150 residues (termed Pk1, Pk2, and Pk3 in Fig. 3) that share 66 identical residues (45% identity). Each of the Pk repeats shows, in turn, extensive sequence identity with the group of mannose-specific jacalin (*Artocarpus integrifolia*)-related lectins identified in rhizomes of the







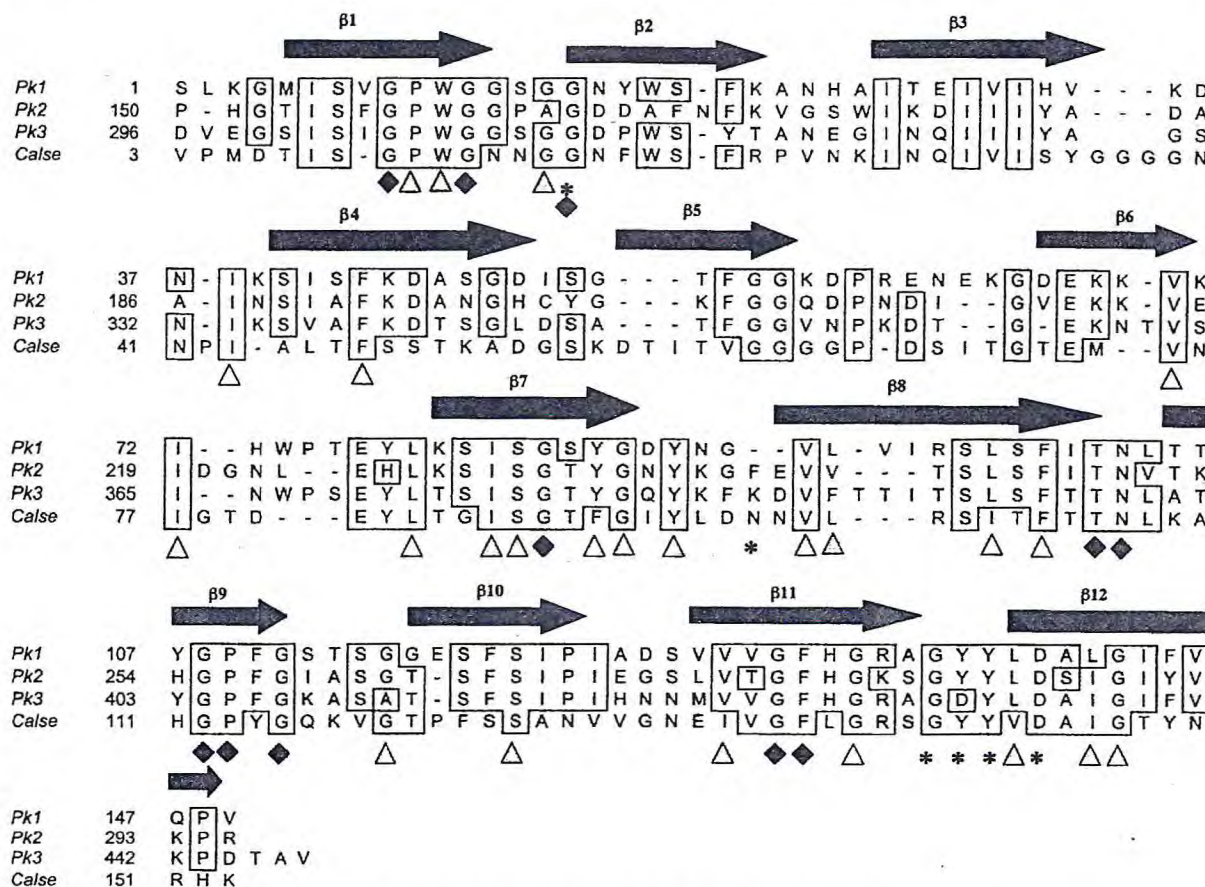


Fig. 3. Alignment of the amino-acid sequences of the three *P. platycephala* lectin jacalin-related repeats with the primary structure of *C. sepium* lectin [32]. Identical residues in the four sequences are boxed. Invariant and conserved residues of jacalin-related proteins, which define the signature of the  $\beta$  prism domain, are represented by black rhombs and grey triangles, respectively. The corresponding positions of the 12  $\beta$ -strands of the  $\beta$  prism domain identified in the crystal structure of *H. tuberosus* lectin [18] are shown above the sequence alignment. Positions of amino-acid residues which in the crystal structure of *H. tuberosus* lectin interact with bound mannose are labelled with asterisks.

hedge bindweed (*C. sepium* and *Convolvulus arvensis*, *Convolvulaceae*) [32,33] (Fig. 3), tubers of the Jerusalem artichoke (*Heliantus tuberosus*, *Asteraceae*) [34], banana fruit (*Musa acuminata*, *Musaceae*) [35], seeds of Japanese chestnut (*Castanea crenata*, *Fagaceae*) [36], leaves and stems of salt-stressed rice plants (*Oryza sativa*, *Gramineae*) [37], and a jasmonate-inducible protein of unknown function from the sweet potato (*Ipomoeas batata*, *Convolvulaceae*). The Pk domains of *P. platycephala* lectin also share extensive similarity with plant proteins from a number of monocots, i.e. a light stress inducible proteins of barley (*Hordeum vulgare*) [38], maize (*Zea mays*) and bread wheat (*Triticum aestivum*). In addition, the *P. platycephala* lectin domains are structurally similar to a number of jasmonate inducible, myrosinase-binding proteins from

eudicots, i.e. thale cress (*Arabidopsis thaliana*) [39]. All these proteins contain one to six copies of the jacalin-related  $\beta$  prism domain. Each of the repeats of the *Parkia* lectin contains 11 invariant and 23 conserved residues that define the signature of the  $\beta$  prism domain (Fig. 3) (for a multiple alignment and domain organization of the 152 entries consult the Pfam server at <http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/Pfam/getacc?PF01419>).

#### Preliminary X-ray diffraction data

Orthorhombic crystals of the *P. platycephala* lectin suitable for diffraction experiments (maximal dimensions of  $0.6 \times 0.3 \times 0.1 \text{ mm}^3$ ) grew within 4 weeks. The crystals belong to space group  $P2_12_12$  or  $P2_12_12_1$ , had cell constants

Fig. 2. Amino-acid sequence of the *P. platycephala* seed lectin assembled from sequences of overlapping degradation products generated by cleavages with cyanogen bromide (CB-), hydroxylamine (H-), chymotrypsin (Ch-), pepsin (P-), thermolysin (Th-), and endoproteinas Lys-C (K-), Arg-C (R-), Glu-C (E-), and Asp-N (D-). Dins, insoluble fragment after endoproteinas Asp-N digestion. Sequence heterogeneity was found in three positions, (I/V)70, (K/R)227, and (D/N)296. The 447 amino-acid sequence is  $\approx 425 \text{ Da}$  lower than the mass determined by mass spectrometry (Fig. 1), indicating that the blocked N-terminal residue and 3–5 amino acids are missing from the N-terminal part of the protein. The C-terminal peptide (CB-2) was analysed by mass spectrometry, which indicated an additional Val at the C-terminus not detected by Edman sequencing.



$a = 63 \text{ \AA}$ ,  $b = 68 \text{ \AA}$ ,  $c = 214 \text{ \AA}$ ;  $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ , and diffracted to a maximum resolution of  $2.7 \text{ \AA}$ .

## DISCUSSION

The *Mimosoideae* subfamily of leguminous plants comprises six tribes (*Adenanthereae*, *Mimoseae*, *Mimozyantheae*, *Parkiae*, *Acavieae*, and *Ingeae*) which group into 56 genera. At present the tribe *Parkiae* is the only taxon from which lectins have been characterized biochemically. Here, we report the first primary structure determination of a *Mimosoideae* lectin isolated from seeds of *P. platycephala*. This protein represents the first lectin made up by three homologous, tandemly arranged domains, each of which exhibits the signature of the  $\beta$  prism topology first described in the crystal structure of jacalin, the seed lectin of *A. integrifolia* [40]. Except for the Japanese chesnut (*C. crenata*) agglutinin which is composed of two tandemly arranged  $\beta$  prism domains [36], jacalin-related plant lectins are approximately 15-kDa proteins composed of a single  $\beta$  prism domain (<http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/Pfam/getacc?PF01419>). Similar to *C. crenata* agglutinin which has been reported to possess an acetylated N-terminal methionine residue [36], *C. sepium* rhizome lectin (blocked N-terminal methionine) [32], and KM+, a mannose-binding lectin from *A. integrifolia* which contains an N-terminal acetylated alanine residue [41], the *P. platycephala* lectin also contains a blocked N-terminal residue. This residue and the following 3–5 amino acids of the primary structure of the *Parkia* lectin could not be determined, however. The second  $\beta$  prism repeat of the *Parkia* lectin contains a cysteine residue at position 199 (Fig. 3). Cysteine residues are rare in the sequences of jacalin-related lectins. Heltuba, a mannose-specific lectin from tubers of the Jerusalem artichoke, *H. tuberosus*, contains a cysteine residue at position 40 at the beginning of strand  $\beta 4$  [34], and the N-terminal  $\beta$  prism domain of the Japanese chesnut agglutinin also possesses a cysteine at a position which is predicted to lay in the middle of strand  $\beta 4$  [36]. In the *P. platycephala* lectin Cys199 is predicted to reside in the loop structure joining  $\beta 4$  and  $\beta 5$  (Fig. 3). Thus, the position of the cysteine residue is not conserved within the  $\beta$  prism topology. In the crystal structure of the *Helianthus tuberosus* lectin (RCSB PDB accession no. 1C3K) [18], and probably also in *C. crenata* agglutinin (as predicted previously in [36]), the cysteine residue, which is located opposite to the mannose-binding pocket, is not solvent accessible. The cysteine residue of *P. platycephala* lectin was labelled with eosin-5-iodoacetamide in the absence of denaturing reagents (Fig. 1, insert), indicating that the thiol group is solvent-exposed.

Although once considered to represent a minor group of lectins confined to a few genera of the family *Moraceae*, jacalin-related lectins have been found in taxonomically unrelated families including dicots (*Moraceae*, *Convolvulaceae*, *Asteraceae*, *Fagaceae*), and monocots (*Gramineae*, and *Musaceae*). Our results show that the seed lectin of a *Mimosoideae*, the more primitive group within *Leguminosae* plants [24], also belongs to the group of jacalin-related lectins, indicating that the  $\beta$  prism represents a widespread scaffold for carbohydrate recognition. Moreover, jacalin-related lectins can be subdivided into galactose-specific and mannose-binding subgroups (see Fig. 1 in [18]). Lectins of

the first subgroup, jacalin [38] and Osage orange (*Maclura pomifera*) agglutinin (MPA) [14], contain two-chain subunits assembled into a fragmented  $\beta$  prism. Proteolytic processing of the proproteins generates an N-terminal Gly1 whose amino group mediates a hydrogen bond with the axial O4 of galactose which is responsible for the galactose-binding specificity of jacalin and MPA. In contrast, the mannose-specific subgroup of jacalin-related lectins consist of single chain,  $\beta$  prism fold polypeptides. The conformation of the mannose-binding site in the crystal structure of the Jerusalem artichoke *H. tuberosus* (RCSB PDB accession no. 1C3K) is maintained by the presence of the  $\beta 1$ - $\beta 2$  intervening sequence that precisely locates the key mannose-binding residues [18] and which is absent in galactose-binding jacalin-related lectins. In particular, Gly18, within the  $\beta 1$ - $\beta 2$  linker, establishes a hydrogen bond with the O3 atom and Van der Waals interactions with the equatorial O4 conferring specificity towards mannose. This residue is conserved in all three jacalin-related domains of the *P. platycephala* lectin ( $G^{16}$ ,  $G^{164}$ , and  $G^{311}$  in Pk1, Pk2, and Pk3, respectively, Fig. 3), further indicating that they share structural and functional features with the mannose-specific subgroup of jacalin-related lectins. However, other amino-acid side chains that interact with mannose residues in the crystal structure of the *H. tuberosus* lectin are highly variable among jacalin-related lectins and are not absolutely conserved in the three *P. platycephala* lectin repeats. In the *H. tuberosus* lectin nomenclature these residues are Gly135, Asp136, Val137, and Asp139 that belong to the surface-exposed  $\beta 11$ - $\beta 12$  loop and create a hydrogen bond network with the O6, O5, and O4 hydroxyl groups of mannose, and Met92 of the  $\beta 7$ - $\beta 8$  loop that stacks against the B-face of the pyranose ring [18]. The topologically equivalent residues in the *Parkia* lectin repeats are marked with asterisks in Fig. 3. Three out of the four mannose-binding residues of the *H. tuberosus* lectin are conserved only in the third  $\beta$  prism domain of the *Parkia* lectin. These residues are Gly431, Asp432, and Asp434 (Fig. 3). In addition, Phe384 seems to be a good candidate for mediating the stacking interaction against the mannose B-face. However, the stoichiometry of sugar binding remains to be established, and it is uncertain whether all three *Parkia*  $\beta$  prism jacalin-related structural domains do bind carbohydrates. The putative mannose-binding residues of the Pk1 and Pk2  $\beta$  prism domains are conserved in the structure of the mannose-specific lectin from *C. sepium* (Fig. 3) [32]. Hence, the *P. platycephala* lectin can be regarded as a mosaic protein composed of two N-terminal *C. sepium* jacalin-like domains followed by an *H. tuberosus* jacalin-like domain. Surface plasmon resonance measurement have demonstrated that the *H. tuberosus* lectin specifically interacts with mannose, oligomannosides, and high-mannose glycans, and that Man $\alpha$ 1-2Man and Man $\alpha$ 1-3Man are the best inhibitors [34]. The crystal structures of the lectin in complex with these two dimannosides revealed that the carbohydrate binding site of the *H. tuberosus* lectin cannot accommodate more than two sugar units [18]. In contrast, the strongest inhibition of the binding of the *P. platycephala* lectin to glycoproteins was achieved with Man $\alpha$ 1-6Man and Man $\alpha$ 1-6(Man $\alpha$ 1-3)Man [22]. This may indicate subtle structural differences in the sugar recognition site of the two lectins. Analytical ultracentrifugation equilibrium sedimentation indicated that *P. platycephala* lectin



exists as a dimer in solutions in the pH range 4.5–8.5. However, neither the relative orientation of the three  $\beta$  prism domains of a *Parkia* lectin monomer, nor the topology of the six mannose-binding sites in the quaternary structure of the lectin are known. Whether each  $\beta$  prism domain contains an equivalent mannose binding site that binds sugars independently, and whether additional or extended carbohydrate-binding sites are created by ternary or quaternary domain associations remain open questions. Clearly, three-dimensional structures of lectin-carbohydrate complexes are needed to ultimately establish the determinants of carbohydrate recognition of the tridomain *P. platycephala* lectin. To this end, we have obtained crystals of native *P. platycephala* lectin that diffract to 2.7 Å resolution. Initial data processing clearly indicated that the crystal structure of the *Parkia* lectin can be solved by molecular replacement using the  $\beta$  prism structure of the *H. tuberosus* lectin (PDB entry 1C3K).

The role of the mannose-specific jacalin-related lectins is still poorly understood. It has been suggested that expression of binding specificity towards mannose, an abundant building block of surface glycoproteins of viruses, bacteria and fungi, might reflect the role of constitutive plant lectins as storage proteins with a potential defensive role against herbivores and pathogens [1]. The realization that an increasing number of plant lectins from taxonomically unrelated families share the domain structure found in proteins upregulated by a number of signal pathways in response to low molecular mass regulators such as jasmonic acid, salicylic acid, ethylene, or to ambient conditions, i.e. salt stress [42], and the demonstration of a jacalin-related mannose-binding lectin in salt-stressed rice [37] further supports the hypothesis of a common ancestry of  $\beta$  prism jacalin-related lectins and stress-induced proteins, and highlights the possible importance of lectin-carbohydrate interactions in plant defence against environmental and biological offending scenarios.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grant PB98-0694 from the Dirección General de Investigación Científica y Técnica, Madrid (Spain), and grants from Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PADCT), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), International Foundation for Science (IFS), Fundação Cearense de Amparo à Pesquisa (FUNCAP), and BioTools Ecological Foundation (Brazil). F. G. del S. is a predoctoral fellow of the Plan Nacional de Investigación, Desarrollo e Innovación Tecnológica del Ministerio de Ciencia y Tecnología (Spain). We thank S. Koerner and Dr F. Siedler, Martinsried, for performing the mass spectrometric analysis.

## REFERENCES

- Van Damme, E.J.M., Peumans, W.J., Barre, A. & Rougé, P. (1998) Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. *Crit. Rev. Plant Sci.* **17**, 575–692.
- Gabius, H.-J. & Gabius, S., eds (1997). *Glycoscience. Status and Perspectives*. Chapman & Hall, Weinheim, Germany.
- Rini, J.M. (1995) Lectin Structure. *Annu. Rev. Biomol. Struct.* **24**, 551–577.
- Weis, W.I. & Drickamer, K. (1996) Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 441–473.
- Elgavish, S. & Shaanan, B. (1997) Lectin-carbohydrate interactions: different folds, common recognition principles. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 462–467.
- Loris, R., Hamelryck, T., Bouckaert, J. & Wyns, L. (1998) Legume lectin structure. *Biochim. Biophys. Acta* **1383**, 9–36.
- Bouckaert, J., Hamelryck, T., Wyns, L. & Loris, R. (1999) Novel structures of plant lectins and their complexes with carbohydrates. *Curr. Op. Struct. Biol.* **9**, 572–577.
- Vijayan, M. & Chandra, N. (1999) Lectins. *Curr. Op. Struct. Biol.* **9**, 707–714.
- Chervenak, M.C. & Toone, E.J. (1995) Calorimetric analysis of the binding of lectins with overlapping carbohydrate-binding ligand specificities. *Biochemistry* **34**, 5685–5695.
- Dam, T.K., Cavada, B.S., Grangeiro, T.B., Santos, C.F., de Sousa, F.A.M., Oscarson, S. & Brewer, C.F. (1998) *Diocleinae* lectins are a group of proteins with conserved binding sites for the core trimannoside of asparagine-linked oligosaccharides and differential specificities for complex carbohydrates. *J. Biol. Chem.* **273**, 12082–12088.
- Dam, T.K., Cavada, B.S., Grangeiro, T.B., Santos, C.F., Ceccatto, V.M., de Sousa, F.A.M., Oscarson, S. & Brewer, C.F. (2000) Thermodynamic binding studies of lectins from the *Diocleinae* subtribe to deoxy analogs of the core trimannoside of asparagine-linked oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* **275**, 16119–16126.
- Dam, T.K., Roy, R., Das, S.K., Oscarson, S. & Brewer, C.F. (2000) Binding of multivalent carbohydrates to concanavalin A and *Dioclea grandiflora* lectin. Thermodynamic analysis of the 'multivalency effect'. *J. Biol. Chem.* **275**, 14223–14230.
- Wright, C.S. (1997) New folds of plant lectins. *Curr. Op. Struct. Biol.* **7**, 631–636.
- Lee, X., Thompson, A., Zhang, Z., Ton-that, H., Biesterfeldt, J., Ogata, C., Xu, L., Johnston, R.A.Z. & Young, N.M. (1998) Structure of the complex of *Maclura pomifera* agglutinin and the T-antigen disaccharide, Gal $\beta$ 1,3GalNAc. *J. Biol. Chem.* **273**, 6312–6318.
- Chandra, N.R., Ramachandriah, G., Bachhawat, K., Dam, T.K., Surolia, A. & Vijayan, M. (1999) Crystal structure of a dimeric mannose-specific agglutinin from garlic: quaternary association and carbohydrate specificity. *J. Mol. Biol.* **285**, 1157–1168.
- Sauerborn, M.K., Wright, L.M., Reynolds, C.D., Grossmann, J.G. & Rizkallah, P.J. (1999) Insight into carbohydrate recognition by *Narcissus pseudonarcissus* lectin: the crystal structure at 2 Å resolution in complex with  $\alpha$ 1–3 mannobiose. *J. Mol. Biol.* **290**, 185–199.
- Wood, S.D., Wright, L.M., Reynolds, C.D., Rizkallah, P.J., Allen, A.K., Peumans, W.J. & van Damme, E.J.M. (1999) Structure of native (unligated) mannose-specific bulb lectin from *Scilla campanulata* (bluebell) at 1.7 Å resolution. *Acta Crystallogr.* **D55**, 1264–1272.
- Bourne, Y., Zamboni, V., Barre, A., Peumans, W.J., van Damme, E.J.M. & Rougé, P. (1999) *Helianthus tuberosus* lectin reveals a widespread scaffold for mannose-binding lectins. *Structure* **7**, 1473–1482.
- Suvachittanont, W. & Peutpaiboon, A. (1992) Lectin from *Parkia speciosa* seeds. *Phytochemistry* **31**, 4065–4070.
- Utarabhand, P. & Akkayanont, P. (1995) Purification of a lectin from *Parkia javanica* beans. *Phytochemistry* **38**, 281–285.
- Cavada, B.S., Santos, C.F., Grangeiro, T.B., Moreira da Silva, L.I.M., Campos, M.J.O., de Sousa, F.A.M. & Calvete, J.J. (1997) Isolation and partial characterization of a lectin from *Parkia platycephala* Benth seeds. *Physiol. Mol. Biol. Plants* **3**, 109–115.
- Ramos, M.V., Cavada, B.S., Bomfim, L.R., Debray, H., Mazard, A.-M., Calvete, J.J., Grangeiro, T.B. & Rougé, P. (1999) Interaction of the seed lectin from *Parkia platycephala* (*Mimosoideae*) with carbohydrates and complex glycans. *Prot. Pept. Lett.* **6**, 215–222.
- Cavada, B.S., Madeira, S.V.F., Calvete, J.J., Sousa, L.A.G., Bomfim, L.R., Dantas, A.R., Lopes, M.C., Grangeiro, T.B., Freitas,



- B.T., Pinto, V.P.T., Leite, K.B. & Ramos, M.V. (2000) Purification, chemical, and immunochemical properties of a new lectin from *Mimosaideae* (*Parkia discolor*). *Prep. Biochem. Biotech.* **30**, 271–280.
24. Heywood, V.H. (1971) The *Leguminosae* – a systematic preview. In *Chemotaxonomy of the Leguminosae* (Harborne, J.B. & Boulter, D., eds), pp. 1–29. Academic Press, London.
25. Anumula, K.R. & Taylor, P.B. (1991) Rapid characterization of asparagine-linked oligosaccharides isolated from glycoproteins using a carbohydrate analyzer. *Eur. J. Biochem.* **195**, 269–280.
26. Bornstein, P. & Balian, G. (1977) Cleavage at Asn-Gly bonds with hydroxylamine. *Methods Enzymol.* **47**, 132–145.
27. Jauregui-Adell, J. & Marti, J. (1975) Acidic cleavage of the aspartyl-proline bond and the limitations of the reaction. *Anal. Biochem.* **69**, 468–473.
28. Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389–3402.
29. Jancarik, J. & Kim, S.H. (1991) Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *J. Appl. Crystallogr.* **24**, 409–411.
30. Roepstorff, P. & Fohlman, J. (1984) Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed Mass Spectrom.* **11**, 601.
31. Biemann, K. (1990) Sequencing of peptides by tandem mass spectrometry and high-energy collision-induced dissociation. *Methods Enzymol.* **193**, 455–479.
32. Van Damme, E.J.M., Barre, A., Verhaert, P., Rougé, P. & Peumans, W.J. (1996) Molecular cloning of the mitogenic mannose/maltose-specific rhizome lectin from *Calystegia sepium*. *FEBS Lett.* **397**, 352–356.
33. Van Damme, E.J., Astoul, C.H., Barre, A., Rouge, P. & Peumans, W.J. (2000) Cloning and characterization of a monocot mannose-binding lectin from *crocus vernus*. *Eur. J. Biochem.* **267**, 5067–5077.
34. Van Damme, E.J.M., Barre, A., Mazard, M.A., Verhaert, P., Horman, A., Debray, H., Rougé, P. & Peumans, W.J. (1999) Characterization and molecular cloning of the lectin from *Helianthus tuberosus*. *Eur. J. Biochem.* **259**, 135–142.
35. Peumans, W.J., Zhang, W., Barre, A., Houles-Astoul, C., Balint-Kurti, P., Rovira, P., Rougé, P., May, G.D., Van Leuven, F., Truffa-Bachi, P. & Van Damme, E.J.M. (2000) Fruit-specific lectins from banana and plantain. *Planta* **211**, 546–554.
36. Nomura, K., Nakamura, S., Fujitake, M. & Nakanishi, T. (2000) Complete amino acid sequence of Japanese chestnut agglutinin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **276**, 23–28.
37. Zhang, W., Peumans, W.J., Barre, A., Houles-Astoul, C., Rovira, P., Rougé, P., Proost, P., Truffa-Bachi, P., Jalali, A.A.H. & Van Damme, E.J.M. (2000) Isolation and characterization of jacalin-related mannose-binding lectin from salt-stressed rice (*Oryza sativa*) plants. *Planta* **210**, 970–978.
38. Potter, E., Beator, J. & Kloppstech, K. (1996) The expression of mRNAs for light-stress proteins in barley: inverse relationship of mRNA levels of individual genes within the leaf gradient. *Planta* **199**, 314–320.
39. Lin, X., Kaul, S., Rounsley, S.D., Shea, T.P., Benito, M.-I., Town, C.D., Fujii, C.Y., Mason, T.M., Bowman, C.L., Barnstead, M.E., *et al.* (1999) Sequence and analysis of chromosome 2 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **402**, 761–768.
40. Sankaranarayanan, R., Sekar, K., Banerjee, R., Sharma, V., Surolia, A. & Vijayan, M. (1996) A novel mode of carbohydrate recognition in jacalin, a Moraceae plant lectin with a beta-prism fold. *Nat. Struct. Biol.* **3**, 596–603.
41. Rosa, J.C., De Oliveira, P.S., Garratt, R., Beltramini, L., Resing, K., Roque-Barreira, M.C. & Greene, L.J. (1999) KM+, a mannose-binding lectin from *Artocarpus integrifolia*: amino acid sequence, predicted tertiary structure, carbohydrate recognition, and analysis of the beta-prism fold. *Protein Sci.* **8**, 13–24.
42. Reymond, P. & Farmer, E.E. (1998) Jasmonate and salicylate as global signals for defence gene expression. *Curr. Op. Plant Biol.* **1**, 404–411.



Crystallization and preliminary X-ray diffraction  
analysis of the seed lectin from *Parkia platycephala*Francisca Gallego del Sol,<sup>a</sup>  
Santiago Ramón-Maiques,<sup>a</sup>  
Claudia F. Santos,<sup>b</sup> Thalles B.  
Grangeiro,<sup>c</sup> Celso S. Nagano,<sup>c</sup>  
Creuza M. S. A. Farias,<sup>d</sup>  
Benildo S. Cavada<sup>c</sup> and Juan J.  
Calvete<sup>a\*</sup><sup>a</sup>Instituto de Biomedicina de Valencia, CSIC,  
Jaime Roig 11, E-46010 Valencia, Spain,<sup>b</sup>Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza,  
Brazil, <sup>c</sup>BioMol-Lab, Universidade Federal do  
Ceará, Fortaleza, Brazil, and <sup>d</sup>Universidade de  
Fortaleza, Fortaleza, Brazil

Correspondence e-mail: jcalvete@ibv.csic.es

Received 22 May 2001

Accepted 29 October 2001

The crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the seed lectin of *Parkia platycephala*, a *Mimosoideae*, regarded as the most primitive group of the *Leguminosae* plants, are reported. Its amino-acid sequence consists of three tandemly arranged jacalin-related  $\beta$ -prism domains, which is a novel fold for a leguminous lectin. Furthermore, no other lectin structure with this arrangement of domains has been described.  $P2_12_12_1$  crystals (unit-cell parameters  $a = 63.6$ ,  $b = 68.5$ ,  $c = 208.5$  Å), which diffract to a maximum resolution of 2.2 Å, were obtained in hanging drops at pH 8 and 293 K by the vapor-diffusion method using 10% 2-propanol and 20% polyethylene glycol 4000 as precipitants. The asymmetric unit contains two lectin molecules and has a solvent content of 46%. Only a single  $\beta$ -prism domain could be located by molecular replacement using the structure of the *Helianthus tuberosus* lectin (PDB code 1c3k) as the search model. Isomorphous heavy-atom derivatives are currently being produced to solve the complete structure of the *P. platycephala* seed lectin.

## 1. Introduction

Lectins are a structurally heterogeneous group of carbohydrate-binding proteins of non-immune origin comprising distinct families of evolutionarily related proteins (Van Damme *et al.*, 1998). Sugar-recognition mechanisms have evolved independently in diverse protein frameworks and lectins are ubiquitous in animals, plants and microorganisms. Lectins play biological roles in many cellular processes, such as fertilization, cell communication, differentiation and development, host defence, parasitic infection, tumour metastasis *etc.* by deciphering the glycodes encoded in the structure of glycans attached to soluble and integral cell-membrane glycoconjugates (Gabius & Gabius, 1997).

Although the past few years have witnessed the elucidation of a variety of novel lectin structures from monocotyledonous (mannose-specific bulb lectins from *Amaryllidaceae*, *Liliaceae*, *Alliaceae* and *Orchidaceae*) and dicotyledonous plants (GalNAc-specific lectins from *Moraceae* and *Amaranthus* species and mannose/maltose-specific lectins from *Convolvulaceae*) (Wright, 1997; Lee *et al.*, 1998; Chandra *et al.*, 1999; Sauerborn *et al.*, 1999; Wood *et al.*, 1999; Bourne *et al.*, 1999), the largest and best characterized lectin family is still that from seeds of leguminous plants (consult the 3D Lectin Database at <http://www.cermav.cnrs.fr/databank/lectine>). Most studies on Leguminosae lectins involve

members of the Papilionoideae subfamily, while investigations on lectins of the other two subfamilies, *Caesalpinioideae* and *Mimosoideae*, are scarce. The *Mimosoideae* subfamily of leguminous plants comprises six tribes (*Adenanthereae*, *Mimoseae*, *Mimozyantheae*, *Parkiae*, *Acacieae* and *Ingeae*) which include 56 genera. At present, the tribe *Parkiae* is the only taxon from which lectins have been biochemically characterized. These include the seed lectins from *P. speciosa* (Suvachittanont & Peutpaiboon, 1992), *P. javanica* (Utara-bhand & Akkayanont, 1995), *P. platycephala* (Cavada *et al.*, 1997; Ramos *et al.*, 1999; Mann *et al.*, 2001) and *P. discolor* (Cavada *et al.*, 2000).

The *P. platycephala* seed lectin is a non-glycosylated single-chain polypeptide with a molecular mass of 47.9 kDa. Its primary structure is made up of three homologous repeats (Mann *et al.*, 2001), each of which exhibits sequence similarity with jacalin-related lectin monomers from *Asteraceae*, *Convolvulaceae*, *Moraceae*, *Musaceae*, *Gramineae* and *Fagaceae* plant families. It is noteworthy that all the 22 legume lectin crystal structures reported to date (<http://www.cermav.cnrs.fr/databank/lectine>) have the highly conserved jelly-roll topology first observed in concanavalin A (Srinivas *et al.*, 2001; Wah *et al.*, 2001; Rabijns *et al.*, 2001). Thus, the structure of the *P. platycephala* lectin represents a novel fold for a leguminous lectin. Moreover, the *P. platycephala* lectin shows also



sequence similarity with stress- and pathogen-upregulated defence genes of a number of different plants, suggesting a common ancestry for jacalin-related lectins and inducible defence proteins. Here, we report the crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the seed lectin from *P. platycephala*.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Isolation of *P. platycephala* lectin

Mature seeds from *P. platycephala* collected in the state of Ceará (Northeast Brazil) were ground in a coffee mill and the flour was defatted with *n*-hexane and air-dried at room temperature. Soluble proteins were extracted overnight at room temperature by continuous stirring with 1:50(w/v) 50 mM sodium acetate buffer pH 4.0 containing 150 mM NaCl. Insoluble material was pelleted by centrifugation at 10 000g at 278 K for 20 min. The supernatant was fractionated by ammonium sulfate precipitation (40% saturation). The resulting precipitate, recovered by centrifugation at 10 000g at 277 K for 20 min, was resuspended in and dialyzed exhaustively against 50 mM Tris-HCl pH 8.0 and applied to a Sephadex G100 column (2.5 × 30 cm) equilibrated and developed with the same buffer. Unbound material was eluted by washing with equilibrium buffer and the bound lectin was desorbed from the column with equilibrium buffer containing 0.1 M D-glucose. The lectin was freed from hapten by dialysis against 1 M acetic acid and then dialyzed against 100 mM Tris-HCl pH 7.6

containing 150 mM NaCl. Insoluble material was removed by centrifugation (as above) and the lectin in the clear supernatant was purified by affinity chromatography on a mannose-agarose column equilibrated with 100 mM Tris-HCl pH 7.6 containing 150 mM NaCl. Mannose-bound lectin, recovered with running buffer containing 0.1 M D-mannose, was dialyzed against MilliQ water and lyophilized. The apparent molecular mass and homogeneity of the purified *P. platycephala* seed lectin were estimated by SDS-PAGE and MALDI-TOF mass spectrometry (Mann *et al.*, 2001).

### 2.2. Crystallization, data collection and processing

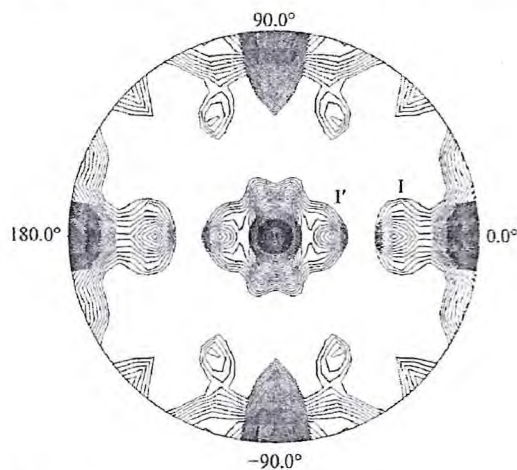
The sparse-matrix method (Jancarik & Kim, 1991) using the Crystal Screen I and II formulations supplied by Hampton Research (California, USA) was utilized to perform initial screening of the crystallization conditions. Crystals were grown at 295 K by the vapour-diffusion method using hanging drops composed of equal volumes of protein solution (~2–4 mg ml<sup>-1</sup> in 50 mM Na HEPES pH 8) and reservoir buffer (100 mM Na HEPES pH 7.5, 10% 2-propanol and 20% polyethylene glycol 4000). Crystals suitable for diffraction experiments (maximal dimensions of 0.6 × 0.3 × 0.1 mm) grew within four weeks. For the X-ray diffraction studies, crystals were flash-frozen at 100 K in a nitrogen-gas stream. Reservoir buffer containing 20% glycerol proved to be a suitable cryoprotectant. The crystals were transferred directly from the drop to the cryoprotectant solution and were allowed to equilibrate for approximately 1 min. Thereafter, single crystals were mounted in nylon loops and rapidly transferred to the cryostream. The cryoprotected crystals were analysed on an in-house SMART CCD detector mounted on a Bruker AXS X-ray generator operated at 50 kV and 90 mA using cross-coupled Göbel mirror-monochromated Cu K $\alpha$  radiation from a rotating anode. Diffraction data were collected as a series of discrete frames, each comprising 0.3° oscillation and an exposure time of 80 s, using a crystal-to-detector distance of 70 mm. Another data set was collected at the EMBL Outstation (Grenoble) on beamline ID14. The data were indexed,

integrated and scaled using *SMART*, *SAINT* and *PROSCALE* (Bruker AXS), *MOSFLM* (Leslie, 1997) and *SCALA* (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994). The self-rotation functions (Rossmann & Blow, 1962) were calculated using the program *POLARRFN* from the *CCP4* package (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994).

## 3. Results and discussion

Crystals of the *P. platycephala* seed lectin were grown at pH 8 in hanging drops by the vapour-diffusion method, using a mixture of 10% 2-propanol and 20% polyethylene glycol 4000 as precipitant. Autoindexing and consideration of systematically absent reflections revealed that the crystals belong to the orthorhombic space group *P*<sub>2</sub><sub>1</sub><sub>2</sub><sub>1</sub> (unit-cell parameters *a* = 63.6, *b* = 68.5, *c* = 208.5 Å). The final 2.2 Å resolution data set is 91% complete and has an overall *R*<sub>sym</sub> of 6.3%. Patterson maps computed in several resolution shells did not yield any significant peak. However, the self-rotation function (Rossmann & Blow, 1962) calculated using the program *POLARRFN* (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994) revealed a prominent peak with a height 31.6% of that obtained for the crystallographic 2<sub>1</sub> axis (Fig. 1). Considerations of the packing density and the results from the self-rotation function support the presence of two subunits in the asymmetric unit, which would correspond to a Matthews coefficient (*V*<sub>M</sub>) of 2.50 Å<sup>3</sup> Da<sup>-1</sup> and a solvent content of 46% (Matthews, 1968). This reflects the situation in solution, where the *P. platycephala* lectin exists as a non-pH-dependent dimer as judged by equilibrium sedimentation analytical ultracentrifugation (Mann *et al.*, 2001).

The primary structure of the *P. platycephala* lectin consists of three tandemly arranged homologous domains, each of which shares the signature of the  $\beta$ -prism fold (Mann *et al.*, 2001) similar to that observed in the crystal structure of the lectin from *H. tuberosus* (Bourne *et al.*, 1999). Using the structure of the *H. tuberosus* lectin (PDB code 1c3k) as the search model in *AMoRe* (Navaza, 1994), possible molecular-replacement solutions were found, but only for a single  $\beta$ -prism domain. The best solution has a final correlation coefficient of 0.34 after rigid-body refinement. This low coefficient reflects the fact that the search model represents only one third of a complete *P. platycephala* lectin molecule. Although the molecular-replacement solution leads to acceptable crystal packing, it leaves large



**Figure 1**  
Representation of the  $\kappa = 180^\circ$  section of the self-rotation function from the *P. platycephala* seed lectin crystals. The largest peaks correspond to the twofold crystallographic axes along the three directions. A non-crystallographic dyad axis (indicated as I, I' in the figure) is also clearly defined.



voids that may be filled by the other two domains of each lectin molecule in the asymmetric unit. We are currently searching for suitable isomorphous heavy-atom derivatives to solve the complete crystal structure of the three tandemly arranged  $\beta$ -prism domains of the *P. platycephala* lectin.

This work was supported in part by grant PB98-0694 from the Ministerio de Ciencia y Tecnología, Madrid, Spain. FGS is a recipient of a Beca de Formación de Personal Investigador from the Ministerio de Ciencia y Tecnología, Madrid, Spain. TBG and BSC are senior investigators from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil). We thank the European Union for financial support of the work at EMBL Outstation (Grenoble), the beamline ID14 scientists for technical support and Dr Antonio Romero for help with Patterson analysis.

## References

- Bourne, Y., Zamboni, V., Barre, A., Peumans, W. J., van Damme, E. J. M. & Rougé, P. (1999). *Structure*, **7**, 1473–1482.
- Cavada, B. S., Madeira, S. V. F., Calvete, J. J., Sousa, L. A. G., Bomfim, L. R., Dantas, A. R., Lopes, M. C., Grangeiro, T. B., Freitas, B. T., Pinto, V. P. T., Leite, K. B. & Ramos, M. V. (2000). *Prep. Biochem. Biotech.* **30**, 271–280.
- Cavada, B. S., Santos, C. F., Grangeiro, T. B., Moreira da Silva, L. I. M., Campos, M. J. O., de Sousa, F. A. M. & Calvete, J. J. (1997). *Physiol. Mol. Biol. Plants*, **3**, 109–115.
- Chandra, N. R., Ramachandraiah, G., Bachhawat, K., Dam, T. K., Surolia, A. & Vijayan, M. (1999). *J. Mol. Biol.* **285**, 1157–1168.
- Collaborative Computational Project, Number 4 (1994). *Acta Cryst.* **D50**, 760–763.
- Gabius, H.-J. & Gabius, S. (1997). Editors. *Glycoscience: Status and Perspectives*. Weinheim: Chapman & Hall.
- Jancarik, J. & Kim, S.-H. (1991). *J. Appl. Cryst.* **24**, 409–411.
- Lee, X., Thompson, A., Zhang, Z., Ton-that, H., Biesterfeldt, J., Ogata, C., Xu, L., Johnston, R. A. Z. & Young, N. M. (1998). *J. Biol. Chem.* **273**, 6312–6318.
- Leslie, A. G. W. (1997). *MOSFLM User's Guide: MOSFLM Version 5.50*. MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, England.
- Mann, K., Farias, C. M. S. A., Gallego Del Sol, F., Santos, C. F., Grangeiro, T. B., Nagano, C. S., Cavada, B. S. & Calvete, J. J. (2001). *Eur. J. Biochem.* **218**, 4414–4422.
- Matthews, B. W. (1968). *J. Mol. Biol.* **33**, 491–497.
- Navaza, J. (1994). *Acta Cryst.* **A50**, 157–163.
- Rabijns, A., Verboven, C., Rouge, P., Barre, A., Van Damme, E. J., Peumans, W. J. & De Ranter, C. J. (2001). *Proteins*, **44**, 470–478.
- Ramos, M. V., Cavada, B. S., Bomfim, L. R., Debray, H., Mazard, A.-M., Calvete, J. J., Grangeiro, T. B. & Rougé, P. (1999). *Protein Pept. Lett.* **6**, 215–222.
- Rossmann, M. G. & Blow, D. M. (1962). *Acta Cryst.* **15**, 24–31.
- Sauerborn, M. K., Wright, L. M., Reynolds, C. D., Grossmann, J. G. & Rizkallah, P. J. (1999). *J. Mol. Biol.* **290**, 185–199.
- Srinivas, V. R., Reddy, G. B., Ahmad, N., Swaminathan, C. P., Mitra, N. & Surolia, A. (2001). *Biochim. Biophys. Acta*, **1527**, 102–111.
- Suvachittanont, W. & Peutpaiboon, A. (1992). *Phytochemistry*, **31**, 4065–4070.
- Utarabhand, P. & Akkayanont, P. (1995). *Phytochemistry*, **38**, 281–285.
- Van Damme, E. J. M., Peumans, W. J., Barre, A. & Rougé, P. (1998). *Crit. Rev. Plant Sci.* **17**, 575–692.
- Wah, D. A., Romero, A., Gallego del Sol, F., Cavada, B. S., Ramos, M. V., Grangeiro, T. B., Sampaio, A. H. & Calvete, J. J. (2001). *J. Mol. Biol.* **310**, 885–894.
- Wood, S. D., Wright, L. M., Reynolds, C. D., Rizkallah, P. J., Allen, A. K., Peumans, W. J. & van Damme, E. J. M. (1999). *Acta Cryst.* **D55**, 1264–1272.
- Wright, C. S. (1997). *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**, 631–636.