

Universidade Federal do Ceará
Centro de Ciências
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS E
CRISTALOGRAFIA DE RAIOS X DE LECTINAS DA FAMÍLIA LEGUMINOSAE

BRUNO ANDERSON MATIAS DA ROCHA

FORTALEZA
2007

Universidade Federal do Ceará
Centro de Ciências
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS E
CRISTALOGRAFIA DE RAIOS X DE LECTINAS DA FAMÍLIA LEGUMINOSAE**

BRUNO ANDERSON MATIAS DA ROCHA

Tese apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Ceará, como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre H. Sampaio

FORTALEZA

2007

Ficha catalográfica elaborada pelo Bibliotecário Hamilton Rodrigues Tabosa CRB-3/888

R571c Rocha, Bruno Anderson Matias da

Caracterização estrutural por espectrometria de massas e cristalografia raios X de lectinas da família leguminosae / Bruno Anderson Matias da Rocha
128 f. : il. color. ; enc.

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007

Orientador: Alexandre Holanda Sampaio

Co-orientador: Benildo Sousa Cavada

Área de concentração: Bioquímica

1. Lectinas 2. Cristalografia de raios X 3. Espectrometria de massas I. Sampaio, Alexandre Holanda (orient.) II. Universidade Federal do Ceará – Doutorado em Bioquímica III. Título

CDD 574.192

Esta tese foi submetida à coordenação do curso de Pós-Graduação em Bioquímica como parte dos requisitos necessários para a 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 dissertação é permitida, desde que seja feita em conformidade com as normas da ética científica.

BRUNO ANDERSON MATIAS DA ROCHA

Tese aprovada em:

Dr. Alexandre Holanda Sampaio

Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará

Orientador

Dra. Ilka Maria Vasconcelos

Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará

Examinadora

Dr. Benildo Sousa Cavada

Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará

Co-orientador

Dr. Plínio Delatorre

Depto. de Ciências Físicas e Biológicas
Universidade Regional do Cariri

Examinador

Dr. Walter Filgueira de Azevedo Jr.

TECNOPUC

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Examinador

Em memória,

**Ao meu avô, Agostinho de Lima Matias,
que dedicou a vida à família e sempre
será a mão firme no meu ombro nos
momentos de dificuldade. Com muitas
saudades.**

"Um homem que ousa desperdiçar uma hora ainda não descobriu o valor da vida."

Charles Darwin

"Nada na biologia faz sentido senão à luz da evolução".

Theodosius Dobzhansky

"...essas tão elaboradas formas de vida, tão diferentes entre si, mas tão dependentes umas das outras, de modo extremamente complexo. Há grandiosidade nesse modo de enxergar a vida... originalmente soprada sobre algumas poucas formas... de um começo tão simples, infinitas formas de grande beleza evoluíram e continuam a evoluir"

A origem das espécies (1959)

Charles Darwin

"Fatos falsos são altamente prejudiciais ao progresso da ciência, por sua natureza prolongada; mas falsas opiniões, se suportadas por alguma evidência, causam pequenos danos, pois todos sentem um prazer salutar em provar sua falsidade."

Charles Darwin

Índice

	Página
Lista de Figuras.....	09
Lista de Tabelas.....	10
Lista de Abreviaturas.....	11
Agradecimentos.....	12
Resumo.....	15
Abstract.....	16
Capítulo 1 – Introdução.....	17
1.1. Considerações Gerais.....	18
1.2. Lectinas.....	19
1.2.1. Histórico.....	19
1.2.2. Aspectos Gerais.....	19
1.3. Lectinas Vegetais.....	22
1.3.1. Aspectos Gerais e Classificação.....	22
1.3.2. Lectinas de Leguminosas.....	25
1.3.3. Aspectos Estruturais.....	26
1.3.4. Lectinas da Subtribo Diocleinae.....	27
1.3.4.1. Lectinas de Sementes de <i>Cymbosema roseum</i>	32
1.3.5. Lectinas da Subfamília Mimosoidae.....	32
1.3.5.1. Lectina da Fração Albumina de Sementes de <i>Acacia farnesiana</i>	33
1.3.5.2. Quitinase com Atividade Hemaglutinante de Sementes de <i>Parkia platycephala</i>	34
1.4. Estrutura Tridimensional de Lectinas de Leguminosas.....	36
1.5 Referências Bibliográficas.....	40
Capítulo 2 – Estudos Estruturais das Lectinas de Sementes de <i>Cymbosema roseum</i>	49
2.1.Introdução.....	50
2.2.Objetivos.....	52
2.3. Material e Métodos.....	53
2.3.1. Purificação das Lectinas de <i>Cymbosema roseum</i> (CRLI e CRLII)	53
2.3.2. Ensaios Hemaglutinantes e de Inibição da Atividade Hemaglutinante da CRLII.....	53
2.3.3. Caracterização por Espectrometria de Massas e Análise das Glicosilações da CRLII.....	55
2.3.4. Seqüenciamento de Aminoácidos das Lectinas.....	55
2.3.5. Cristalografia de Raios X.....	57
2.3.5.1. Cristalização das Proteínas.....	57
2.3.5.2. Coleta de Dados da Difração de Raios X.....	58
2.3.5.3. Resolução da Estrutura Cristalográfica da CRLI.....	58

2.4. Resultados e Discussão.....	59
2.4.1. Purificação e Caracterização da Afinidade por Carboidratos.....	59
2.4.2. Seqüenciamento das Proteínas e Caracterização Bioquímica.....	65
2.4.3. Cristalização das Proteínas e Difração de Raios X.....	74
2.4.4. Estrutura Geral das lectina manose específica de <i>Cymbosema roseum</i>	78
2.5. Conclusão.....	83
2.6. Referências Bibliográficas.....	84
Capítulo 3 – Estrutura Cristalográfica da Quimerolectina com Atividade Quitinásica de sementes de <i>Parkia platycephala</i>	91
3.1. Introdução.....	92
3.2. Objetivos.....	95
3.3. Material e Métodos.....	96
3.3.1. Purificação da lectina GlcNAc específica de <i>Parkia platycephala</i>	96
3.3.2. Cristalografia de Raios X.....	96
3.3.2.1. Cristalização da Proteína.....	96
3.3.2.2. Coleta de Dados da Difração de Raios X.....	97
3.3.2.3. Resolução da Estrutura Cristalográfica da PPL2.....	97
3.4. Resultados e Discussão.....	99
3.4.1. PPL2, uma Nova Lectina Monomérica não Glicosilada com Afinidade por GlcNAc.....	99
3.4.2. PPL2 Apresenta Atividade Quitinásica.....	99
3.4.3. Estrutura Tridimensional da PPL2.....	102
3.4.4. Comparação Estrutural e Análise dos Motivos Conservados.....	102
3.5. Conclusão.....	106
3.6. Referências Bibliográficas.....	107
Capítulo 4 – Lectina da Fração Albumina de Sementes de <i>Acacia farnesiana</i>	111
4.1. Introdução.....	112
4.2. Objetivos.....	114
4.3. Material e Métodos.....	115
4.3.1. Purificação da AFAL.....	115
4.3.2. Seqüenciamento de Aminoácidos.....	115
4.4. Resultados e Discussão.....	116
4.4.1. Seqüência Primária da AFAL.....	116
4.4.2. Aspectos Estruturais da AFAL.....	117
4.4.3. Oligomerização tempo dependente da AFAL.....	120
4.5. Conclusão.....	123
4.6. Referências Bibliográficas.....	124
Capítulo 5 – Considerações Gerais e Anexos.....	126
5.1. Considerações Gerais e Perspectivas.....	127
5.2. Anexo (Publicações).....	128

Lista de Figuras

	Página
Figura 1.1. Classificação estrutural de lectinas.....	21
Figura 1.2. Classificação das lectinas vegetais.	23
Figura 1.3. Lectina de <i>Canavalia ensiformis</i> (1CVN).	28
Figura 1.4. Sítios de ligação a compostos do metabolismo vegetal.	29
Figura 1.5. Aspectos estruturais da lectina de <i>Canavalia maritima</i> (ConM)...	30
Figura 1.6. Estruturas quaternárias de lectinas vegetais.	38
Figura 2.1 Cromatografia de afinidade e SDS-PAGE da lectina lactose específica de <i>Cymbosema roseum</i> (CRL II).....	60
Figura 2.2. Seqüência da CRLI obtida por espectrometria de massas em tandem.	66
Figura 2.3. Seqüência da CRLII obtida por degradação de Edman espectrometria de massas em tandem.....	67
Figura 2.4. Análise por MALDI-ToF da massa intacta da CRL II.....	68
Figura 2.5 Alinhamento da CRLI com várias outras lectinas isoladas de sementes de espécies dos gêneros <i>Canavalia</i> e <i>Dioclea</i>	72
Figura 2.6. Alinhamento de seqüência da CRLII com lectinas de <i>Vatairea macrocarpa</i> (VML) e <i>Robinia pseudoacacia</i> (Rob)	73
Figura 2.7. Cristal da lectina manose específica de sementes de <i>Cymbosema roseum</i> (CRLI).....	75
Figura 2.8. Cristais da lectina lactose específica de sementes de <i>Cymbosema roseum</i> (CRLII).....	76
Figura 2.9. Estrutura geral da lectina CRLI.....	79
Figura 2.10. Sítio de ligação a metais da CRLI.....	81
Figura 2.11. Sítio de ligação ao ácido α -aminobutírico (Abu).....	82
Figura 3.1. Purificação e determinação da massa molecular da PPL2.....	100
Figura 3.2. Estrutura tridimensional da PPL2.....	103
Figura 3.3. Alinhamento múltiplo das seqüências da PPL2, hevamine, XIP-I e ConB.....	104
Figura 3.4 Rede de pontes de hidrogênio da estrutura da PPL2.....	105
Figura 4.1. Sequência de aminoácidos da AFAL obtida por espectrometria de massas em tandem.....	118
Figure 4.2. Alinhamento de seqüências entre a AFAL as seqüências da aglutinina de leucócitos de sementes de <i>Phaseolus vulgaris</i> (PHA-L), a aglutinina de <i>Phaseolus vulgaris</i> (PHA) e a lectina de <i>Dolichos biflorus</i> (DBL).....	119
Figura 4.3. Contato entre dímeros da lectina de <i>Phaseolus vulgaris</i> que apresenta similaridade de 68 % com alectina de <i>Acacia farnesiana</i>	122

Lista de Tabelas

	Página
Tabela 2.1. Inibição da atividade hemaglutinante da lectina lactose específica de <i>Cymbosema roseum</i> por monossacarídeos e glicoproteínas.....	62
Tabela 2.2. Estrutura dos glicanos componentes das glicoproteínas utilizadas nos ensaio de inibição e os antígenos que são constituídos por esses glicanos.....	63
Tabela 2.3. Seqüências de aminoácidos dos peptídeos da CRLII obtidas por espectrometria de massas e as m/z correspondentes aos íons analisados....	69
Tabela 2.4. Determinação bioquímica da composição de carboidratos da CRLII e predição da estrutura do carboidrato baseada na análise de espectrometria de massas.....	71
Tabela 2.5. Dados estatísticos da resolução total da CRLI e da coleta de dados da CRLII.....	77
Table 3.1. Dados estatísticos da resolução da estrutura tridimensional da PPL2.....	98

Abreviaturas Utilizadas

- RIP** – Proteína Inativadora de Ribossomos;
- GalNAc** – N-acetil galactosamina;
- Man** – Manose;
- Glc** – Glicose;
- GlcNAc** – N-acetil glicosamina;
- Fuc** – Fucose;
- NeuAc** – Ácido neuramínico;
- Gal** – Galactose;
- GNA** – Aglutinina de *Galanthus nivalis*;
- UDA** – Aglutinina de *Urtica dioica*;
- PHA** – Aglutinina de *Phaseolus vulgaris*;
- SBA** - Aglutinina de *Glicine max*;
- DBL/DB58** – *Dolichos biflorus* lectin;
- Abu** – ácido α -aminobutírico;
- ConA** – Concanavalina A;
- D.guia** – Lectina de *Dioclea guianensis*;
- D.gran** – Lectina de *Dioclea grandiflora*;
- ConBr** – Lectina de *Canavalia brasiliensis*;
- ConM** – Lectina de *Canavalia maritima*;
- bCFL** – Lectina de *Cratylia floribunda*;
- CGL** - Lectina de *Canavalia gladiata*;
- PNA** - Aglutinina de *Arachis hypogaeae*;
- ECL** - Lectina de *Erythrina cristagalii*;
- EcoL** - Lectina de *Erythrina coralodendrum*;
- EVL** - Lectina de *Erythrina velutina*;
- VML** - Lectina de *Vatairea macrocarpa*;
- EIL** - Lectina de *Erythrina indica*;
- ESL** - Lectina de *Erythrina speciosa*;
- DLab II** - Lectina galactose específica de *Dolichos lablab*;
- BvcL** - Lectina de *Bauhinia variegata*;
- XIP-I** - Xilanase de *Triticum aestivum*;
- VL** – Lectina de vinorama;
- ConB** – Quitinase de *Canavalia ensiformis*;
- Rob** – Lectina de *Robinia pseudoacacia*;
- PPL** – Lectina de *Parkia platycephala*;
- PPLII** - Quimerolectina de *Parkia platycephala*
- AFAL** – Lectina da fração albumina de *Acacia farnesiana*;
- CRLI** - Lectina manose específica de *Cymbosema roseum*;
- CRLII** - Lectina lactose específica de *Cymbosema roseum*;
- GS-IV** - Isoforma IV da lectina de *Griffonia simplicifolia*;
- GH18** – Família 18 das glicosil hidrolases;
- Tris** - Tris(hidroximetil)aminometano;
- KeV** – Kilo elétrons Volts;
- Vm** – Volume de Matthews;
- EG** – Etileno glicol
- PEG** – Polietileno glicol;
- PBS** – Tampão fosfato salino;
- SDS** – Dodecil sulfato de sódio;
- PAGE** – Eletroforese em gel de poliacrilamida;
- LC** – Cromatografia líquida;
- ToF** – Tempo de voo;
- NCBI** - *Nacional Center of Biotechnology Information*

Agradecimentos

À minha mãe, que sempre foi responsável por todo o meu caminho, a quem eu devo toda a capacidade de saber conduzir meus objetivos e projetos de forma serena em minha vida.

Um agradecimento especial aos meus orientadores, Prof. Dr. Alexandre Holanda Sampaio e Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada, pela confiança no meu trabalho e pelo incentivo que sempre inspirou minha carreira científica.

Ao Dr. Juan José Calvete do Instituto de Biomedicina de Valencia (Espanha) e ao Dr. Henri Drebray da Universidade de Lillè (França), cujos laboratórios proporcionaram a realização de parte dos estudos desta tese.

À professora Dra. Ilka Maria Vasconcelos, que desde o ingresso no mestrado, quando era coordenadora, me acolheu e sempre me recebeu de portas abertas em seu laboratório com verdadeira amizade e simpatia, e que com gentileza aceitou o convite para participar desta banca.

Ao professor Dr. Walter Filgueira de Azevedo Jr. da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, que colaborou insistentemente e com grande sabedoria nos trabalhos não só desta tese, mas em vários trabalhos de cristalografia nos quais estive envolvido e com quem sempre estou aprendendo.

De forma indiscutível, a pessoas a quem eu devo não só grande parte do aprendizado como o amadurecimento científico; o Prof. Dr. Plinio Delatorre merece mais que agradecimentos por todos os momentos compartilhados durante os últimos quatro anos de companheirismo e convivência, nos quais mais que um excelente trabalho e ótimos resultados construímos uma amizade com a qual pretendo contar por muito tempo.

A URCA que me recebeu e permitiu um grande aprimoramento profissional, um aperfeiçoamento didático e científico.

Aos amigos Taianá, Gustavo e Victor que surgiram como grandes amigos para todos os momentos.

À Raquel por toda prontidão e capacidade ímpar de estar sempre disposta a ajudar.

Aos colegas do grupo de cristalografia de proteínas Beatriz Tupinambá Freitas, Emmanuel Prata e Celso Shiniti Nagano. E aos demais colegas do Biomol-Lab, Luciana, Emmanuel Marinho, Kíria, Ramón, Eduardo, Júlia, Cícero, Tales, Roberto, Ranieri, Márcia e Josy pela excelente convivência e companheirismo.

Aos professores e funcionários ligados ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica pela colaboração ao longo do curso, em particular a professora Norma Benevides, que sempre foi prestativa e sensível às necessidades dos alunos.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, em especial aos meus amigos: Nívea, Juliana, Geórgia, Hévila e Eduardo.

À Professora Dra. Cristina Paiva, que durante este tempo participou de vários momentos da minha vida acadêmica e pessoal, desde a graduação até o doutorado, como professora da graduação, participando de bancas de avaliação e como uma conselheira e amiga.

Às grandes amigas, Fernanda, Fabiana, Ivoneide, Graziely e Laécia, que são as melhores lembranças que eu trago da época da graduação nas salas e corredores da UECE.

Aos bolsistas Helton, Camila, Pereira Jr., Agda e Fábio que trabalham assiduamente para a concretização do Laboratório de Cristalografia de Proteínas na URCA.

Aos amigos Eudásio, Madson e Fabrício por tantos momentos de distração e diversão durante os dias de tensão. Agradeço, também, a Iracélia, Iolanda e Brígida que mais que amigas são verdadeiras irmãs.

À minha família, que é o suporte de toda minha vocação e caráter, espero satisfazê-la sempre, dedicando sempre o meu melhor a tudo que eu fizer.

Agradeço, por fim, a todos aqueles que acreditaram e acreditam na construção e no progresso da ciência.

Este Trabalho foi Realizado com o Auxílio das Seguintes Instituições:

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelos convênios estabelecidos com o Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, através de bolsa de Doutorado concedida ao candidato.

Ministério de Ciência e Tecnologia através de treinamentos oferecidos pelo Centro Brasil-Argentina de Biotecnologia (CBAB), através do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), além do financiamento aos Projetos de Cristalografia e Bioinformática.

Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), por 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.

Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, onde se encontra o laboratório de cristalização.

Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), onde foram realizados os experimentos de difração de Raios X.

Resumo

Embora as lectinas da família Leguminosae sejam tão bem estudadas, seqüências de lectinas da subtribo Diocleinae têm mostrado que o processo de permutação circular pode não ocorrer em algumas das lectinas de leguminosas. Além disso, poucos dados estruturais de lectinas de Mimosoideae têm sido determinados e, desta forma, a classificação estrutural dessas lectinas torna-se dificultada. Ainda, nesse mesmo aspecto, vários relatos conduzem à hipótese de que a PPL2 seja uma lectina quimérica. A determinação da seqüência de aminoácidos e a resolução de estruturas dessas lectinas podem ser utilizadas como forma de entendimento desta diferença na especificidade por carboidratos de proteínas isoladas de espécimes da mesma subfamília e para obter informações da origem evolutiva das lectinas. Nesses estudos, pode-se ainda observar se a propriedade de interação de lectinas com aminoácidos não protéicos e a existência de lectinas com atividade quitinásica, ambas relacionadas a mecanismos de defesa de plantas contra patógenos. O presente trabalho apresenta aspectos estruturais de quatro lectinas purificadas de sementes de espécies pertencentes à família Leguminosae. As lectinas manose- e lactose- específicas de sementes de *Cymbosema roseum* apresentam estruturas primárias, terciárias e quaternárias distintas. Essas diferenças estruturais mostram a relação direta do arranjo quaternário na atividade de lectinas. As diferentes formas com que essas lectinas interagem com carboidratos revelam que apesar das mesmas fontes de onde foram purificadas elas devem desempenhar ações complementares no mecanismo de defesa de plantas, uma vez que a CRLI apresenta também a capacidade de ligar-se a um aminoácido não protéico envolvido em respostas contra patógenos. A PPL2 é uma quimerolectina homologa a endoquitinases que exhibe atividade hemaglutinante e atividade catalítica contra quitina. Tais atividades sugerem um mecanismo evolutivo que resultou no aumento da eficiência da atuação desta quimerolectina em ancorar o substrato sobre o qual sua atividade catalítica está direcionada. A AFAL é uma lectina quitina ligante que apresenta elevada similaridade com lectinas do tipo PHA, a qual se concentra em regiões importantes na atividade de lectinas. Na AFAL, alterações significativas dos resíduos presentes na formação das interfaces diméricas podem ser a causa do processo oligomérico tempo dependente.

Abstract

Although lectins from Leguminosae family were so well studied, sequences of Diocleinae sub tribe lectins have been shown that the circular permutation of peptide chains do not occur in some legume lectins. In addition, there are few structural data about Mimosoideae lectins, resulting in a difficulty structural classification of them. Regarding this same aspect, some reports conducted to the hypothesis that PPL2 is a chimerolectin. Amino acid sequence and tridimensional structures determinations of some legume lectins can help to understand the carbohydrate affinity differences in lectins from the same subfamily and to obtain information about the evolutive origin of the lectins. In these studies, can be observed the binding property of lectins in interacting with non-protein amino acids and the existence of lectins with chitinase activity, both of them related to plant defense mechanisms against pathogens. This work shows structural features of four lectins purified from seeds in different species from Leguminosae family. The mannose- and lactose- specific lectins from seed of *Cymbosema roseum* present distinct primary, tertiary and quaternary structures. These structural differences show direct relationship with the proteins biologic assemble. The different binding properties of these lectins reveals that even being isolated from the same plant source they developed different ways to response against pathogens. PPL2 is a chimerolectin with endochitinase homology, which exhibit haemmagglutinating and catalytic activity against chitin. Both activities indicate an evolutionary mechanism that resulted in enhance of the PPL2 efficiency in anchor the substrate. AFAL is a chitin binding lectin and displays a high similarity with PHA-like lectins, which are concentrated in important regions to lectin activity. In AFAL, significant alterations of the amino acid residues placed at dimmeric interfaces can be the cause of time-dependent oligomerization.

Capítulo 1: Introdução

Capítulo 1. Introdução

1.1. Considerações Gerais

Lectinas são proteínas de origem não-imune com pelo menos um sítio de ligação não catalítico que reconhecem e interagem de forma reversível com carboidratos (PEUMANS e VAN DAMME, 1995). As lectinas foram primeiramente descritas por sua capacidade de aglutinar células sanguíneas através de ligações cruzadas com resíduos de açúcar presentes na superfície dessas células. Elas são classicamente consideradas um grupo heterogêneo de proteínas, com propriedades bioquímicas e atividades biológicas acentuadamente diferentes, apresentando funções biológicas em processos importantes como infecções (TOSCANO *et al.*, 2007), fertilização (TÖPFER-PETERSEN e CALVETE, 1996), câncer (GENG, 2003), transporte protéico (LIU *et al.*, 2000) e embriogênese (VASTA *et al.*, 2004). Também são ferramentas importantes na biologia, histologia e medicina (VAN DAMME *et al.*, 1998).

No estudo da fisiologia vegetal e defesa de plantas (PEUMANS e VAN DAMME, 1995; MURDOCK e SHADE, 2002; DELATORRE *et al.*, 2007), bem como no estabelecimento de relações ecológicas com bactérias fixadoras de nitrogênio, constituindo micorrizas (FRANZEL *et al.*, 2006), são várias as evidências que indicam a funcionalidade das lectinas vegetais.

Concomitantemente com o progresso alcançado pelo sequenciamento e clonagem de lectinas de plantas, avanços importantes têm sido feitos na análise estrutural dessas lectinas usando difração de raios X e análise de ressonância magnética nuclear (NMR). Numerosas estruturas de lectinas têm sido determinadas e a resolução de novas estruturas tem aumentado constantemente. A determinação dessas estruturas possibilitou o estudo da interação lectina-carboidrato a nível molecular, demonstrando também que cada família de lectinas tem um enovelamento particular e característico, além de motivos estruturais que reconhecem açúcares complementares (PEUMANS *et al.*, 2000).

1.2. Lectinas

1.2.1. Histórico

No final do século XIX, várias evidências indicavam a existência natural de proteínas com a capacidade de aglutinar eritrócitos. Essas proteínas foram denominadas de hemaglutininas, ou fitoaglutininas por terem sido originalmente encontradas em plantas (SHARON e LIS, 2004). A primeira descrição de lectinas decorre do ano de 1888, quando em busca pelo princípio tóxico da planta *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) Peter Hermann Stillmark (1860 – 1923) estudou essa planta. Em sua tese, publicada em 1888 na Universidade de Dorpart/Tartu (Estônia, então uma das províncias Bálticas do Império Russo), Stillmark descobriu que extratos de sementes de *R. communis* eram capazes de aglutinar células sanguíneas de diferentes animais. Ele denominou a substância responsável por essa atividade de Ricina (SHARON e LIS, 1989). Na mesma universidade, Hellin demonstrou a presença de uma hemaglutinina tóxica em extratos de *Abrus precatorius*, a qual denominou de abrina.

Ricina e abrina foram amplamente utilizadas como modelos de antígenos em estudos imunológicos. Isto permitiu que Paul Ehrlich, do Instituto Real de Terapia Experimental (Frankfurt), pudesse estabelecer nos anos 90 vários dos princípios fundamentais da imunologia.

Apenas em 1995 as lectinas ganharam a definição utilizada até hoje, embora o termo lectina tenha perdido o sentido, uma vez que foi designado devido a constatação de que algumas proteínas ligantes a carboidratos seletivamente aglutinavam eritrócitos de tipos sanguíneos humanos específicos (do verbo Latim *legere*, que significa “escolher”). Portanto, a definição atual é que lectinas são proteínas de origem não-imune capazes de ligarem-se específica e reversivelmente a carboidratos, possuindo pelo menos um domínio não-catalítico (PEUMANS e VAN DAMME, 1995).

1.2.2. Aspectos Gerais

Apesar de terem sido descobertas há mais de um século, somente nas últimas décadas houve um avanço acentuado na lectinologia com o aumento do

número de lectinas isoladas e caracterizadas, de tal forma que se alcançaram definições mais claras a respeito de suas estruturas e funções. As lectinas se distinguem de todas as outras proteínas de plantas por um critério funcional bem definido, que consiste na sua habilidade para reconhecer e ligar-se a carboidratos específicos. Elas são classicamente consideradas um grupo heterogêneo de proteínas com propriedades bioquímicas e atividades biológicas acentuadamente diferentes.

A classificação estrutural das lectinas as subdivide em quatro classes: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas (Figura 1.1). Merolectinas possuem um simples domínio de ligação a carboidrato e, sendo monovalentes, são incapazes de precipitar glicoconjugados ou aglutinarem células. A lectina isolada do látex da seringueira (*Hevea brasiliensis*), a heveína é um exemplo típico de merolectina. Hololectinas são di ou multivalentes e, portanto aglutinam células e/ou precipitam glicoconjugados. A maior parte das lectinas de plantas enquadra-se nesse grupo. Quimerolectinas possuem um ou mais sítios de ligação a carboidratos ligados a um domínio não-relacionado. Esse domínio pode ter uma atividade enzimática bem-definida ou qualquer outra atividade biológica que atue independentemente do sítio de ligação a carboidrato. Assim como as hololectinas, as superlectinas consistem exclusivamente de pelo menos dois sítios de ligação a carboidratos. No entanto, diferentemente das hololectinas, os sítios de ligação a carboidratos das superlectinas reconhecem açúcares estruturalmente não relacionados. Portanto, as superlectinas podem ser consideradas como um grupo especial de quimerolectinas compostas de duas estruturas arranjadas sequencialmente com sítios de ligação a carboidratos funcionalmente diferentes (VAN DAMME *et al.*, 1998).

Sendo ubíquas, lectinas são encontradas desde vírus e bactérias até animais e por estarem envolvidas no reconhecimento de diversos eventos biológicos, estão diretamente relacionadas a processos como controle do tráfico intracelular de glicoproteínas, adesão de agentes infectantes a células hospedeiras, recrutamento de leucócitos em inflamações, assim como em interações celulares no sistema imune, em tumores malignos e metástases (LIS e SHARON, 1989).

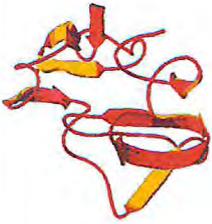
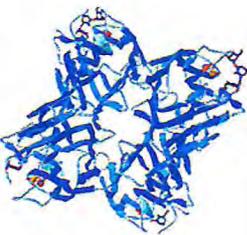
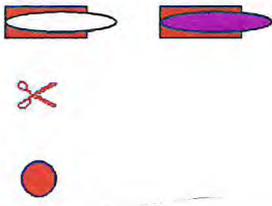
Merolectina	Hololectina	Quimerolectina	Superlectina
 <p data-bbox="336 992 448 1021">Heveína</p>	 <p data-bbox="627 996 715 1025">Con A</p>	 <p data-bbox="906 1003 994 1032">Ricina</p>	
			
<p data-bbox="287 1216 654 1245">Domínio carboidrato ligante</p> <p data-bbox="287 1294 518 1323"><i>Domínio catalítico</i></p> <p data-bbox="287 1384 670 1413"><i>Domínio ribossomo inativante</i></p>			

Figura 1.1. Classificação estrutural de lectinas. Representação esquemática de merolectinas (Heveína; PDB: 1Q9B), hololectinas (ConA; PDB: 1APN), quimerolectinas (Ricina; PDB: 2AAI) e superlectinas, estas últimas sem representantes com estrutura tridimensional elucidada.

1.3. Lectinas Vegetais

1.3.1. Aspectos Gerais e Classificação

Lectinas vegetais apresentam-se distribuídas em muitos grupos botânicos, incluindo mono- e dicotiledôneas, musgos e líquens, mas são muito mais frequentemente encontradas em Leguminosae e Euphorbiaceae (PUSZTAI, 1991). Elas podem existir em vários tecidos da mesma planta e têm diferentes localizações celulares e propriedades moleculares. As lectinas são mais abundantes nas sementes, porém podem facilmente ser encontradas em partes vegetativas. Em sementes de leguminosas estão prevalentemente nos tecidos cotiledonares (PUSZTAI, 1991).

A interação de lectinas com carboidratos é bastante específica, tanto quanto a interação entre uma enzima e seu substrato, ou antígenos com anticorpos. As lectinas podem ligar-se a açúcares livres ou polissacarídeos, glicoproteínas ou glicolípídeos que podem estar livres ou associados a membranas (PUSZTAI, 1991).

Muito do conhecimento da estrutura primária de lectinas vegetais foi obtido na última década através de extensivos estudos com lectinas purificadas de leguminosas. Aspectos comparativos, evolucionários e quimiotaxonômicos tiveram significativa importância para o entendimento do potencial funcional e das alterações genéticas durante a evolução das plantas (PEUMANS *et al.*, 2001).

Muitas funções têm sido propostas para as lectinas, tais como: proteção contra patógenos e insetos, transporte e armazenamento de carboidratos, reconhecimento celular (dentro da célula, entre células ou entre organismos), proteínas de reserva ou reguladores de crescimento (PUSZTAI, 1991).

As lectinas de plantas são classificadas em sete grupos de acordo com as semelhanças estruturais e evolutivas. Esses grupos são nomeados de lectinas de leguminosas, lectinas ligantes à quitina, lectinas de monocotiledôneas, proteínas inativadoras de ribossomo tipo 2 (RIP), lectinas de floema de Cucurbitaceae, família da Jacalina e das Amaranthaceae (Figura 1.2) (VAN DAMME *et al.*, 1998).

As lectinas de leguminosas têm como principal representante a lectina isolada de sementes de *Canavalia ensiformis* (ConA). Elas são estruturalmente relacionadas e requerem cátions divalentes em sítios ligantes a metal. Cada subunidade possui um íon Ca^{2+} e Mn^{2+} , que são essenciais para a atividade de ligação a carboidrato da

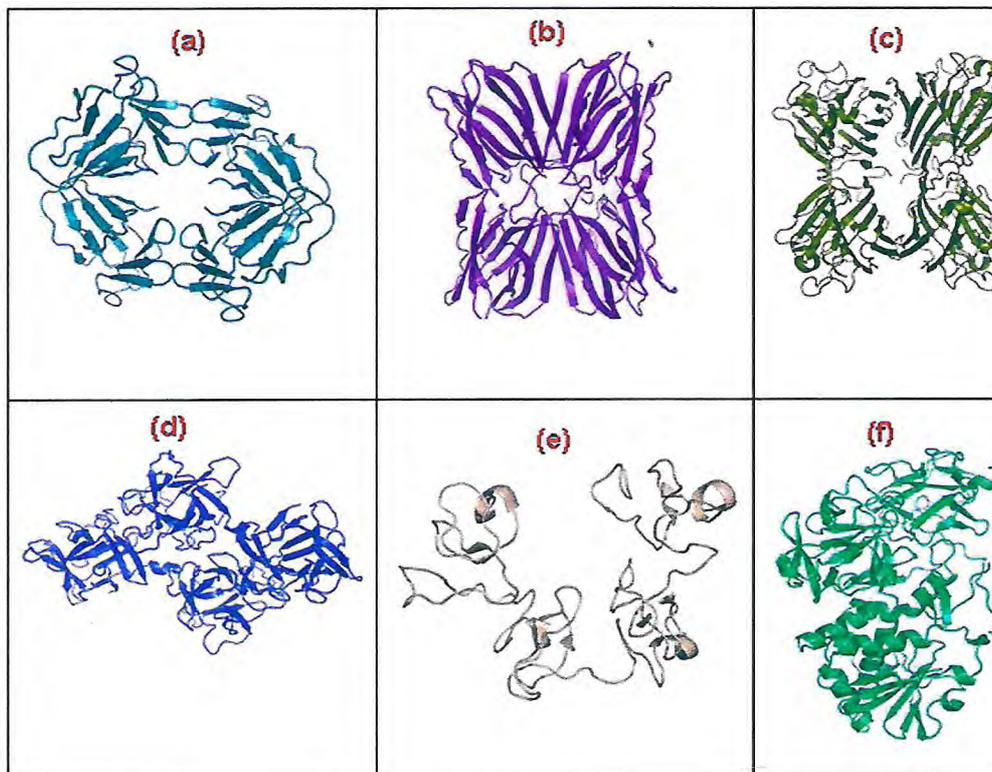


Figura 1.2. Classificação das lectinas vegetais. (a) Lectina de monocotiledôneas ligantes à manose, agglutinina de *Galanthus nivalis* (GNA) (b) Lectinas relacionadas às Jacalinas, Jacalina, (c) Lectinas de leguminosas, agglutinina de *Ulex europaeus* (UEA), (d) Amarantina, Amarantina, (e) Lectina ligante à quitina compostas por domínios heveínicos, Heveína (f) RIP's do tipo II, Abrina.

lectina. Os aminoácidos envolvidos na ligação desses íons são altamente conservados (VAN DAMME *et al.*, 1998).

A lectina de bulbos de *Galantus nivalis* (GNA) foi a primeira lectina de monocotiledônea ligante de manose a ser isolada e caracterizada (VAN DAMME *et al.*, 1987). Desde então, proteínas similares têm sido encontradas em espécies de monocotiledôneas, como nas famílias Amallyllidaceae, Alliaceae, Araceae, Liliaceae, Orchidaceae e Bromeliaceae (PEUMANS e VAN DAMME *et al.*, 1995).

As proteínas ligantes à quitina (polímero de *N*-acetil-glicosamina) contêm o chamado domínio heveína. O termo 'heveína' refere-se a uma pequena proteína de 43 resíduos de aminoácidos encontrada no látex da seringueira (*Hevea brasiliensis*) (WALJUNO *et al.*, 1975). As quitinases classe I, por exemplo, são quimerolectinas compostas de um único domínio heveína ligado a um domínio catalítico com atividade quitinásica (COLLINGE *et al.*, 1993). Estas lectinas também são encontradas em Gramineae, Solanaceae, Urticaceae, Papaveraceae e Amaranthaceae.

As proteínas inativadoras de ribossomos são quimerolectinas compostas de um polipeptídeo constituído de um domínio adenosina glicosidase (cadeia A) ligado ao domínio ligante a carboidrato (cadeia B) (STIRPE e BATTELLI, 2006). Ambas as cadeias são sintetizadas por uma única molécula precursora a qual é pós-transducionalmente processada através da excisão de uma ligação entre as cadeias A e B (VAN DAMME *et al.*, 1998; STIRPE e BATTELLI, 2006). A ricina (*R. communis*) e abrina (*A. precatorius*) são exemplos de RIP's tipo 2 com potentes atividades biológicas (VAN DAMME *et al.*, 1998).

A Jacalina é uma lectina específica à galactose de sementes da jaca (*Artocarpus integrifolia*). Lectinas de Moraceae são consideradas um grupo de lectinas que ocorrem excessivamente nesta particular família de plantas com características da jacalina. Por repetirem-se em lectinas de outras famílias de plantas, muito provavelmente, a família jacalina também é uma superfamília de lectinas que ocorrem em diferentes grupos taxonômicos.

Muitas espécies de Curcubitaceae contêm alta concentração de lectinas que ligam a oligômeros de GlcNAc (WANG *et al.*, 1994). Todas as lectinas conhecidas do floema de Curcubitaceae mostram um grau de similaridade seqüencial entre si, mas não tem qualquer similaridade seqüencial com outras lectinas de plantas ou proteínas (PEUMANS e VAN DAMME., 1998).

A clonagem molecular e a análise de difração de raios X revelaram que a amarantina, uma lectina de semente de *Amaranthus caudatus*, não se assemelha a qualquer outra lectina de plantas com relação a sua seqüência de aminoácidos ou à sua estrutura tridimensional (TRANSUE *et al.*, 1997). Baseado nestes dados, a amarantina é agora considerada como um protótipo da família de lectina amarantina, uma lectina ligante específica de N-acetil-galactosamina (VAN DAMME *et al.*, 1998).

1.3.2. Lectinas de Leguminosas

As lectinas de leguminosas constituem uma ampla família de proteínas estreitamente relacionadas, encontradas exclusivamente em espécies representativas da família Leguminosae (Fabaceae). Elas estão presentes em sementes, folhas, caules e raízes (SHARON e LIS, 1990; LORIS *et al.*, 1998).

A família das Leguminosas ocupa uma posição de destaque em relação às demais, quanto ao número de lectinas purificadas, pois a maioria das lectinas estudadas foi isolada de plantas de diferentes tribos desta família (SHARON e LIS, 1990). A ConA, lectina glicose/manose específica, é representante típico deste grupo. Lectinas de leguminosas são consideradas um modelo de estudo das bases moleculares das interações proteína-carboidrato devido a sua especificidade de ligação e facilidade de obtenção e purificação (LORIS *et al.*, 2004).

As lectinas de leguminosas têm uma estrutura monomérica conservada, apresentando extensiva similaridade seqüencial, ao mesmo tempo em que exibem uma notável variedade de associações quaternárias com importantes implicações funcionais (SRINIVAS *et al.*, 2001). As pequenas variações seqüenciais e no arranjo quaternário parecem significar diferenças importantes em testes de atividades biológicas *in vitro* e *in vivo*, como indução de edema de pata (BENTO *et al.*, 1993), migração peritoneal de macrófagos em ratos (RODRIGUEZ *et al.*, 1992) e estímulo da produção de linfócitos em humanos (BARRAL-NETO *et al.*, 1992).

1.3.3. Aspectos Estruturais

A determinação das estruturas primárias e terciárias de várias lectinas, associada às suas características físico-químicas, juntamente com a obtenção de complexos entre lectinas e carboidratos específicos permitiram diversos estudos detalhados a respeito de como se dá a interação entre os aminoácidos presentes nos sítios de ligação e os açúcares. Tais estudos estão sendo capazes de explicar as diferentes afinidades observadas na interação das lectinas com distintos carboidratos e está elucidando, em nível molecular, o mecanismo de ação de diversas atividades biológicas observadas para essa classe de proteínas (HAMERYLCK *et al.*, 1998).

Além de um sítio de ligação a carboidratos, altamente conservado, juntamente com um sítio de ligação a metais, que é responsável pela estabilização do *loop* que compõe o sítio de ligação a carboidratos, estudos recentes mostraram a capacidade dessas proteínas interagirem com compostos hidrofóbicos (DELATORRE *et al.*, 2007).

Seus sítios de ligação a carboidratos são formados pela contribuição de resíduos presentes em quatro de cinco *loops*. Três desses *loops* contêm um conjunto de resíduos bastante conservados, formando o sítio de ligação a monossacarídeo. Acredita-se que o 4º *loop* seja o determinante principal da especificidade a oligossacarídeos, uma vez que este é altamente variável em tamanho e composição (SHARMA e SUROLIA, 1997; LORIS *et al.*, 1998). A conformação desses *loops* é determinada pela presença de um íon cálcio estrutural e um metal de transição (mangânês) e a ausência desses elementos resulta em desenovelamento local e perda da capacidade de ligação a carboidratos (Figura 1.3) (LORIS *et al.*, 2004).

A capacidade de interação de lectinas com metabólitos especiais, como discutida por Delatorre *et al.* (2007), está focada na presença de um sítio conservado para a ligação do ácido α -amino butírico (Abu) na lectina de sementes de *Canavalia gladiata* (Figura 1.4A). Além disso, sítios de ligação com alta afinidade por adenina e por hormônios vegetais derivados da adenina também demonstram a capacidade de interação com moléculas hidrofóbicas (Figura 1.4B) (EDELMAN e WANG, 1978). A ligação a adenina foi descrita principalmente para lectinas

tetraméricas de leguminosas, incluindo as lectinas de *Dolichos biflorus* (DBL), *Phaseolus vulgaris* (PHA-E) e *Glycine max* (SBA) (BOUCKAERT *et al.*, 1999; HAMELRYCK *et al.*, 1999). A nova propriedade descrita para CGL, juntamente com o sítio de ligação a adenina, dão mais suporte para a hipótese que lectinas atuam nos mecanismos de defesa de plantas contra patógenos.

1.3.4. Lectinas da Subtribo Diocleinae

Lectinas do tipo ConA apresentam especificidade de ligação por α -D-manose ou α -D-glicose e a oligossacarídeos ou polissacarídeos contendo esses monossacarídeos. Entre as lectinas de leguminosas da sub-tribo Diocleinae, somente aquelas isoladas de sementes de *Canavalia ensiformis* (HARDMAN e AINSWORTH, 1972), *C. brasiliensis* (GRANGEIRO *et al.*, 1997), *C. maritima* (GADELHA *et al.*, 2005), *C. gladiata* (DELATORRE *et al.*, 2007), *Dioclea grandiflora* (ROZWARSKI *et al.*, 1998), *D. guianensis* (GOMES *et al.*, 1994) e *Cratylia mollis* (SOUZA *et al.*, 2003) tiveram suas estruturas cristalográficas resolvidas. Embora este grupo de lectinas apresente um elevado grau de similaridade, a substituição de alguns resíduos-chave confere a estas lectinas a capacidade de desempenhar um vasto espectro de atividades biológicas.

As lectinas de *C. brasiliensis* (ConBr) e ConA apresentam uma diferença de apenas dois resíduos dos 237 que constituem o monômero. Aparentemente, é esta diferença mínima que resulta numa variação de atividades biológicas *in vivo* e *in vitro* para ambas as lectinas.

A lectina de *Canavalia maritima* apresenta capacidade de induzir uma maior liberação de óxido nítrico em células do endotélio de anéis de aorta de rato quando comparada com a ConA, um efeito explicado pela diferença em somente um resíduo de aminoácido (GADELHA *et al.*, 2005). A mudança em um único aminoácido na posição 202 (Ser na ConM e Pro na ConA) leva a uma alteração conformacional no sítio de ligação a carboidratos através do posicionamento da His205, que permite a aproximação da Tyr12, estendendo o sítio de ligação a carboidratos em relação à ConA (Figura 1.5A). Estudos subsequentes do complexo ConM-dissacarídeos revelaram com detalhes as bases moleculares desta interação, confirmando que a

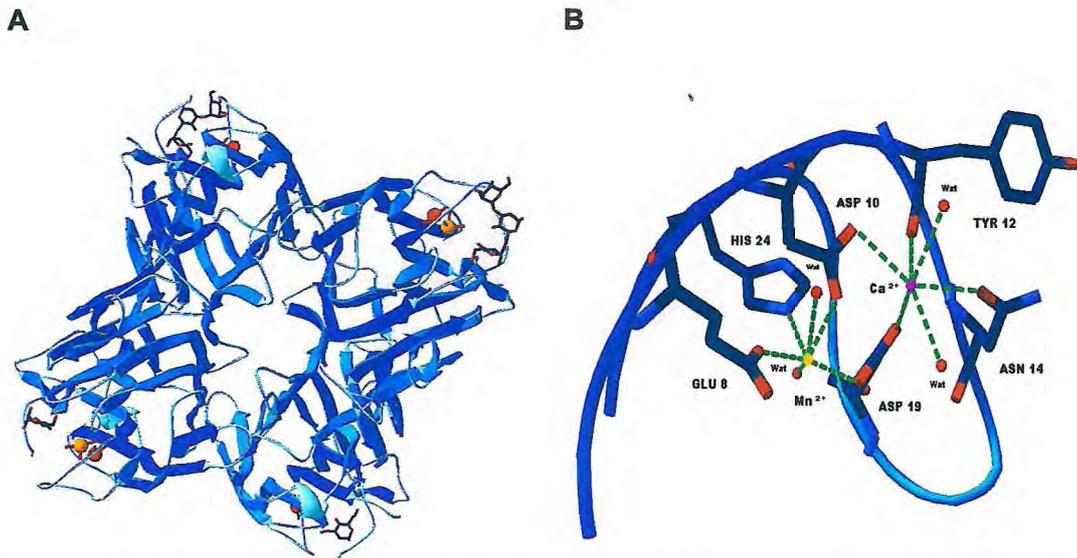


Figura 1.3. Lectina de *Canavalia ensiformis* (1CVN) (NAISMITH e FIELD, 1996).
(a) Visão geral da estrutura quaternária da lectina com os sítios de ligação a açúcar interagindo com um trimanosídeo. (b) Sítio de ligação a metais de transição (Ca^{2+} e Mn^{2+}) e interações que estabilizam o sítio de ligação ao carboidrato.

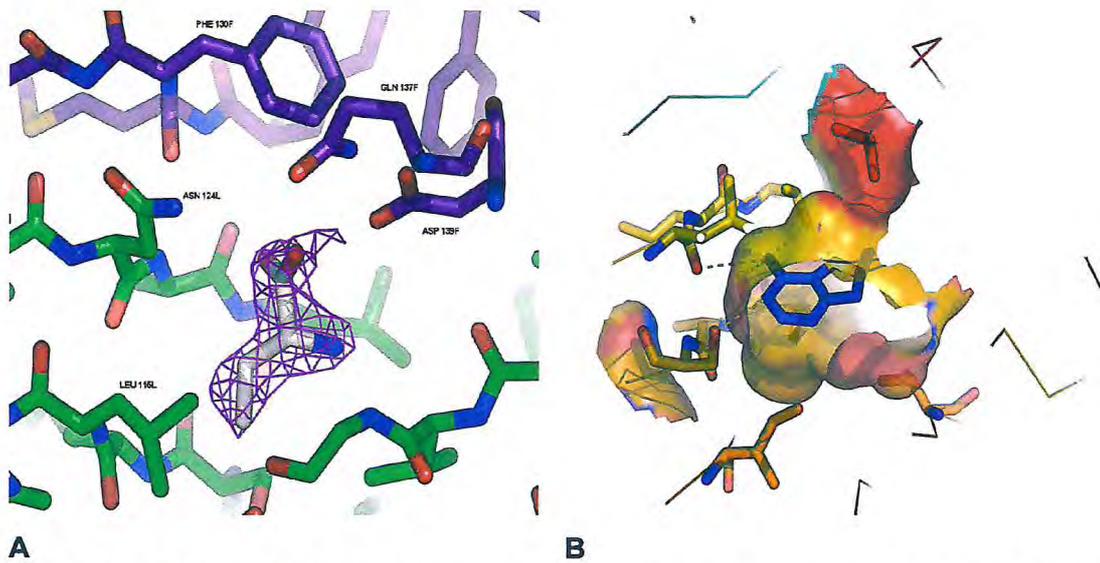


Figura 1.4. Sítios de ligação a compostos do metabolismo vegetal. (a) Sítio de ligação ao aminoácido não-protéico ácido α -aminobutírico na lectina de *Canavalia gladiata* (PDB: 1WUV). **(b)** Sítio hidrofóbico de ligação à adenina da lectina de *Dolichos biflofus* (PDB: 1BLQ).

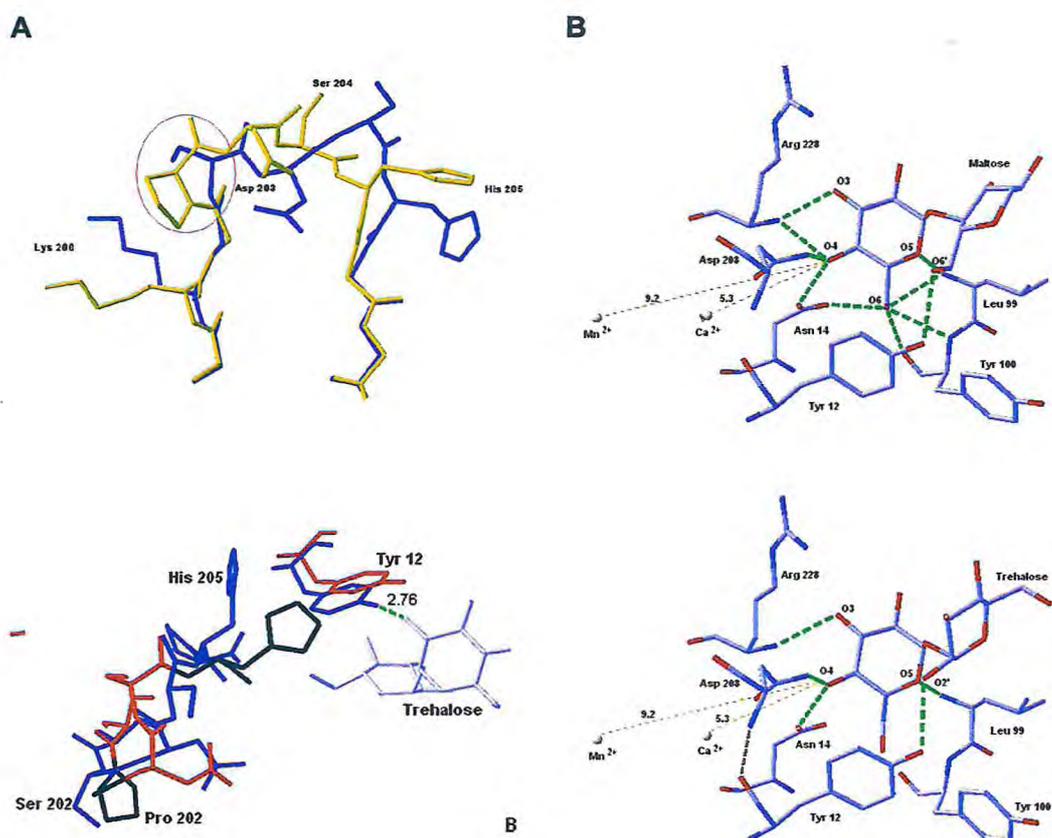


Figura 1.5. Aspectos estruturais da lectina de *Canavalia maritima* (ConM). (a) Alinhamento das estruturas da ConM (PDB 2CWM) (Amarelo) e ConA (1GKB) (Azul), evidenciando a diferença no resíduo 202 (acima) que causa uma alteração na posição da His205; esta modificação altera por redução do impedimento estérico a aproximação da Tyr12 (abaixo) na formação do sítio de ligação a carboidratos da ConM permitindo uma maior interação com dissacarídeos (PDB 2CY6, 2CYF). (b) Sítio de ligação a dissacarídeos maltose (acima) e trealose (abaixo) da ConM, com os detalhes da formação de pontes de hidrogênio (verde) que favorecem a interação.

mais distal em relação ao sítio (Figura 1.5B) (DELATORRE *et al.*, 2006).

Além disso, algumas lectinas isoladas de uma mesma planta (*p.e.* lectinas de *Dioclea lehmanni*) apresentaram essas variações na atividade biológica, bem como na especificidade por açúcares. Algumas dessas lectinas também apresentam seqüências distintas (PEREZ *et al.*, 1990; GOWDA *et al.*, 1994; PEREZ, 1998) ou arranjos quaternários distintos (HAMELRYCK *et al.*, 2000; GADELHA *et al.*, 2005) quando comparadas com lectinas tipo ConA, mesmo apresentando uma elevada homologia genética (PEREZ, 1998). A lectina de *Dolichos lablab*, por exemplo, contém tanto uma lectina glicose/manose específica, como uma galactose específica (MO *et al.*, 1990).

Muitas lectinas contêm subunidades idênticas; estas são as lectinas de uma cadeia, típicos tetrâmeros com massas moleculares de ~120.000 Da (4 x 30.000 Da). As lectinas que apresentam duas subunidades diferentes (*p.e.* lectinas da tribo Viciaeae) e a lectina de sementes de *Dolichos biflorus* (DBL), que é um heterotetrâmero (GOWDA *et al.*, 1994), são algumas notáveis exceções.

Lectinas isoladas de diócleas são conhecidas por apresentarem um conjunto de cadeias polipeptídicas, o que mostra que o produto do gene é clivado em um processamento pós-traducional para formar duas outras cadeias em um segundo grupo de terminações. Essas cadeias são então fundidas em uma única cadeia por ligação peptídica, um tipo de permutação circular de seqüência (CARRINGTON *et al.*, 1975; CUNNINGHAM *et al.*, 1979). Lectinas tipo ConA são inicialmente sintetizadas como um precursor de alta massa molecular que sofre clivagem pós-traducional (HIGGINS *et al.*, 1983). A clivagem no resíduo 123 é comum para várias lectinas; contudo, o segundo sítio de clivagem, que resulta na geração de duas outras cadeias, pode ocorrer em diferentes sítios (GOWDA *et al.*, 1994).

Estudos de seqüências de lectinas de Diocleinae têm mostrado que este processo tão bem descrito em lectinas tipo ConA, provavelmente, não ocorre em algumas dessas lectinas (PEREZ *et al.*, 1990; PEREZ, 1998), o que pode explicar as frequentes diferenças de afinidade apresentadas por proteínas isoladas de uma mesma semente. A determinação da seqüência de aminoácidos e a resolução de estruturas dessas lectinas têm sido utilizadas como forma de entendimento desta diferença na especificidade de proteínas isoladas de espécimes da mesma tribo e para obter informações acerca de sua origem evolutiva (GOWDA *et al.*, 1994).

1.3.4.1. Lectinas de Sementes de *Cymbosema roseum*

A lectina de *Cymbosema roseum* (CRLI) foi purificada por cromatografia de afinidade em um único passo em coluna de Sepharose-4B-manose. CRLI apresenta atividade hemaglutinante contra eritrócitos de coelho não tratados e tratados com papaína e tripsina. Esta atividade hemaglutinante é bastante similar às atividades reportadas para lectinas da subtribo Diocleinae. Testes de inibição mostraram que a manose é o açúcar simples mais potente na inibição desta atividade (19,5 mM) (CAVADA *et al.*, 2006).

A seqüência N-terminal (ADTIVAVELDSYPNTDIGDPSYPH) é bastante similar a outras lectinas de Diocleinae, apresentando similaridade de 100 % com *Dioclea lehmanni* I (PEREZ *et al.*, 1990) e *Canavalia brasiliensis* (MOREIRA e CAVADA, 1984) e de 92% com *D. grandiflora* (MOREIRA *et al.*, 1983), ConA (HAGUE, 1975) e *Cratylia floribunda* (OLIVEIRA *et al.*, 1991). A massa molecular aparente da lectina, determinada por SDS-PAGE, indica que ela é composta por cadeias polipeptídicas de massas moleculares de aproximadamente 30, 18 e 12 kDa (CAVADA *et al.*, 2006).

Análises dos extratos utilizados na purificação da CRLI mostraram a presença de uma segunda lectina inibida por lactose. As variações estruturais que levam à diferenças de afinidade nas lectinas são um ponto de amplo estudo na lectinologia. Portanto, a possibilidade de estudo estrutural dessas duas lectinas as torna um excelente modelo para a compreensão de variações na afinidade de outras lectinas isoladas das mesmas fontes.

Nesse intuito, cristais da CRLI foram obtidos por difusão de vapor (CAVADA *et al.*, 2006). A elucidação da seqüência completa de aminoácidos e a resolução das estruturas tridimensionais das duas lectinas são fundamentais para estabelecer as bases moleculares das variações de afinidade observadas entre elas.

1.3.5 Lectinas da Subfamília Mimosoidae

A maioria dos estudos de lectinas de leguminosas tem envolvido membros da tribo Phaseoleae, da subfamília Papilionoideae. Investigações de lectinas de outras duas subfamílias, Caesalpinoideae e Mimosoideae, são escassas. Na subfamília Mimosoideae, somente lectinas de sementes de *Parkia speciosa*

(SUVACHITTANONT e PEUTPAIBOON, 1992), *P. javanica* (UTARABHAND e AKKAYANONT, 1995), *P. platycephala* (CAVADA *et al.*, 1997; CAVADA *et al.*, 2005), *P. discolor* (CAVADA *et al.*, 2000) foram isoladas e caracterizadas bioquimicamente. Recentemente, um novo gênero tem sido incluído nesse restrito grupo de lectinas isoladas de mimosoídeas; a lectina de *Acacia constricta*, apresentando três isolectinas (VL2-VL4). Análises por imunoenaios mostraram que os peptídeos obtidos da digestão dessas lectinas apresentavam grande similaridade com seqüências de diferentes lectinas do gênero *Phaseolus* (GUZMAN-PARTIDA *et al.*, 2004). Marcadamente, poucos dados estruturais de lectinas de Mimosoideae têm sido determinados e, desta forma, a caracterização estrutural dessas lectinas permanece obscura. Apenas as estruturas cristalográficas da lectina de *P. platycephala* nativa (PPL) (1ZGR) (GALLEGO DEL SOL *et al.*, 2005a) e em complexo com 5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-manose (1ZGS) (GALLEGO DEL SOL *et al.*, 2005b) estão disponíveis.

1.3.5.1. Lectina da Fração Albumina de Sementes de *Acacia farnesiana*

A. farnesiana é um membro da família das leguminosas da subfamília Mimosoideae. O gênero *Acacia* inclui aproximadamente 1350 espécies que são encontradas em regiões tropicais e subtropicais. A *Acacia farnesiana* é citada na literatura popular e vem sendo utilizada em várias partes do mundo como antiespasmódico, afrodisíaco, antiinflamatório e no combate a diarreia, reumatismo e câncer de estômago (PINTO *et al.*, 2000). A lectina de *A. farnesiana* (AFAL) foi purificada a partir da fração albumina do extrato protéico solúvel e estudos constataram que ela apresenta uma estreita relação sequencial com lectinas do gênero *Phaseolus*. A possível afinidade por quitina caracterizada apenas por cromatografia de afinidade, uma oligomerização tempo dependente com base em equilíbrios dinâmicos do tipo monômero-dímero-tetrâmero, além de atividades importantes contra o nematóide *Meloidogyne incognita*, reduzindo em aproximadamente 90 % a eclosão de ovos, e bactérias Gram negativa, *Xanthomonas axopodis* pv. *Passiflorae*, e Gram positiva, *Clavibacter michiganensis michiganensis*. Além dessas atividades contra possíveis patógenos, a lectina apresenta ainda ações antinociceptivas, pró-inflamatória e de agregação plaquetária (SANTI-GADELHA, 2005).

Correlações estruturais podem favorecer a compreensão dos mecanismos de oligomerização da AFAL, permitindo, também, uma melhor caracterização da afinidade e da relação filogenéticas das proteínas do gênero, e dos mecanismos de ação envolvidos nas atividades biológicas descritas previamente.

1.3.5.2. Quitinase com Atividade Hemaglutinante de Sementes de *Parkia platycephala*

Os tecidos das sementes podem acumular constitutivamente, ou após indução, uma ampla série de compostos que conferem resistência contra fitófagos predadores e infecções por vírus, bactérias, fungos, nematóides, etc. (KOIWA *et al.*, 1997). Uma alternativa ao uso extensivo de inseticidas pode ser a exploração dos mecanismos de defesa da própria planta, pela manipulação da expressão de suas proteínas endógenas de defesa, ou introduzindo genes derivados de outras plantas capazes de regular o controle de agentes infecciosos (PUNJA, 2001).

As proteínas relacionadas à patogênese, incluindo as quitinases e as β -1,3-glucanases, são produzidas pelas plantas em resposta a infecções microbiais. Estas enzimas hidrolisam quitina e glicanos das paredes celulares de fungos (BOLLER, 1985). Entre as proteínas de plantas mais bem conhecidas envolvidas em mecanismos de defesa se encontram as glicohidrolases (quitinases, glucanases), lectinas, proteínas inativadoras de ribossomos RIPs tipo 1 e 2, inibidores de enzimas proteolíticas, entre outras (PEUMANS e VAN DAMME, 1995).

As quitinases são consideradas como uma das principais proteínas envolvidas no mecanismo de defesa da planta, sendo sugerida sua participação na resposta contra o ataque de fungos fitopatogênicos, agindo sinergicamente com as β -1,3-glucanases (CASTELLÓN, 2004).

As quitinases (EC 3.2.14) catalisam a clivagem hidrolítica de ligações β -1,4-glicosídica presentes em biopolímeros de N-acetilglicosamina, principalmente na quitina que é o principal componente do exoesqueleto de fungos e invertebrados (PATIL *et al.*, 2000). Em plantas, as quitinases têm um papel importante na defesa do organismo contra o ataque de patógenos (HAMEL e BELLEMARE, 1995; HEIL *et al.*, 2000).

A especificidade por quitina não é uma exclusividade das quitinases. As proteínas denominadas de lectinas que se ligam à quitina ou lectinas do tipo heveína também apresentam afinidade por resíduos de *N*-acetilglicosamina embora não sejam capazes de catalisar a hidrólise da quitina (VAN DAMME *et al.*, 1998).

A família das lectinas que se ligam à quitina é amplamente distribuída no reino vegetal. De acordo com a definição de lectinas, as quitinases da classe I são lectinas (quimerolectinas) devido à presença de um domínio heveínico quitina ligante na região N-terminal (COLLINGE *et al.*, 1993).

Proteínas do tipo heveína já foram isoladas do látex da seringueira *Hevea brasiliensis* (Euforbiaceae), sementes de *Amaranthus caudatus* (Amaranthaceae) e de frutos e sementes de *Sambucus nigra* (Caprifoliaceae) (VAN DAMME *et al.*, 1998). As lectinas ligantes a quitina também são amplamente distribuídas na família das gramíneas (PEUMANS e STINISSEN, 1983) e solanáceas. Lectinas aglutinantes quitina ligantes são encontradas em raízes e folhas de *Phytolacca sp.* (Phitolacaceae), sementes e rizomas de *Urtica dioica* (Urticaceae), sementes de *Chelidonium majus* (Papaveraceae) e em tecidos vegetativos de *Viscum album* (Viscaceae) (VAN DAMME *et al.*, 1998).

Dentro da classificação das PR-proteínas, as quitinases se localizam em quatro de dezesseis famílias (NEUHAUS *et al.*, 1996; VAN DAMME *et al.*, 2007). A família PR-3 inclui quitinases das classes Ia, Ib, II, IV, VI e VII, as quitinases da classe III pertencem as PR-8, e as quitinases da classe V às PR-11. Adicionalmente, na família PR-4, algumas proteínas com baixa atividade endoquitinásica foram encontradas entre proteínas quitina ligantes (MELCHERS *et al.*, 1994; VAN DAMME *et al.*, 2007).

A quitinase ácida de *Brassica juncea* apresenta estrutura distinta das quitinases previamente estudadas, devido à presença de dois sítios de ligação à quitina (ZHAO e CHYE, 1999). Esta proteína, quando expressa em batata (*Solanum tuberosum*), levou à conclusão que esta parece ser a precursora da aglutinina de *Urtica dioica* (UDA) e um fator importante no aumento da resistência da planta a infecções fúngicas em sinergia com β -1,3-glucanases (CHYE *et al.*, 2004). A capacidade de aglutinar células nesta quitinase deve-se à presença de um domínio extra de ligação à quitina e confere, possivelmente, uma vantagem sobre as outras quitinases no desempenho de sua atividade antimicrobiana (CHYE *et al.*, 2004). Ao mesmo passo, a quimera de UDA e da quitinase de tabaco apresenta-se como uma

quimerolectina com atividade quitinásica (DOES e CORNEELISSEN, 1999) e estudos mutagênicos realizados na quitinase de tabaco também indicam a capacidade de tornar o domínio catalítico em um domínio ligante à quitina (ISELIGAMBONI, 1998).

A quitinase isolada de sementes de *Parkia platycephala* (PPL2) é capaz de aglutinar eritrócitos e apresenta efeitos inibitórios *in vitro* sobre o crescimento de bactérias fitopatogênicas *Xanthomonas axonopodis* pv. *passifloreae* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, além de reduzir a eclosão e mobilidade de nematóides da espécie *M. incognita* (CASTELLÒN, 2004).

A capacidade de hemaglutinação, assim como as propriedades de interação com carboidratos como a quitina, denota claramente características próprias de lectinas vegetais, sugerindo, portanto, a existência na estrutura da molécula de um provável domínio do tipo lectínico. De outro lado, a homologia que apresenta com proteínas da família das glicosilhidrolases, notadamente com as quitinases da classe III, sugere também a possibilidade desta proteína apresentar na sua estrutura um domínio catalítico (CASTELLÒN, 2004).

Estas considerações conduzem à hipótese de que a PPL2 seja uma proteína quimérica, embora a literatura considere como exemplos clássicos de proteínas quiméricas algumas quitinases da classe I, as RIP's tipo 2 e algumas proteínas de solanáceas como proposto por Van Damme *et al.* (1998).

1.4. Estrutura Tridimensional de Lectinas de Leguminosas

Lectinas de leguminosas, normalmente, são compostas de 2 ou 4 subunidades, iguais ou diferentes, e com massa molecular em torno de 25 a 30 kDa. Cada uma destas subunidades apresenta um único sítio de ligação a carboidratos com a mesma especificidade. Frequentemente, estas subunidades são compostas por uma cadeia polipeptídica e sua união é estabelecida por forças não covalentes, como ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas e eletrostáticas, formando dímeros canônicos e estabilizando o tetrâmero pela união destes dímeros. Entretanto, existem algumas lectinas que possuem subunidades formadas por 2 cadeias polipeptídicas como as lectinas da tribo Viciaeae, gêneros *Pisum*, *Vicia*, *Lathyrus* e *Lens*, que possuem cadeias polipeptídicas leves denominadas de α (5 a 7 kDa) e cadeias pesadas denominadas β (15 a 19 kDa). Estas lectinas são dímeros

formados por duas subunidades iguais e cada subunidade é constituída de uma cadeia α e uma cadeia β mantidas por ligações não-covalentes (SHARON e LIS, 1989).

As estruturas dos monômeros de diferentes lectinas de leguminosas são extremamente similares e podem ser descritas como um β -sanduíche rígido, consistindo de seis folhas β (atrás) e outro curvado de sete folhas β (frente), além de uma terceira pequena folha β , consistindo de cinco folhas ligadas por duas maiores (BANERJEE *et al.*, 1996; HAMELRYCK *et al.*, 1998; BRINDA *et al.*, 2004).

O sítio de ligação a carboidratos está localizado no lado côncavo do β -sanduíche, próximo ao sítio de ligação a metais. O sítio de reconhecimento a carboidratos consiste de diversos *loops* com diferentes graus de variabilidade (SHARMA e SUROLIA, 1997). As conformações destes *loops* são determinadas pela presença de íons de metais, como o cálcio e o manganês, na estrutura (BOUCKAERT *et al.*, 1995; LORIS *et al.*, 1998; BOUCKAERT *et al.*, 2000; LESCAR *et al.*, 2002). A ausência desses metais resulta em uma instabilidade local e na perda da capacidade de ligar-se a carboidratos (LORIS *et al.*, 2004). A arquitetura em β -sanduíche também deve ser especializada em gerar uma série de variantes de estruturas quaternárias, as quais são importantes pela ligação de epítomos multivalentes a carboidratos (HAMELRYCK *et al.*, 1998).

Os arranjos terciários e quaternários de lectinas são complexos, especialmente em lectinas de leguminosas. Embora essas lectinas, independente da especificidade por carboidratos, apresentem elevada similaridade na seqüência primária e no dobramento tridimensional da subunidade estrutural, suas estruturas quaternárias são marcadamente variadas (HAMELRYCK *et al.*, 1998; BRINDA *et al.*, 2004) (Figura 1.6).

Baseando-se nos arranjos quaternários, as lectinas de leguminosas têm sido classificadas em nove tipos, compostos por sete diferentes interfaces diméricas.

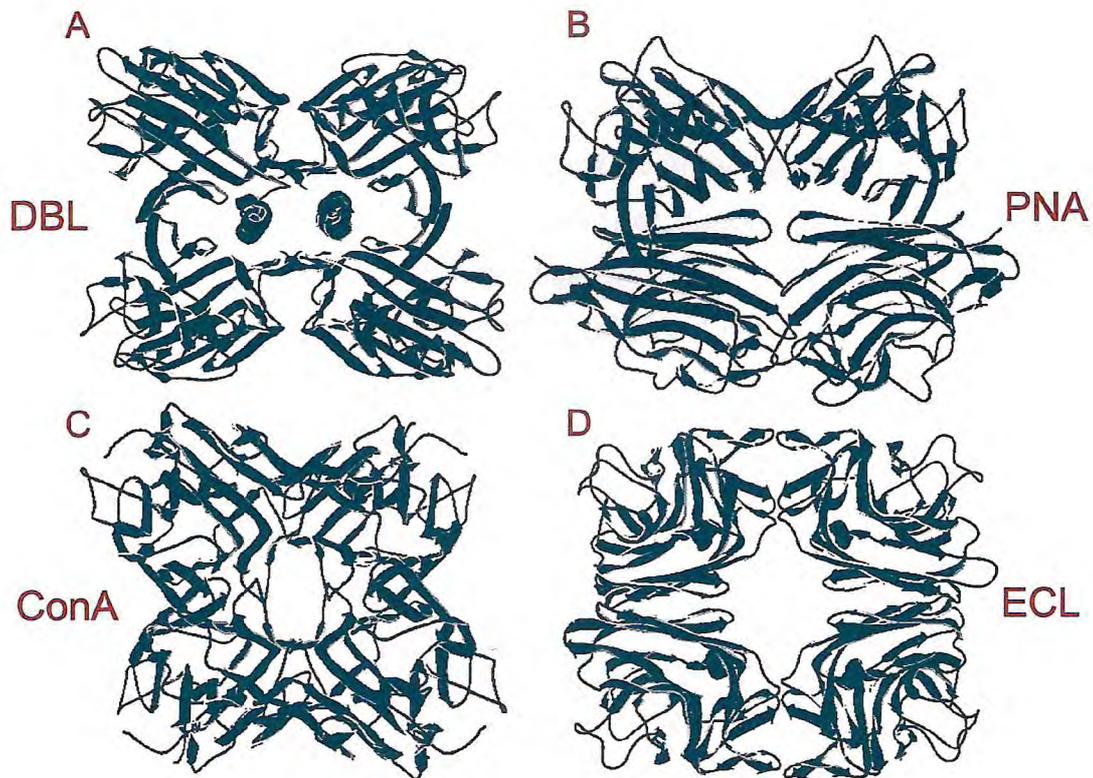


Figura 1.6. Estruturas quaternárias de lectinas vegetais. Quatro principais arranjos oligoméricos descritos para lectinas vegetais; DBL (lectina de *Dolichos biflorus*), PNA (aglutinina de *Arachis hypogaea*), ConA (lectina de *Canavalia ensiformis*) e ECL (lectina de *Erythrina cristagalli*).

Entre eles destacam-se o dímero canônico (Concanavalina A), o dímero da lectina de *Dolichos biflorus* (DB58), da lectina de *Erythrina corallodendrum* (ECon), GS-I e GS-IV (isoformas de *Griffonia simplicifolia*), além de uma interface incomum encontrada na lectina de *Arachis hypogaeae* (PNA) (BRINDA *et al.*, 2007). Um outro arranjo pode ser observado na lectina de sementes de *Lotus tetragonolobus* (PDB: 2EIG).

Os dímeros canônicos consistem de dois monômeros associados através da formação de uma estrutura contínua de doze folhas β estendidas e de duas das folhas da região posterior do monômero ao longo de todo o dímero. Esta estrutura quaternária aparece em lectinas de *Lens culinaris* (HAMELRYCK *et al.*, 1998). A ConA consiste de dois dímeros canônicos que empacotam um contra o outro através de sua região central em um ângulo de quase 90° e a interface consiste principalmente de interações eletrostáticas.

A aglutinina de *Arachis hypogaeae* (PNA) forma um tetrâmero que pode ser considerado uma associação de dois dímeros do tipo GS4; que são formados por monômeros semelhantes aos da isoforma 4 da lectina de *Griffonia simplicifolia* (BANERJEE *et al.*, 1996). Eles associam-se através da formação do dímero canônico formado por um monômero de cada dímero. Finalmente, o tetrâmero da lectina de *Dolichos biflorus* (DB58) pode ser visto de duas formas; como um dímero de dois dímeros canônicos ou como um dímero de dois dímeros DB58, característicos da DB58 (Figura 1.6) (HAMELRYCK *et al.*, 1998; BRINDA *et al.*, 2007).

Esses arranjos também apresentam equilíbrios na formação de suas estruturas quaternárias de acordo com o pH e tempo de incubação em diferentes ambientes e condições. Alguns estudos analisam esses eventos por ultracentrifugação. Um exemplo é a lectina de *C. floribunda* (bCFL), na qual foi observada uma dependência de pH para a formação da estrutura tetramérica da lectina. Na bCFL, a Asn131 faz um contato intradimérico com os resíduos Asn122 e Ala123 dependendo do pH em que se encontra (GALLEGO DEL SOL *et al.*, 2006). Em comparação, um resíduo de histidina na posição 131 da lectina de *D. grandiflora* estabelece uma rede de interações interdiméricas que une os *loops* centrais de todos os monômeros, estabilizando uma estrutura tetramérica independente de pH, portanto, as pontes de hidrogênio formadas nessa interação não são rompidas facilmente por variações de pH (ROZWARSKI *et al.*, 1998).

1.5. Referências Bibliográficas

1. BANERJEE, R., DAS, K., RAVISHANKAR, R., SUGUNA, K., SUROLIA, A., VIJAYAN, M. (1996). Conformation, Protein-Carbohydrate Interactions and a Novel Subunit Association in the Refined Structure of Peanut Lectin-Lactose Complex. *J. Mol. Biol.*, 259: 281-296.
2. BANERJEE, R., MANDE, S.C., GANESH, V., DAS, K., DHANARAJ, V., MAHANTA, S. K., SUGUNA, K., SUROLIA, A., VIJAYAN, M. (1994). Crystal Structure of Peanut Lectin, A Protein with an Unusual Quaternary Structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 227-231.
3. BARRAL-NETO, M., SANTOS, S.B.; BARRAL, A., MOREIRA, L.I.M., SANTOS, C.F., MOREIRA, R.A., OLIVEIRA, J.T.A., CAVADA, B.S. (1992) Human lymphocyte stimulation by legume lectins from the Diocleae tribe. *Immunology Investigation*, 21: 297-303.
4. BENTO, C.A. M.; CAVADA, B.S., OLIVEIRA, J.T.A., MOREIRA, R.A., BARJAFIDALGO, C. (1993). Rat paw edema and leukocyte immigration induced by plant lectins. *Agent Actions*, 38: 48-54.
5. BOUCKAERT, J., DEWALLEF, Y., POORTMANS, F., WYNS, L., LORIS, R. (2000). The structural features of concanavalin A governing non-proline peptide isomerization. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 19778–87.
6. BOUCKAERT, J., HAMELRYCK, T.W., WYNS, E., LORIS, R. (1999) Novel structures of plant lectins and their complexes with carbohydrates. *Current Opinion in Structural Biology*, 9:572–577
7. BOUCKAERT, J., LORIS, R., POORTMANS, F., WYNS, L. (1995). Crystallographic structure of metal-free concanavalin A at 2.5 Å resolution. *Proteins: Structure, Functions and Genetics*, 23: 510–40.
8. BRINDA, K.V., MITRA, N., SUROLIA, A., VISHVESHWARA, S. (2004). Determinants of quaternary association in legume lectins. *Protein Science*, 13: 1735-1749.
9. CARRINGTON, D.M., AUFFRET, A., HANKE, D.E. (1985). Polypeptide ligation occurs during post-translational modification of concanavalin A. *Nature*, 313, 64-67.

10. CASTELLÓN, R.E.R. Purificação e caracterização parcial de uma nova proteína de sementes de *Parkia platycephala* Benth com potencial na defesa de plantas, 2004. Tese de Doutorado.
11. CAVADA, B.S., CASTELLÓN, R.E.R., VASCONCELOS, G.G., ROCHA, B.A.M., BEZERRA, G.A., DEBRAY, H., DELATORRE, P., NAGANO, C.S., TOYAMA, M.H., PINTO, V.P.T., MORENO, F.B.M.B., CANDURI, F., DE AZEVEDO, W.F.JR. (2005). Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a new chitin-binding protein from *Parkia platycephala* seeds. *Acta Crystallographica Section F*, 61: 841-843.
12. 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*). *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 30: 271-280
13. CAVADA, B.S., MARINHO, E.S., SOUZA, E.P., BENEVIDES, R.G., DELATORRE, P., SOUZA, L.A., NASCIMENTO, K.S., SAMPAIO, A.H., MORENO, F.B., RUSTIGUEL, J.K., CANDURI, F., DE AZEVEDO JR., W.F., DEBRAY, H. (2006). Purification, partial-characterization and preliminary X-ray diffraction analysis of a mannose-specific lectin from *Cymbosema roseum* seeds. *Acta Crystallographica Section F*, 62: 235-7.
14. CAVADA, B.S., SANTOS, C.F., GRANGEIRO, T.B., SILVA, L.I.M.M., CAMPOS, M.J.O., SOUSA, F.A.M., CALVETE, J.J. (1997). Isolation and partial characterization of a Lectin from *Parkia platycephala* Benth seeds. *Physiology and Molecular Biology of Plant*, 3: 109-115.
15. CHEYE, M.L., ZHAO, K.J., HE, Z.M., RAMALINGAM, S., FUNG, K.L. (2005). An agglutinating chitinase with two chitin-binding domains confers fungal protection in transgenic potato. *Planta*, 220:717-30.
16. COOLINGE, D.B., KRAGH, K.M., MIKKELSEN, J.D., NIELSEN, K.K., RASMUSSEN, U., VAD, K. (1993) Plant chitinases. *Plant Journal*, 3: 31-40.
17. CUNNINGHAM, B.A., HEMPERLY, J.J., HOPP, T.P., EDELMAN, G.M. (1979). Favin versus concanavalin A: Circularly permuted amino acid sequences. *Proceedings of National Academy Society*, 76: 3218-3222.
18. DELATORRE, P., ROCHA, B. A. M., GADELHA, C. A. A., SANTI-GADELHA, T., CAJAZEIRAS, J. B., SOUZA, E. P., NASCIMENTO, K. S., FREIRE, V. N.,

- ALEXANDRE H. SAMPAIO, S. H., AZEVEDO, W. F., CAVADA, B.S. (2006) Crystal structure of a lectin from *Canavalia maritima* (ConM) in complex with trehalose and maltose reveals relevant mutation in ConA-like lectins. *J Struct Biol.*, 154, 280-6.
19. DELATORRE, P., ROCHA, B. A. M., SOUZA, E. P., OLIVEIRA, T.M., BEZERRA, G.A., MORENO, F.B., FREITAS, B.T., SANTI-GADELHA, T., SAMPAIO, A. H., AZEVEDO JR., W. F., CAVADA, B. S. (2007). Structure of a lectin from *Canavalia gladiata* seeds: new structural insights for old molecules *BMC Struct. Biol.*, 7: 52.
20. DOES, M.P., CORNELISSEN, B.J.C. (1999). A chimera of *Urtica dioica* agglutinin and tobacco chitinase displays both agglutination and chitinase activity. *Plant Science*, 148: 121-129.
21. EDELMAN, G.M., WANG, J.L. (1978) Binding and functional properties of Concanavalin A and its derivatives. *J. Biol. Chem.*, 253, 3016-3022.
22. FRENZEL, A., TILLER, N., HAUSE, B., KRAJINSKI, F. (2006) The conserved arbuscular mycorrhiza-specific transcription of the secretory lectin MtLec5 is mediated by a short upstream sequence containing specific protein binding sites. *Planta*, 224: 792-800.
23. GADELHA, C.A.A., MORENO, F.B.M.B., SANTI-GADELHA, T., CAJAZEIRAS, J.B., ROCHA, B.A.M., ASSREUY, A.M.S., MOTA, M.R.L., PINTO, N.V., MEIRELES, A.V.P., BORGES, FREITAS, B.T., CANDURI, F., SOUZA, E.P., DELATORRE, P., CRIDDLE, D.N., DE AZEVEDO, W.F. JR., CAVADA, B.S. (2005). Native crystal structure of a nitric oxide-releasing lectin from the seeds of *Canavalia maritima*. *Journal of Structural Biology*, 152: 185-194.
24. GALLEGU DEL SOL, F., CAVADA, B.S., CALVETE, J.J. (2006). Crystal structures of *Cratylia floribunda* seed lectin at acidic and basic pHs. New insights into the structural basis of the pH-dependent dimer-tetramer transition. *Journal of Structural Biology*, 158: 1-9.
25. GALLEGU DEL SOL, F., NAGANO, C., CAVADA, B.S., CALVETE, J.J. (2005a). The first crystal structure of a mimosoideae lectin reveals a novel quaternary arrangement of a widespread domain. *Journal of Molecular Biology*, 353: 574-583.
26. GALLEGU DEL SOL, F., GOMEZ, J., HOOS, S., NAGANO, C.S., CAVADA, B.S., ENGLAND, P., CALVETE, J.J. (2005b). Energetics of 5-bromo-4-chloro-3-

- indolyl- α -D-mannose binding to the *Parkia platycephala* seed lectin and its use for MAD phasing. Acta Crystallographica Section F, 61: 326-31.
27. GENG, J.G. (2003) Interaction of vascular endothelial cells with leukocytes, platelets and cancer cells in inflammation, thrombosis and cancer growth and metastasis. Acta Pharmacol Sin., 24:1297-300
28. GOMES, J.C., FERREIRA, R.R., CAVADA, B.S., MOREIRA, R.A., OLIVEIRA, J.T. (1994). Histamine release induced by glucose (mannose)-specific lectins isolated from Brazilian beans. Comparison with Concanavalin A. Agents Actions, 41(3-4): 132-5.
29. GOWDA, L.R., SAVITHRI, H.S., RAO, D.R. (1994). The complete primary structure of a unique mannose/glucose-specific lectin from field bean (*Dolichos lab lab*). Journal of Biological Chemistry, 269: 18789-93.
30. GRANGEIRO, T.B., SCHRIEFER, A., CALVETE J.J., RAIDÁ, M., URBANKE, C., BARRAL-NETTO, M., CAVADA, B.S. (1997). Molecular cloning and characterization of ConBr, the lectin of *Canavalia brasiliensis* seeds. European Journal of Biochemistry, 248(1): 43-48.
31. GUZMAN-PARTIDA, A.M., ROBLES-BURGUENO, M.R., ORTEGA-NIEBLAS, M., VAZQUEZ-MORENO, I. (2004). Purification and characterization of complex carbohydrate specific isolectins from wild legume seeds: *Acacia constricta* is (vinorama) highly homologous to *Phaseolus vulgaris* lectins. Biochimie, 86: 335-42.
32. HAGUE, D.R. (1975). Studies of storage proteins of higher plants. Plant Physiol. 55, 636-642.
33. HAMELRYCK, T.W., LORIS, R., BOUCKAERT, J., WYNS, L. (1998) Properties and structure of the legume lectin family. Trends in Glycoscience and Glycobiology, 10: 349-404.
34. HAMELRYCK, T.W., LORIS, R., BOUCKAERT, J., DAO-THÍ, M.H., STRECKER, G., IMBERTY, A., FERNANDEZ, E., WYNS, L., ETZLER, M.E. (1999) Carbohydrate binding, quaternary structure and a novel hydrophobic binding site in two legume lectin oligomers from *Dolichos biflorus*. J Mol Biol., 286: 1161-77.
35. HAMELRYCK, T.W., MOORE, J.G., CHRISPPEELS, M.J., LORIS, R., WYNS, L. (2000). The role of weak protein-protein interactions in multivalent lectin-

- carbohydrate binding: crystal structure of cross-linked FRIL. *Journal of Molecular Biology*, 299: 875-883.
36. HAMMEL, F., BELLEMARE, G. (1995) Characterization of class I chitinase gene and of wound-inducible, root and flower-specific chitinase expression in *Brassica napus*. *Biochemistry and Biophysics Acta*, 1263: 212-220.
37. HARDMAN, K. D., AINSWORTH, C. F. (1972). Structure of concanavalin A at 2.4 Å resolution. *Biochemistry*, 11: 4910-4919.
38. HEIL, M., STAEHELIN, C., MCKEY, D. (2000). Low chitinase activity in *Acacia myrmecophytes*: a potential trade-off between biotic and chemical defences? *Naturwissenschaften*, 87:555–558.
39. HIGGINS, T.J.V., CHANDLER, P.M., ZURAWSKI, G., BUTTON, S.C., SPENCER, D. (1983). The biosynthesis and primary structure of pea seed lectin. *Journal of Biological Chemistry*, 258: 9544-9549.
40. ISELI-GAMBONI, B., BOLLER, T., NEUHAUS, J. (1998). Mutation of either of two essential glutamates converts the catalytic domain of tobacco class I chitinase into a chitin-binding lectin. *Plant Science*, 134: 45–51.
41. KOIWA, H., BRESSAN, R.A., HASEGAWA, P.M. (1997). Regulation of proteinase inhibitor and plant defense. *Trends in Plant Science*, 2: 379-384.
42. LESCAR, J., LORIS, R., MITCHELL, E., GAUTIER, C., CHAZALET, V. COX, V., WYNS, L., PEREZ, S., BRETON, C., IMBERTY, A. (2002). Isolectins I-A and I-B of *Griffonia (Bandeiraea) simplicifolia*. Crystal structure of metal-free GS I-B(4) and molecular basis for metal binding and monosaccharide specificity. *Journal of Biological Chemistry*, 277: 6608-14.
43. LESLIE, A.G.W. (1992). Joint CCP4 + ESF-EAMCB Newsletter on Protein Crystallography, 26.
44. LIU, W., NICHOLS, A.F., GRAHAM, J.A., DUALAN, R., ABBAS, A., LINN, S. (2000). Nuclear transport of human DDB protein induced by ultraviolet light. *J Biol Chem.*, 275: 21429-34.
45. LORIS, R., VAN WALLE, I., DE GREVE, H., BEECKMANS, S., DEBOECK, F., WYNS, L., BOUCKAERT, J. (2004). Structural basis of oligomannose recognition by the *Pterocarpus angolensis* seed lectin. *Journal of Molecular Biology*, 335(5):1227-40.
46. MELCHERS, L.S., APOTHEKER-DE GROOT, M., VAN DER KNAAP, J.A., POSTEIN, A.S., SALA-BUURLAGE, M.B., BOL, J.F., CORNELISSEN, B.J.C.,

- VAN DER ELZEN, P.J.M., LINTHORST, H.J.M. (1994). A new class of tobacco chitinases homologous to bacterial exo-chitinases displays antifungal activity. *Plant J.*, 5: 469-80.
47. MO, H., LIN, Z., SUN, C. (1990). Lectins: Biology, Biochemistry. *Clinical Biochemistry*, Vol. 7, pp. 3540, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO.
48. MOREIRA, R.A., CAVADA, B.S. (1984). Lectin from *Canavalia brasiliensis* (MART.). Isolation, characterization and behavior during germination. *Biologia Plantarum*, 26, 113-120.
49. MOREIRA, R.A., BARROS, A.C.H., STEWART, J.C., PUSZTAI, A. (1983). Isolation and characterization of a lectin from the seeds of *Dioclea grandiflora* (Mart.) *Planta*, 158, 63-69.
50. MURDOCK, L.L., SHADE, R.E. (2002) Lectins and protease inhibitors as plant defenses against insects. *J Agric Food Chem.*, 50: 6605-11.
51. NEUHAUS, J.M., FRITIG, B., LINTHORST, H.J.M., MEINS Jr., F., MIKKELSEN, J.D., RYALS, J. (1996). A revised nomenclature for chitinase genes. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 14: 102-104.
52. 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. Bot.*, 14, 63-68.
53. PATIL, R.S. GHORMADE, V.V., DESHPANDE, M.V. (2000). Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme Microb. Technol.*, 26: 473-483.
54. PEREZ, G. (1998). Isolation and characterization of a novel lectin from *Dioclea lehmanni* (Fabaceae) seeds. *International Journal of Biochemistry. Cell Biology*, 30: 843-53.
55. PEREZ, G., HERNANDEZ, M., MORA, E. (1990). Isolation and characterization of a lectin from the seeds of *Dioclea lehmanni*. *Phytochemistry*, 29: 1745-9.
56. PEUMANS, W. J., VAN DAMME, E.J.M. (1995). Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiology*, 109: 347-352.
57. PEUMANS, W. J., BARRE, A., HAO, Q., ROUGÉ, P., VAN DAMME, E. J. M. (2000). Higher plants developed structurally different motifs to recognize foreign glycans. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 12 (64): 83-101.
58. PEUMANS, W.J., STINISSEN, H.M. Gramineae lectins: occurrence, molecular biology, and physiological function. In: *Chemical Taxonomy, Molecular Biology*

- and Function of Plant Lectins. pp 99-116. Goldstein, I.J., ETZler, m.e. (Eds.) Allan, R. LISS Inc., New York, 1983.
59. PEUMANS, W.J., VAN DAMME, E.J. (1998). Plant lectins: specific tools for the identification, isolation, and characterization of O-linked glycans. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol., 33:209-58.
60. PEUMANS, W.J., VAN DAMME, E.J., BARRE, A., ROUGÉ, P. (2001). Classification of plant lectins in families of structurally and evolutionary related proteins. Adv. Exp. Med. Biol., 491:27-54.
61. PINTO, J.E.B.P., SANTIAGO, E.A., LAMEIRA, O.A. Compêndio de plantas medicinais. Lavras: UFLA/FAEPE, 2000; 208 pp.
62. PUNJA, Z.K. (2001) Genetic engineering of plants enhances resistance to fungal pathogens – a review of progress and future prospects. Can. J. Plant Pathol., 23: 216-235.
63. PUSZTAI, A. Plant lectins. Cambridge University Press, Cambridge, 1991.
64. RODRIGUEZ, D., CAVADA, B.S., OLIVEIRA, J.T.A., MOREIRA, R.A., RUSSO, M. (1992). Differences in macrophage stimulation and leukocyte accumulation in response to intraperitoneal administration of glucose/mannose-binding plant lectins. Brazilian Journal of Medical Biology Research, 25: 823-826.
65. ROZWARSKI, D.A., SWAMI, B.M., BREWER, C.F., SACCHETTINI, J.C. (1998). Crystal structure of the lectin from *Dioclea grandiflora* complexed with core trimannoside of asparagine-linked carbohydrates. Journal of Biological Chemistry, 273(49): 32818-25.
66. SANTI-GADELHA, T. Isolamento, Purificação, Caracterização e atividade biológica da lectina da fração das albuminas de *Acacia farnesiana* (L.) Wild (Leguminosae-Mimosoidae), 2005. Tese de Doutorado.
67. SHARMA, V., SUROLIA, A. (1997). Analyses of carbohydrate recognition by legume lectins: size of the combining site loops and their primary specificity. Journal of Molecular Biology, 267: 433–445.
68. SHARON, N., LIS, H. (1989). LECTINS. 126 pp., Chapman and Hall, London.
69. SHARON, N., LIS, H. (1990). Legume lectins - a large family of homologous proteins. FASEB Journal, 4: 3198-3208.
70. SOUZA, G.A., OLIVEIRA, P.S.L., TRAPANI, S., SANTOS, A.C.O., ROSA, J.C., LAURE, H.J., FAÇA, V.M., CORREIA, M.T.S., TAVARES, G.A., OLIVA, G.,

- COELHO, L.C.B.B., GREENE, L.J. (2003). Amino acid sequence and tertiary structure of *Cratylia mollis* seed lectin. *Glycobiology*, 13: 961-972.
71. SRINIVAS, V. R., REDDY, G.B., AHMAD, N., SWAMINATHAN, C.P., MITRA. N., SUROLIA, A. (2001) Legume lectin family, the “natural mutants of the quaternary state”, provide insights into the relationship between protein stability and oligomerization. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1527: 102–111.
72. STIRPE, F., BATTELLI, M.G. (2006). Ribosome-inactivating proteins: progress and problems. *Cell Mol. Life Sci.*, 63: 1850-66
73. STOUT, G.H., JENSEN, L.H. X-Ray Structure Determination – A practical Guide.
74. SUVACHITTANONT, W., PEUTPAIBOON A. (1992). Lectin from *Parkia speciosa* seeds. *Phytochemistry*, 319: 4065-70.
75. TÖPFER-PETERSEN, E., CALVETE, J.J. (1996) Sperm-associated protein candidates for primary zona pellucida-binding molecules: structure-function correlations of boar spermadhesins. *J Reprod Fertil Suppl.*, 50: 55-61.
76. TOSCANO, M.A., ILARREGUI, J.M., BIANCO, G.A., CAMPAGNA, L., CROCI, D.O., SALATINO, M., RABINOVICH, G.A. (2007) Dissecting the pathophysiologic role of endogenous lectins: glycan-binding proteins with cytokine-like activity? *Cytokine Growth Factor Rev.*, 18: 57-71.
77. TRANSUE, T.R., SMITH, A.K., MO, H., GOLDSTEIN, I.J., SAPER, M.A. (1997). Structure of benzyl T-antigen disaccharide bound to *Amaranthus caudatus* agglutinin. *Nat. Struct. Biol.*, 4:779-83
78. UTARABHAND, P., AKKAYANONT, P. (1995). Purification of a lectin from *Parkia javanica* beans. *Phytochemistry*, 38: 281-285.
79. 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. *Critical Reviews in Plant Science*, 17(6): 575-692.
80. VAN DAMME, E.J.M., CULERRIER, R., BARRE, A., ALVAREZ, R., ROUGÉ, P., PEUMANS, W.J. (2007). A Novel Family of Lectins Evolutionarily Related to Class V Chitinases: An Example of Neofunctionalization in Legumes. *Plant Physiology*, 144: 662–672.
81. VASTA, G.R., AHMED, H., DU, S., HENRIKSON, D. (2004) Galectins in teleost fish: Zebrafish (*Danio rerio*) as a model species to address their biological roles in development and innate immunity. *Glycoconj J.*, 21: 503-21.

82. WALJUNO, K., SCHOLMA, R.A., BIENTEM, J., MARIONO, A., HAHN, A.M. (1975). Amino acid sequence of heveine. Proc. Int. Rubber Conf., Kuala Lumpur, 2:518-531.
83. ZHAO, K.J., CHYE, M.L. (1999). Methyl jasmonate induces expression of a novel *Brassica juncea* chitinase with two chitin-binding domains. Plant Molecular Biology, 40: 1009-18.

Capítulo 2: Estudos Estruturais das
Lectinas de Sementes de *Cymbosema*
roseum

Capítulo 2. Estudos Estruturais das Lectinas de Sementes de *Cymbosema roseum*.

2.1.Introdução

Alguns grupos de lectinas são excelentes ferramentas para o estudo das relações estrutura/função. A propriedade peculiar de reconhecer e ligar-se especificamente a carboidratos tem tornado estas proteínas um excelente meio de diagnóstico na pesquisa médica (SHARON e LIS, 2003).

Habitualmente, pesquisas envolvendo lectinas estão focadas em sua habilidade de interagir com açúcares específicos, considerando que a especificidade possa indicar diferentes atividades biológicas (CAVADA *et al.*, 2001). Normalmente, lectinas isoladas de uma mesma espécie têm especificidade por carboidratos relacionados. Contudo, diferentes lectinas isoladas da mesma planta (e.g. *Dioclea lehmanni*) têm mostrado distintas propriedades biológicas, bem como especificidade por açúcares diferentes, não podendo ser descartado que elas também apresentam seqüências de aminoácidos (GOWDA *et al.*, 1994; PEREZ *et al.*, 1990; PEREZ *et al.*, 1998) ou até mesmo arranjos quaternários distintos (HAMELRYCK *et al.*, 2000; GADELHA *et al.*, 2005), quando comparadas com lectinas tipo ConA, apesar da elevada homologia genética que apresentam (PEREZ *et al.*, 1998). *D. lablab* contém uma lectina glicose/manose-específica (KUMAR e RAO, 1986) e uma outra galactose-específica (MO *et al.*, 1990).

Espécies de Papilionoideae, especialmente as do gênero *Erythrina*, apresentam lectinas com especificidade por galactose. Alguns exemplos são *Erythrina velutina* (MORAES *et al.*, 1996), *E. coralodendrum* (SAPER *et al.*, 1987), *E. cristagalli* (IGLESIAS *et al.*, 1982) *E. indica* (KONOZY *et al.*, 2002) e *E. speciosa* (KONOZY *et al.*, 2003). As estruturas cristalográficas das lectinas de *E. coralodendrum* (EcorL) e *E. cristagalli* (ECL) em complexo com carboidratos foram resolvidas e confirmaram a especificidade por lactose. Lectinas de leguminosas específicas por galactose também são encontradas na subfamília Caesalpinoideae, como a lectina de *Bauhinia variegata* var. *candida* (BVcL), cujos testes de inibição mostraram que a BVcL é inibida por lactose, galactose, galactosamina e outros derivados de galactosídeos (SILVA *et al.*, 2007).

Entre as lectinas de plantas, as sementes de leguminosas que contêm pelo menos duas lectinas distintas são *Dioclea lehmanni* (PEREZ *et al.*, 1990; PEREZ *et al.*, 1998), *Dolichos lablab* (GOWDA *et al.*, 1994), *Griffonia simplicifolia* (GOLDSTEIN e WINTER, 1999; ZHU *et al.*, 1996) e *Vicia cracca* (RUDIGER, 1977; BAUMANN *et al.*, 1979), as quais apresentam diferenças de seqüência primária. A maturação de lectinas de sementes de *Diocleinae* envolve um mecanismo complexo de processamentos pós-traducionais, que incluem a deglicosilação dependente da clivagem proteolítica do precursor no sítio carboxil no resíduo interno de Asn e posterior religação, que resulta nos fragmentos beta e gama em ordem invertida em relação à seqüência genética codificada (CARRINGTON *et al.*, 1985).

As diferenças relatadas na especificidade e nas seqüências já descritas, no entanto, indicam a existência de genes distintos ou ainda de lectinas que não passem pelo processamento descrito por Carrington *et al.* (1985). A lectina manose específica de *C. roseum*, isolada e caracterizada por Cavada *et al.* (2006) e a presença de uma outra lectina lactose específica nos mesmos extratos protéicos de sementes desta leguminosa despertou interesse. Como, hipoteticamente, o processamento pós-traducional, conhecido como permutação circular, que ocorre em lectinas do tipo ConA, não ocorre em algumas lectinas isoladas de espécies dessa mesma subtribo, a determinação da seqüência de aminoácidos e a resolução de estruturas dessas lectinas têm sido utilizadas como forma de entendimento da diferença na especificidade de proteínas isoladas de espécimes da mesma tribo e para obter informações da origem evolutiva das lectinas através de relações filogenéticas baseadas na similaridade destas seqüências (GOWDA *et al.*, 1994).

2.2. Objetivos *

Objetivo Geral

Caracterizar estruturalmente as lectinas de sementes de *Cymbosema roseum*

Objetivos Específicos

Determinar a afinidade a carboidratos da CRLII.

Purificar as lectinas CRLI e CRLII por cromatografia de afinidade.

Determinar a estrutura primária das lectinas.

Determinar a presença e a composição de monossacarídeos presentes nas glicosilações da proteína CRLII.

Cristalizar as lectinas de sementes de *Cymbosema roseum*.

Resolver a estrutura tridimensional da CRLI por cristalografia de raios X.

2.3. Material e Métodos

2.3.1. Purificação das Lectinas de *Cymbosema roseum* (CRLI e CRLII)

Sementes de *C. roseum* foram trituradas para obtenção da farinha, que passou por um processo de extração em NaCl 0,15 M (1:10, m/v), sob agitação constante durante 4 horas, à temperatura ambiente. A solução foi então centrifugada a 10000 x g, por 20 minutos a 5 °C. O sobrenadante foi aplicado em uma coluna de Sepharose-4B-manose (0,5 x 10 cm), equilibrada com NaCl 0,15 M contendo CaCl₂ 5 mM e MnCl₂ 5 mM, para obtenção da lectina manose específica (CRLI). A CRLI foi eluída com glicina 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 2,6. O eluído foi exaustivamente dializado contra água grau MilliQ e liofilizado (CAVADA *et al.*, 2006). O isolamento e purificação da lectina CRLII (lactose específica) foram realizados através do mesmo procedimento, substituindo apenas a coluna de afinidade por uma outra contendo lactose ligada a Sepharose-4B. A purificação das duas lectinas foi monitorada por SDS-PAGE, como descrita por Laemmli (1970), e utilizadas nos ensaios de hemaglutinação e inibição, espectrometria de massas e cristalização.

2.3.2. Ensaios Hemaglutinantes e de Inibição da Atividade Hemaglutinante da CRLII

A atividade hemaglutinante e os testes de inibição da atividade hemaglutinante foram conduzidos em placas de microtitulação usando procedimentos padrões (FARIA *et al.*, 2004). A atividade hemaglutinante da CRLII foi determinada utilizando eritrócitos de coelho tratados e não tratados com enzimas proteolíticas. As células não tratadas foram preparadas através da lavagem dos eritrócitos por três vezes em solução de NaCl 0,15 M e, então, ressuspensos a uma concentração de 2 % (v/v) em NaCl 0,15 M. No preparo das células tratadas com enzimas, os eritrócitos foram incubados com papaína ou tripsina (0,1 %) por 30 minutos a 37 °C. As células tratadas foram lavadas três vezes em NaCl a 0,15 M e ressuspensas para uma concentração final de 2 % (v/v) em NaCl 0,15 M. Os testes de hemaglutinação foram conduzidos através de diluições seriadas da solução da lectina em tampão fosfato salino (PBS pH 7,6), cada diluição com um volume final de 0,2 mL. Uma alíquota de 0,2 mL da suspensão de eritrócitos a 2 % foi adicionada a

cada diluição.* As placas foram suavemente agitadas e deixadas por 1 hora e 30 minutos em temperatura ambiente. Após esse período, o grau de aglutinação macroscópico foi medido.

Os testes de inibição foram realizados utilizando soluções estoque de monossacarídeos obtidos na Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA) em NaCl 0,15 M (α -D-glicose, α -D-manose, α -D-galactose, α -D-lactose, α -L-fucose, N-acetil- α -D-galactosamina, N-acetil- α -D-glucosamina e N-acetil- α -D-lactosamina), N-glicoproteínas (serotransferrina humana, serotransferrina humana desializada e lactotransferrina bovina) e O-glicoproteínas (fetuína bovina, asialofetuína bovina, mucina submaxilar bovina, mucina de estômago de porco, mucina submaxilar ovina e mucina submaxilar ovina desializada). As glicoproteínas foram isoladas pelo grupo do Laboratoire de Chimie Biologique et Unité Mixte de Recherche (Université des Sciences et Technologies de Lille, França). Uma diluição em série foi realizada para cada substância inibitória em NaCl 0,15 M contendo 5 mM de CaCl_2 e 5 mM de MnCl_2 . Assim, cada diluição apresentou um volume final de 0,2 mL. As amostras de CRLII foram diluídas em NaCl 0,15 M para obtenção de uma solução contendo atividade de 4 unidades de hemaglutinação por mL (a maior diluição de CRLII que é capaz de aglutinar eritrócitos, i.e., o título é assim definido por conter uma unidade de hemaglutinação por mL). Alíquotas (0,2 mL) da lectina diluída (4 unidades) foram adicionadas a cada uma dos poços da série de inibidores diluídos. As placas foram deixadas em temperatura ambiente por 1 hora antes de serem adicionados aos poços 0,2 mL da suspensão de células de sangue de coelho a 2% em condições nativas e tratadas com enzimas. As placas foram deixadas em temperatura ambiente por mais 1 hora antes de serem observadas quanto à atividade hemaglutinante. O título da inibição foi determinado como a maior diluição do inibidor capaz de inibir a hemaglutinação produzida por 4 unidades de hemaglutinação da amostra de CRLII.

2.3.3. Caracterização por Espectrometria de Massas e Análise das Glicosilações da CRLII

Determinação da Massa da Proteína Intacta

A massa molecular e o incremento de massa da proteína glicosilada da CRLII foram determinados por espectrometria de massas em MALDI-TOF, utilizando espectrômetro PE Biosystems Voyager DE-PRO, operando a uma voltagem de 20 kV no modo linear. A amostra foi misturada a uma matriz de ácido sinapínico para propiciar a ionização a Laser. O incremento de massa correspondente ao carboidrato ligado covalentemente a CRLII foi determinado utilizando ferramentas de estudo proteômico do *SwissProt*, que evidenciam a composição da glicosilação a partir das massas obtidas por espectrometria de massas e predizem a estrutura dos glicanos referentes as massas experimentais (GlycoMod software) (Cooper *et al.*, 2001; Cooper *et al.*, 2003).

Composição de Carboidratos

Os N-glicanos foram clivados da CRLII por hidrólise automática utilizando um instrumento Glycoprep 1000 (Nmode, Oxford Glycosystems). Após a metanólise, re-N-acetilação e trimetilsilanização, os monossacarídeos foram analisados de acordo com as metil glicosidases correspondentes por cromatografia gasosa em cromatógrafo Carlo Erba Mega Series em coluna capilar de 30 m DB1 (Chaplin, 1982).

2.3.4. Seqüenciamento de Aminoácidos das Lectinas (CRLI e CRLII)

Digestão Enzimática e Separação de Peptídeos

As proteínas foram suspensas em bicarbonato de amônio 100 mM pH 8,6 (1:1 m/v) e agitadas por 1 minuto. Cada solução de proteína foi misturada a uma solução de tripsina de pâncreas bovino (2 mg.mL^{-1}) na proporção de 25 $\mu\text{L/mL}$ de solução protéica e incubada por 3 horas a 37 °C. CRLI e CRLII ressuspensas separadamente em 100 mM de bicarbonato de amônio, pH 8,6, (1:1 m/v) foram

degradadas com endoproteinase Asp-N de *Pseudomonas fragi* por 8 h a 37 °C e a mesma proporção da lectina foi ressuspensa em 50 mM de Tris-HCl pH 8,0 e digerida com Glu-C de *Staphylococcus aureus* por 16 h a 25°C. A razão enzima:substrato para AspN e Glu-C foi de 1:50 e 1:20 (m/m), respectivamente. As reações foram centrifugadas a 13.000 x g por 10 min, sobrenadantes e precipitados foram separados e secos utilizando Speed-Vac e os peptídeos foram isolados por HPLC, em coluna C18 (tamanho da partícula de 5 µm) de fase reversa, eluídos a um fluxo de 1 mL/min, com um gradiente de 0,1 % de ácido trifluoracético em água (solução A) e acetonitrila (solução B), isocraticamente, (5 % B) por 5 min, seguido por 5-40 % B por 60 minutos, e finalmente 40-70 % B por 20 min. Os peptídeos obtidos nas três digestões foram submetidos a sequenciamento por espectrometria de massas em tandem e todas as enzimas foram obtidas na Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA).

Sequenciamento por Degradação de Edman da CRLII

Um gel de poliacrilamida (15 %) foi montado com amostras de CRLII como descrito por Laemmli (1970). A proteína foi transferida para membranas de PVDF por 4 horas a 1 mÅ/cm² (Kyshe-Andersen *et al.*, 1984) e os *blots* foram corados com 0,1 % de Ponceau S Dye Red (Salinovich e Montelaro, 1986). As bandas protéicas foram excisadas, descoradas com água e submetidas ao sequenciamento N-terminal utilizando um seqüenciador protéico de fase líquida pulsada 477A (Applied Biosystems) com um analisador de PTH-aminoácidos, seguindo as instruções descritas pelo fabricante. O mesmo processo foi realizado para os peptídeos oriundos das digestões protéicas previamente descritas.

Sequenciamento Protéico por Espectrometria de Massas em tandem da CRLI e CRLII

O sequenciamento das proteínas foi obtido por digestão com tripsina, Glu-C e AspN. As amostras de peptídeos digeridos, isolados por fase reversa, foram diluídas 100x com água Milli-Q™, injetadas em uma fonte de ionização nano-electrospray e analisadas em um espectrômetro Micromass™ quadrupolo com tempo de vôo da Waters™ (Massachusetts, USA) com resolução 8.000 e uma acurácia de 10 ppm

(LC-Q-ToF-MS⁺-MS). Os dados dos espectros foram processados utilizando o programa Biolynx 4.0. Os peptídeos foram sequenciados com o software ProteinLynx e com o auxílio do programa MASCOT.

As análises por alinhamentos de seqüência foram feitas utilizando os programas ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) e BLAST (Altschul *et al.*, 1997) para comparar as seqüência de CRLI e CRLII com todo o banco não redundante de proteínas depositadas no *National Center of Biotechnology Information* (NCBI).

2.3.5. Cristalografia de Raios X

2.3.5.1. Cristalização das Proteínas

As proteínas foram cristalizadas através do método de difusão de vapor em gota suspensa. As melhores condições de cristalização foram testadas utilizando o método da matriz esparsa (JANCARIK e KIM, 1991), com o objetivo de encontrar mais de uma condição favorável ao crescimento de cristais da proteína.

A lectina CRLI liofilizada foi ressuspensa a uma concentração de 12 mg.mL⁻¹ em Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, contendo 0,5 mM CaCl₂ e MnCl₂ e utilizada para cristalização. A condição de cristalização utilizada e a metodologia seguiram a descrição dada por Cavada *et al.* (2006). Cristais foram obtidos em gotas contendo Tris-HCl 100 mM, pH 7,8, 8 % (m/v) PEG 3.350 e prolina a 0,2 M. Os cristais de CRLI cresceram em um mês com dimensões máximas de aproximadamente 0.8 x 0.4 x 0.4 mm.

A lectina CRLII liofilizada também foi ressuspensa a uma concentração de 12 mg.mL⁻¹ em Tris-HCl 10 mM, pH 7,6, contendo 1,0 mM CaCl₂ e MnCl₂, e utilizada para cristalização. A busca por condições de cristaliação para CRLII foi feita em placas Linbro a 293 K utilizando os screens de cristalização Crystal Screen I e II (Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA). As gotas foram compostas de volumes iguais (2 µL) de solução da proteína e solução de cristalização equilibradas contra 500 µL da solução de cristalização.

2.3.5.2. Coleta*de Dados da Difração de Raios X

Os cristais foram levados ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron para coleta de dados de difração de raios X na estação experimental D03B-MX1. A estação é equipada com placa de detecção MarCCD e opera a um comprimento de onda de raios X de 1,43 Å. Os dados da difração de raios X foram coletados de cristais resfriados a uma temperatura de 100 K. Para prevenir a formação de gelo, os cristais foram banhados em uma solução crioprotetora contendo 70 % da solução de cristalização contida no poço e 30 % de glicerol e foram então transportados para a linha de raios X através de laços de metal. Um conjunto completo de dados foi obtido a partir do uso de uma placa de imagem CCD (MAR Research). Os dados foram coletados a uma distância de 70 mm do detector e continha 120 imagens (1° de oscilação). Os dados de difração foram indexados, integrados e escalonados utilizando os programas MOSFLM (LESLIE, 1992) e SCALA (CCP4, 1994), respectivamente.

2.3.5.3. Resolução da Estrutura Cristalográfica da CRLI

Os dados de difração de raios X integrados pelo programa MOSFLM (LESLIE, 1992) tiveram sua qualidade aferida pelo programa SCALA (*Collaborative Computational Project, Number 4*, 1994). O método da substituição molecular foi utilizado para solucionar o problema da fase e propiciar a obtenção da densidade eletrônica com o posicionamento correto do modelo utilizado. Os modelos foram escolhidos a partir dos alinhamentos da seqüência N-terminal das proteínas com o banco de dados de proteínas não redundantes (NCBI) e, posteriormente, também tendo sido utilizados nessa determinação os dados obtidos com o sequenciamento total das proteínas. A estrutura inicial da CRLI resolvida por substituição molecular foi feita usando o programa MolRep (VAGIN e TEPLYAKOV, 2000) do pacote de programas CCP4. Este programa faz a procura dos melhores picos no mapa de Patterson, que verifica as distâncias interatômicas, através do cálculo de funções rotação e translação. A melhor solução para cada modelo foi selecionada de acordo com o coeficiente de correlação e com o R_{factor} . A melhor solução para cada modelo foi selecionada com base na magnitude dos valores do coeficiente de correlação e do R_{factor} . O refinamento da estrutura inicial da CRLI foi feito usando o programa

Refmac (MURSHODOV, DODSON e VAGIN, 1996; MURSHODOV *et al.*, 1999). Primeiramente, foi feito um refinamento detalhado de corpo rígido, com o objetivo de verificar o melhor posicionamento relativo de grupos rígidos das moléculas. Logo após, um refinamento posicional por restrições foi realizado, um mapa de densidade eletrônica a dois sigma foi gerado para cada uma das duas estruturas e visualizados no programa XtalView (MCREE, 1999) com o objetivo de fazer verificações das cadeias laterais dos aminoácidos. Na estrutura da CRLI foram adicionadas moléculas de água de acordo com as densidades não explicadas no mapa Fo-Fc. Após isso, foi realizado um refinamento por restrições anisotrópico na estrutura da CRLI e a qualidade estereoquímica do modelo final foi checada através do programa Prochek (LASKOWSKI *et al.*, 1993). As coordenadas da estrutura final da CRLI serão depositadas no banco de dados de proteínas (PDB).

2.4. Resultados e Discussão

2.4.1. Purificação e Caracterização da Afinidade por Carboidratos

A lectina de *C. roseum* (CRLI) foi purificada de acordo com Cavada *et al.* (2006) e a eletroforese apresentou três bandas de massas moleculares aparentes em torno de 25, 12 e 8 kDa, referentes às cadeias α , β e γ , respectivamente (dados não mostrados). A CRLII foi purificada em um único passo cromatográfico utilizando coluna de Sepharose-4B-lactose (Figura 2.1). A eletroforese mostra que o pico apresenta uma banda em torno de 25 kDa sem a presença de cadeias referentes ao processamento pós-traducional que normalmente aparecem em géis de outras lectinas de leguminosas. As bandas que aparecem na altura do marcador de 66 kDa representam a pré-pró-proteína que também está presente nos amostras purificadas das lectinas de diócleas (Figura 2.1).

Ambas apresentaram atividade hemaglutinante contra eritrócitos de coelho tratados e não tratados com enzimas proteolíticas. A concentração mínima de ambas as proteínas capaz de aglutinar suspensões de eritrócitos de coelho a 2 % não tratados foi $<2 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Esta propriedade de hemaglutinação é bastante similar a outras lectinas isoladas de Diocleinae. A especificidade de reconhecimento de

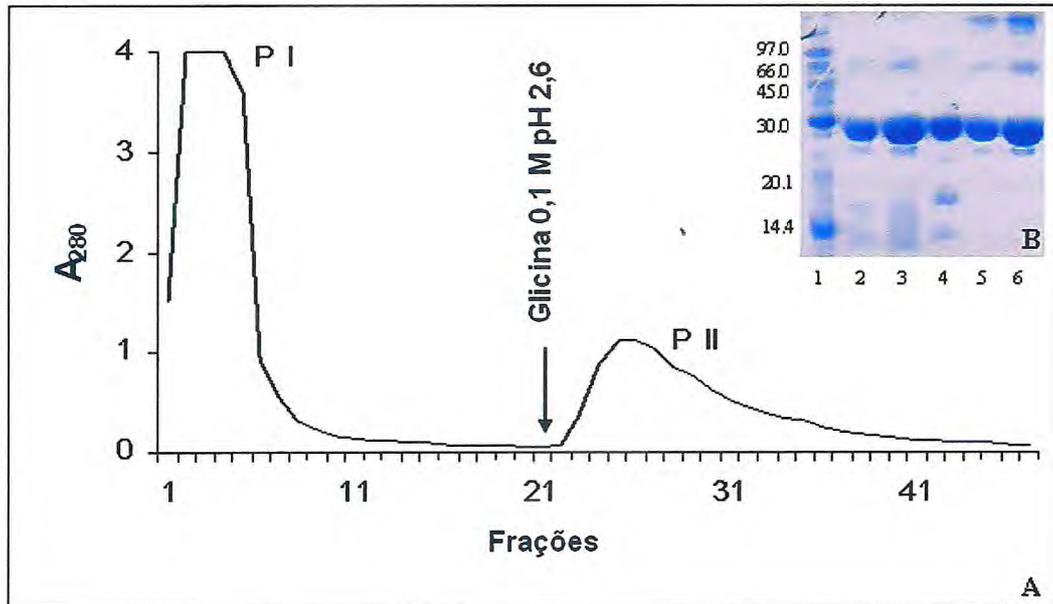


Figura 2.1 Cromatografia de afinidade e SDS-PAGE da lectina lactose Especifica de *Cymbosema roseum* (CRLII). (A) Cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose-4B-lactose; O material não retido (PI) foi eluído com NaCl 0,15 M. O material retido (PII) representa o pico do cromatograma com atividade hemaglutinante e foi eluído com glicina 0,1 M, pH 2,6. (B) SDS-PAGE mostrando os marcadores moleculares (linha 1), a banda de CRLII purificada e reduzida em diferentes concentrações (linha 2 – 10 µg/mL, linha 3 – 20 µg/mL), as cadeias α , β e γ da ConBr não reduzida (linha 4) e a cadeia α da CRLII não reduzida (linha 5 – 10 µg/mL, linha 6 – 20 µg/mL).

glicanos da CRLII foi investigada através de ensaios de inibição, usando vários carboidratos e glicoproteínas contendo diferentes oligossacarídeos.

Entre as substâncias testadas, várias apresentaram capacidade de inibir a atividade da CRLII. Os monossacarídeos acetilados *N*-acetil- α -D-galactosamina e *N*-acetil- α -D-lactosamina foram os mais eficazes em concentrações mínimas de 1,17 e 2,34 mM, respectivamente (Tabela 2.1). Como descrito anteriormente, a primeira lectina isolada de sementes de *C. roseum* (CRLI) foi fracamente inibida por D-manose a 19,5 mM (CAVADA *et al.*, 2006). A atividade da CRLII foi eficientemente inibida por glicoproteínas que apresentam tanto N-glicanos (lactotransferina bovina e serotransferrina humana) como O-glicanos (muçõa de estômago de porco; mucinas submaxilares, ovina e bovina, além de suas formas desializadas) (Tabela 2.1). Algumas das glicoproteínas apresentaram uma potência ainda maior que os monossacarídeos na capacidade de inibir a CRLII. Das glicoproteínas testadas, a lactotransferrina bovina desializada inibiu a lectina com uma concentração mínima de 2,4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e as O-glicoproteínas de mucina (mucina submaxilar bovina, mucina de estômago de porco e mucina submaxilar ovina desializada) mostraram as mais potentes inibições a uma concentração de 1,2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Tabela 2.1). Em comparação, a CRLI foi inibida com maior intensidade por lactotransferrina bovina a uma concentração mínima de 1,2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (CAVADA *et al.*, 2006).

A mucina de estômago de porco contém carboidratos O-ligados com estrutura contendo um núcleo dissacarídeo de Gal β 1-3GalNAc, o qual pode ser substituído por ramificações de *N*-acetilactosamina terminadas por fucose- α 1-2-Gal, GalNAc- α 1-3[Fuc α 1-2]Gal, ou GlcNAc- α 1-4-Gal e suas terminações não redutoras. Os antígenos Tn (GalNAc- α 1-Ser/ Thr) e T (Gal β (1-3) GalNAc- α 1-Ser/Thr) também estão presentes em mucina de estômago de porco (VAN HALBEEK *et al.*, 1982; ZENTENO *et al.*, 1995; KARLSSON *et al.*, 1997) (Tabela 2.2).

A mucina submaxilar bovina é uma glicoproteína formada por pelo menos 16 diferentes estruturas de glicanos (SAVAGE *et al.*, 1990; CHAI *et al.*, 1992), 85% são cadeias ácidas de oligossacarídeos O-ligados, incluindo uma elevada densidade de antígenos Tn sializados. Os O-glicanos neutros da mucina submaxilar bovina incluem basicamente os antígenos de fucose similares ao da mucina de estômago de porco (SAVAGE *et al.*, 1990; CHAI *et al.*, 1992). Além disso, os antígenos Tn somam >75% das cadeias de carboidratos da mucina submaxilar ovina desializada.

Tabela 2.1. Inibição da atividade hemaglutinante da lectina lactose específica de *Cymbosema roseum* por monossacarídeos e glicoproteínas

	Concentração inibitória mínima
MONOSSACARÍDEOS	mM
L-Fucose	>75
D-Glicose	37,5
D-Manose	37,5
N-Acetil-D-glicosamina	18,75
D-Galactose	9,37
D-Lactose	2,34
N-Acetil-D-lactosamina	2,34
N-Acetil-D-galactosamina	1,17
N-GLICOPROTEÍNAS	µg/mL
Serotransferrina humana	>2500
Lactotransferrina bovina	78,1
Serotransferrina humana desializada	4,8
Lactotransferrina humana desializada	2,4
O-GLICOPROTEÍNAS	µg/mL
Fetuína bovina	>2500
Mucina submaxilar ovina	4,8
Asialofetuína bovina	2,4
Mucina submaxilar bovina	1,2
Mucina de estômago de porco	1,2
Mucina submaxilar ovina desializada	1,2

Tabela 2.2. Estrutura dos glicanos componentes das glicoproteínas utilizadas nos ensaios de inibição e os antígenos que são constituídos por esses glicanos

	Sacarídeo	Antígenos
N-glicoproteínas		
Lactotransferina bovina	NeuAc α 2-6 Gal β 1-4 GlcNAc β 1-2 Man α 1-6 Man β 1-4 GlcNAc β 1-4 / α 1-3 NeuAc α 2-6 Gal β 1-4 GlcNAc β 1-2 Man	Fuc α 1-6 I GlcNAc β 1-ASN
O-glicoproteínas		
Mucina submaxilar ovina	NeuAc α 2-6 GalNAc α 1-Ser/Thr	(Sialil Tn)
Mucina submaxilar ovina desializada	GalNAc α 1-Ser/Thr	(Antígeno Tn)
Mucina de estômago de porco	GalNAc α 1-Ser/Thr	
	Gal β 1-3 GalNAc α 1-Ser/Thr	(Antígeno T)
	GlcNAc α 1-4-Gal	
	Fuc α 1-2 Gal-	(grupo sanguíneo H)
Mucina submaxilar bovina	GalNAc α 1-3 [Fuc α 1-2] Gal-	(grupo sanguíneo A)
	NeuAc α 2-6 GalNAc α 1-Ser/Thr	
	NeuAc α 2-6 [GlcNAc β 1-3] GalNAc α 1-Ser/Thr	(núcleo 3)
	GlcNAc β 1-3 GalNAc α 1-Ser/Thr	(núcleo 3)
	Fuc α 1-2 Gal-	
Asialofetuina	GalNAc α 1-3 [Fuc α 1-2] Gal-	
	Gal β 1-3 GalNAc α 1-Ser/Thr	(núcleo 1)

Desta forma, os dados de afinidade a carboidratos indicam que a CRLII preferencialmente liga-se a glicanos de GalNAc/Gal substituídos por açúcares neutros através de ligações 1→3, 1→4 ou 1→2. A lactotransferrina humana desializada é duas vezes menos inibitória da CRLII do que O-glicoproteínas. Esta glicoproteína contém N-glicanos do tipo oligomanose e tipo N-acetilglicosamina heterogêneos (4 % são cadeias diantenas 1→6 fucosiladas) (CODEVILLE *et al.*, 1992). A presença desses oligomanosídeos pode justificar a ampla capacidade de inibição da lactotransferrina bovina sobre a CRLI.

Lectinas de leguminosas galactose específicas foram previamente isoladas de várias espécies como *Arachis hypogaeae* (PNA) (LOTAN *et al.*, 1975), *Erythrina cristagalii* (ECL) (IGLESIAS *et al.*, 1982), *E. coralodendrum* (EcoL) (SAPER *et al.*, 1987), *E. velutina* (EVL) (MORAES *et al.*, 1996), *Vatairea macrocarpa* (VML) (CALVETE *et al.*, 1998), *E. indica* (EIL) (KONOZY *et al.*, 2002), *E. speciosa* (ESL) (KONOZY *et al.*, 2003), *Dolichos lablab* (DLab II) (LATHA e RAO, 2006) e *Bauhinia variegata* (Bvcl) (SILVA *et al.*, 2007).

Duas lectinas foram isoladas por Gowda *et al.* (1994) e Latha e Rao (2006) de sementes de *D. lablab*. A primeira é uma lectina glicose/manose específica (FRIL), enquanto que a segunda é galactose-específica (DLabII). Ambas lectinas compartilham elevada similaridade com as lectinas de *C. roseum* de acordo com a especificidade a carboidratos.

Estudos preliminares conduzidos com a lectina de *D. lablab* (DLabII) indicaram uma massa molecular aparente em condições nativas de 120 kDa e uma estrutura tetramérica para esta lectina (LATHA e RAO, 2006). Quando analisada em condições redutoras, a DLabII foi dissociada em duas subunidades com massas moleculares de 48 e 20 kDa. A especificidade de ligação a carboidratos da DLabII determinada por ensaios de inibição revelou que, entre um grande número de sacarídeos testados, galactose e seus derivados como *N*-acetilgalactosamina e Me-Gal foram os melhores inibidores da atividade lectínica (LATHA e RAO, 2006). As bases moleculares e as propriedades de ligação de lectinas de sementes de *D. lablab* estão bem descritas apenas para FRIL (PDB 1QMO) (HAMELRYCK *et al.*, 2000), a qual foi resolvida por cristalografia de raios X. As propriedades moleculares da interação de lectinas com carboidratos derivados da galactose também foram elucidadas por técnicas de difração de raios X apenas para ECL (PDB 1GZC)

(SVENSSON *et al.*, 2002), EcorL (PDB 1AX1) (ELGAVISH e SHAANAN, 1998) e PNA (PDB 1CR7) (RAVISHANKAR *et al.*, 2001).

2.4.2. Sequenciamento das Proteínas e Caracterização Bioquímica

As massas moleculares aparentes das lectinas CRLI e CRLII determinadas por eletroforese mostraram uma banda principal de aproximadamente 25 kDa semelhante ao que ocorre na ConBr como mostrado na figura 2.1B. A grande diferença entre elas consiste na ausência das bandas, na amostra de CRLII, referentes às cadeias β e γ , que são normalmente evidenciadas nesta família de lectinas como a ConBr mesmo em condições redutoras e em diferentes concentrações (Figure 2.1B). Esses dados para a CRLII mostram que não há multiplicidade de cadeias como observado em outras espécies de Diocleinae que são compostas de cadeias polipeptídicas com massas moleculares aparentes de 25,7, 12,8 e 8 kDa (HAGUE, 1975).

As seqüências de aminoácidos da CRLI e CRLII foram obtidas através de sobreposição de peptídeos seqüenciados por espectrometria de massas em tandem (Q-ToF) e degradação de Edman, que foi utilizada apenas para CRLII, oriundos da digestão proteolítica com diferentes enzimas. Estas duas seqüências apresentam uma similaridade inferior a 30 %.

A seqüência da CRLI (Figura 2.2) é composta de uma cadeia polipeptídica de 237 resíduos de aminoácidos, com um pI calculado de 5,1 e massa molecular calculada de 25.326 Da, quase a mesma encontrada por espectrometria de massas (MALDI-ToF). A CRLII que apresentou uma seqüência de 239 resíduos de aminoácidos, com pI teórico de 9,8 e massa molecular de 25.652 Da (teórica) e 25.698 Da por espectrometria de massas (experimental) (Figuras 2.3 e 2.4). Ao todo, 28 peptídeos foram seqüenciados por espectrometria de massas resultando em uma cobertura de aproximadamente 80 % da seqüência (Tabela 2.3), perfazendo uma massa de 20.528 Da e uma região não seqüenciada de 5.000 Da que foi coberta por sequenciamento de Edman.

Os monossacarídeos analisados mostraram que as cadeias de carboidratos presentes na estrutura de CRLII são compostas de N-acetil-glicosamina, manose, xilose e fucose em proporções molares aproximadas de 2: 2: 1: 1, com seis

ADTIVAVELD SYPNTDIGDP SYPHIGIDIK **SIRSKSTARW** NMQTGKVGTA
HISYNSVAKR LTAVVSYSGS SSTTVSYDVD LNNVLPWVR **VGLSATTGLY**
KETNTILSWS **FTSKLKTNSI** ADANALHFSF **HQFTQNPDL** **ILQDATTD**
DGNLELTKVS SSGSPQGSSV GRALFYAPVH IWESSAVVAS **FDATFTFLIK**
SPDSEPADGI TFFIANTDTS IPGSSGRL **GLFPDAN**

Figura 2.2. Seqüência da CRLI obtida por espectrometria de massas em tandem. Em preto, o N-terminal previamente seqüenciado por Cavada (2006). Em vermelho, estão destacados os peptídeos trípticos assinalados por similaridade utilizando MASCOT. Em roxo, três resíduos corrigidos após a resolução da estrutura.

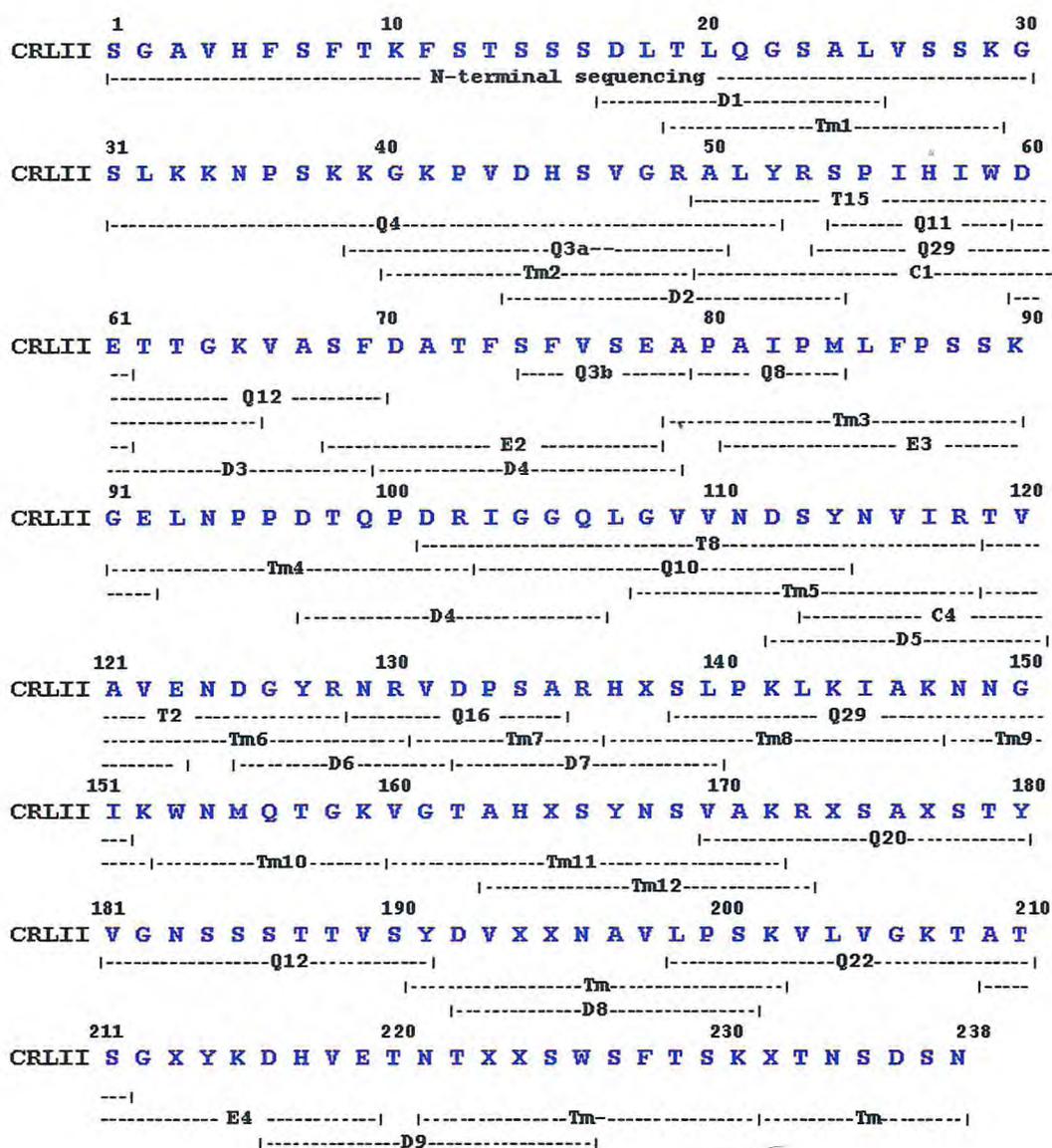


Figura 2.3. Seqüência da CRLII obtida por degradação de Edman e espectrometria de massas em tandem. Os peptídeos obtidos e seqüenciados por digestões com tripsina (T-degradação de Edman) (Tm-Espectrometria de massas), (Q) quimotripsina, (D) endoproteínase AspN de *Pseudomonas* e (C e E) endoproteínase Glu-C de *Staphilococcus aureus*. Os resíduos X podem ser resíduos de Leu ou Ile.

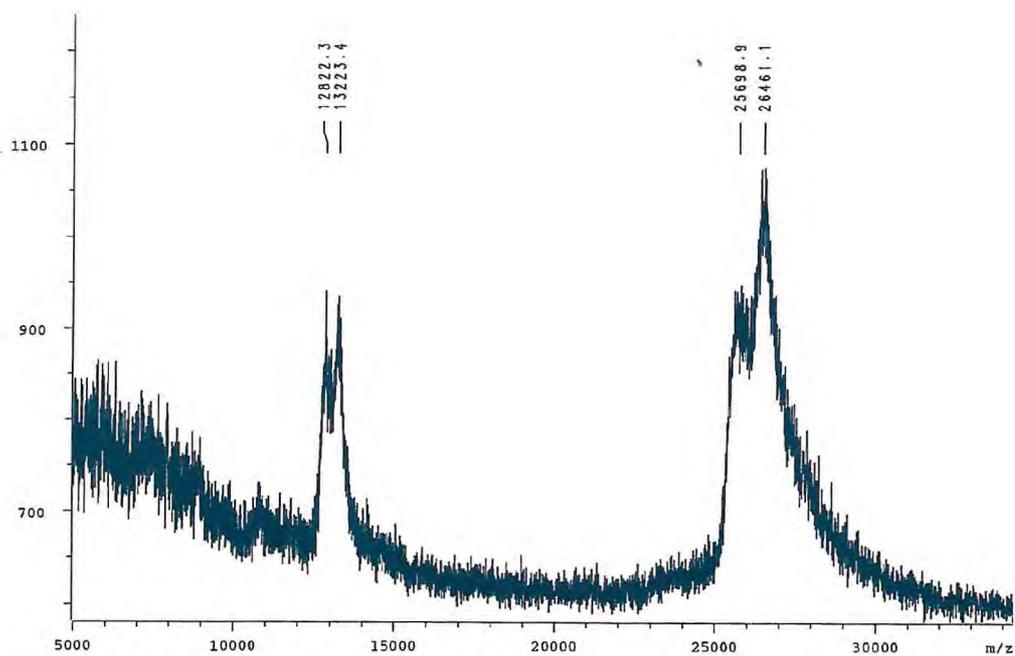


Figura 2.4. Análise por MALDI-ToF da massa intacta da CRL II. Os picos representam os íons mono (25.698 Da; 26.461 Da) e duplamente carregados (12.822 Da; 13.223 Da). Entre os picos existe uma diferença de massa de aproximadamente 760 Da, que é decorrente da glicosilação da proteína.

Tabela 2.3. Seqüências de aminoácidos dos peptídeos da CRLII obtidas por espectrometria de massas e as m/z correspondentes aos íons analisados. A proteína foi clivada por digestão enzimática com (D) endoproteínase AspN de *Pseudomonas*, (E) endoproteínase Glu-C de *Staphilococcus aureus* e (T) tripsina. Os resíduos X podem ser resíduos de Leu ou Ile. Os números indicam a posição dos peptídeos na seqüência

Digestão enzimática	Seqüência do peptídeo	m/z (M+H)
D1 (D ₀₁₇ – L ₀₂₅)	DLTLQGSAL	458,50
D2 (D ₀₄₄ – S ₀₅₄)	DHSVGRALYRS	630,15
D3 (D ₀₆₀ – F ₀₆₉)	DETTGKVASF	527,05
D4 (D ₀₇₀ – A ₀₇₉)	DATFSFVSEA	536,55
D5 (D ₀₉₇ – Q ₁₀₆)	DTQPDRIGGQ	599,60
D6 (D ₁₁₁ – V ₁₁₉)	DSYNVIRTV	533,05
D7 (G ₁₂₅ – V ₁₃₀)	GYNRV	381,90
D8 (D ₁₃₁ – L ₁₃₉)	DPSARHXSL	496,60
D9 (D ₁₈₇ – S ₁₉₆)	DVXXNAVLPS	518,25
D10 (D ₂₁₅ – W ₂₂₅)	DHVTNTXXSW	655,35
T1 (T ₀₁₉ – K ₀₂₉)	TLQGSALVSSK	545,10
T2 (G ₀₄₀ – R ₀₄₉)	GKPDHHSVGR	525,55
T3 (A ₀₇₉ – K ₀₉₀)	APAIPMLFPSSK	629,25
T4 (G ₀₉₁ – R ₁₀₂)	GELNPPDTQPDR	669,20
T5 (G ₁₀₇ – R ₁₁₇)	GVVNSYNVIR	617,65
T6 (T ₁₁₈ – R ₁₂₉)	TVAVENDGYRNR	696,70
T7 (V ₁₃₀ – R ₁₃₅)	VDPSAR	321,85
T8 (H ₁₃₆ – K ₁₄₆)	HXSLPKLKIAK	622,85
T9 (N ₁₄₇ – K ₁₅₁)	NNGIK	272,30
T10 (W ₁₅₂ – K ₁₅₈)	WNMQTGK	432,67
T11 (V ₁₇₂ – K ₁₈₄)	VGTAHXSYSVAK	673,83
T12 (A ₁₇₅ – R ₁₈₅)	AHXSYSVAKR	621,75
T13 (Y ₁₈₆ – K ₁₉₈)	YDVXXNAVLPSK	663,95
T14 (N ₂₂₀ – K ₂₃₀)	NTXXSWSFTSK	639,85
T15 (X ₂₃₃ – N ₂₃₉)	XTNSDSN	373,95
E1 (S ₀₆₈ – E ₀₇₈)	SFDATFSFVSE	618,15
E2 (P ₀₈₀ – E ₀₉₂)	PAIPMLFPSSKGE	686,80
E3 (A ₂₀₈ – E ₂₁₈)	ATSGXYKDHVE	608,70

possíveis composições desses monossacarídeos, o que indica que CRLII é uma proteína heteroglicosilada com estrutura truncada típica de glicanos de proteínas vegetais (Tabela 2.4). Este padrão é extremamente semelhante ao padrão de glicosilação observado para a CRLI (MARINHO, 2005). A proteína CRLII intacta tem um sítio de N-glicosilação confirmado por um pico de $m/z = 26,4$ kDa. Ao analisar esse incremento de massa, uma diferença de $m/z = 761,259$ Da foi encontrada (Figura 2.4). Os peptídeos contendo os resíduos 111 e 183 apresentam as seqüências consenso Asn-Xaa-Ser/Thr conservadas em proteínas glicosiladas. Esses dados indicam que Asn-111 e Asn-183 são ambos heterogeneamente glicosilados na CRLII.

A seqüência de CRLI é bastante similar a de várias outras lectinas isoladas de sementes de espécies dos gêneros *Canavalia* e *Dioclea*. Esta lectina de *C. roseum* tem similaridade com as lectinas de *D. grandiflora* (MOREIRA *et al.*, 1983; ROZWARSKI *et al.*, 1998), *D. guianensis* (CALVETE *et al.*, 1999), *D. violacea* (GALLEGO DEL SOL, 2006), *D. lehmani* (PEREZ *et al.*, 1991), *C. gladiata* (DELATORRE *et al.*, 2007), *C. ensiformis* (HAGUE, 1975; NAISMITH e FIELD, 1996) e *C. braisliensis* (MOREIRA e CAVADA, 1984; SANZ-APARICIO *et al.*, 1997) de 97, 98, 96, 94, 92, 92 e 91 %, respectivamente (Figura 2.5). Já a seqüência de CRLII não apresenta alto grau de similaridade com lectinas do tipo ConA, como as citadas acima. Porém, ela exibe 53 % de similaridade com o precursor da cadeia α da ConA (YAMAUCHI e MINAMIKAWA, 1990). Alinhamentos da CRLII e outras lectinas de leguminosas mostram similaridade de 56 % e 39 % com as lectinas galactose-específicas VML e Rob, respectivamente (Figura 2.6). Os dados de seqüência primária das lectinas estão submetidos ao banco de dados "UniProt Knowledge Base" e os seus números de acesso quando disponíveis serão disponibilizado *online* para consultas no NCBI.

A ConA é composta por duas cadeias, resultantes da clivagem de um produto gênico que, posteriormente, são fundidas em um produto final (CUNNINGHAM *et al.*, 1979). Contudo, as lectinas isoladas de *Dioclea lehmanni* (DLL II) (PEREZ *et al.*, 1990), de *Vatairea macrocarpa* (VML) (CALVETE *et al.*, 1998) e *Robinia pseudoacacia* (Rob) (YOSHIDA e TAZAKI, 1999) foram identificadas como originadas de genes bastante similares ao das demais lectinas de leguminosas sem apresentar a permutação circular de cadeias no processamento pós-traducional.

Tabela 2.4. Determinação bioquímica da composição de carboidratos da CRLII e predição da estrutura do carboidrato baseada na análise de espectrometria de massas

Determinação da Composição de Carboidratos

Massa Calculada (m/z)	Forma dos Glicanos	Abundância Relativa
1204,42	Man ₃ XylGlcNAc ₂ Fuc	traços
1042,37	Man ₂ XylGlcNAc ₂ Fuc	20 %
910,32	Man ₂ GlcNAc ₂ Fuc	traços
880,32	Man ₂ XylGlcNAc ₂	20 %
880,31	ManXylGlcNAc ₂ Fuc	30 %
718,26	ManXylGlcNAc ₂	20 %

Predição da Estrutura dos Carboidratos

Massa (m/z)	Predição do Glicano	Massa do Peptídeo
761,2	(Hex) ₂ (Deoxyhexose) ₁ (NeuAc) ₁ (Hex) ₁ (HexNAc) ₁ (Pent) ₃	2465,2 (103-118)
761,2	(Hex) ₂ (Deoxyhexose) ₁ (NeuAc) ₁ (Hex) ₁ (HexNAc) ₁ (Pent) ₃	3747,821 (174-202)

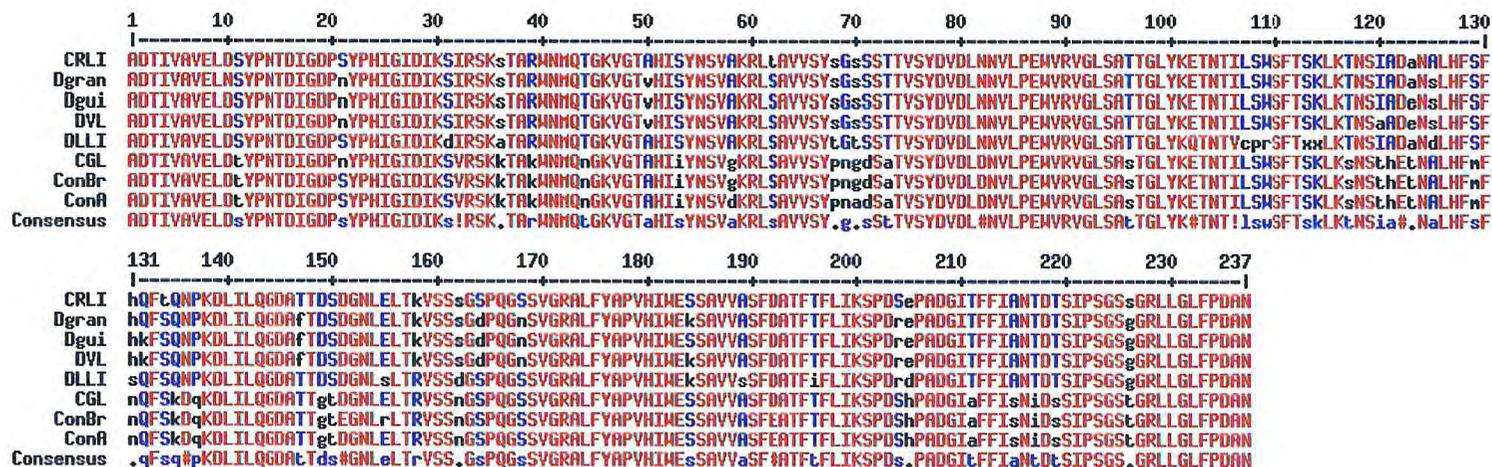


Figura 2.5 Alinhamento da CRLI com várias outras lectinas isoladas de sementes de espécies dos gêneros *Canavalia* e *Dioclea*. *Dioclea grandiflora* (Dgran), *Dioclea guianensis* (Dgui), *Dioclea violacea* (DVL), *Dioclea lehmani* (DLLI), *Canavalia gladiata* (CGL), *Canavalia ensiformis* (ConA) e *Canavalia brasiliensis* (ConBr). As similaridades correspondem a 97 %, 98 %, 96 %, 94 %, 92 %, 92 % e 91 %, respectivamente.

```

CRLII -----DLTLQGSALVSSK 13
VML -----SEVVSFSFTKFNPNPKDIILQGDALVTSK 29
Rob MASYKFKTQNSFLLLLLSISFFLLLLLNKVNSTGSLSFSPKFKHSQPDILFQSDALVTSK 60
      *: :*. .***:**

CRLII -----GKPVDSVGRALYRSPHIWDETTGKVASFDATFSFVSEAPAIPMLFPSS 63
VML GKQLTKVKDGKPVDSHSLGRALYAAPIHIWDDSTDRVASFATSFSFVVEAPDESKTADGI 89
Rob GVLQLTTVNDGRPVYDSIGRVLYAAPFQIWDSTTGNVASFVTSFSFIKAPNEGKTADGL 120
      *:** .*:**.* * :*:***.:* .*** :***: :**

CRLII KGELNPP-DTQPDRIIGG-QGVVNS--YNVIRTVAVENDGYRN-RVDPSARHXSPLPKLKI 118
VML AFFLAPP-DTQPQKGGFLGLFNDS--NKSIQTVAVEFDTFNS-TWDPSARHIGINVNSI 145
Rob VFFLAPVGSTQPLKGGGLLGLFKDESYNKSNQIVAVEFDTFRNVAWDPNGIHMGIIDVNSI 180
      * * .*** : ** *:.:*. : : **** * : * **.. * .: .*

CRLII AKNNGIKWNMQTGK-----VGTAHXSYSVAKRYDVXXNAVLPKSKV----- 159
VML ESMKYVKWGWENGKVANVYISYEASTKTLTASLTYPNSATSYIVSANVDLKSALPEWVRV 205
Rob QSVRTVRWDWANGEVANVFISYEASTKSLTASLVYPSLEKSFILSAIVDLKKVLPWVRV 240
      . . :*: . * . .:** * * . : : * . :

CRLII ---ATSGXYKDHVETNTXXSWSFTSKXTNSDSN----- 189
VML GFSATSGLSRDHVETHDVLDSFTSTLQAPSDDSN----- 240
Rob GFTATTGLSEDYVQTNVLSWSFESNLPGGNSVASVKNAGLSTYAA 286
      **.* :*:**.* **.* ..:
    
```

Figura 2.6. Alinhamento de seqüência da CRLII com lectinas de *Vatairea macrocarpa* (VML) e *Robinia pseudoacacia* (Rob). Neste alinhamento, CRLII apresenta similaridade de 56 % e 39 % com VML e Rob, respectivamente.

Este fato explica a elevada similaridade entre lectinas não processadas após a tradução e a cadeia polipeptídica precursora de lectinas do tipo ConA. A CRLII tem uma cadeia α que não é formada pela inversão das cadeias β e γ mas apresenta similaridade com os produtos gênicos de CRLI e DLLI antes do processamento pós-traducional.

2.4.3. Cristalização das Proteínas e Difração de Raios X

Os cristais de CRLI (Figura 2.7) foram obtidos em um mês de acordo com a metodologia de Cavada *et al.* (2006). Os dados da difração mostraram que esses cristais pertencem ao grupo espacial $P2_12_12_1$ e têm parâmetros de cela $a = 68,0 \text{ \AA}$; $b = 103,1 \text{ \AA}$ e $c = 122,3 \text{ \AA}$. Os dados escalonados na faixa de resolução de $34,9-1,8 \text{ \AA}$ estão na tabela 2.5. O V_M de $2,1 \text{ \AA}^3 \cdot \text{Da}^{-1}$ revela a existência de 4 moléculas na unidade assimétrica e um conteúdo de solvente em torno de 41,5 % (MATTHEWS, 1968). Microcristais de CRLII foram obtidos utilizando tampões neutros contendo PEG em diferentes tamanhos. Os cristais cresceram em tampão Tris-HCl 0,1 M, contendo 10 % (m/v) PEG 8.000. A otimização desta condição de cristalização foi obtida por variação no pH do tampão de cristalização e na concentração de PEG. Cristais foram conseguidos em gotas contendo soluções de 8 % de EG (etilenoglicol), Tris-HCl 0,1 M, pH 8,4 a pH 8,6 e PEG 8.000 entre 10 e 11 %. Cristais de CRLII cresceram em um mês com dimensões máximas de aproximadamente $0,8 \times 0,4 \times 0,1 \text{ mm}$ (Figura 2.8). A difração mostrou que esses cristais pertencem ao grupo especial monoclinico $P2_1$ com parâmetros de cela $a = 49,4 \text{ \AA}$, $b = 89,6 \text{ \AA}$ e $c = 100,8 \text{ \AA}$. Os dados da difração escalados em uma faixa de resolução de $48,7 - 2,5 \text{ \AA}$ estão apresentados na Tabela 2.5. De acordo com o volume de Mattheus calculado ($V_M = 2,1 \text{ \AA}^3 \cdot \text{Da}^{-1}$) (MATTHEWS, 1968), existem quatro moléculas de 26 kDa na unidade assimétrica, indicando um conteúdo de solvente de 40,2 %.

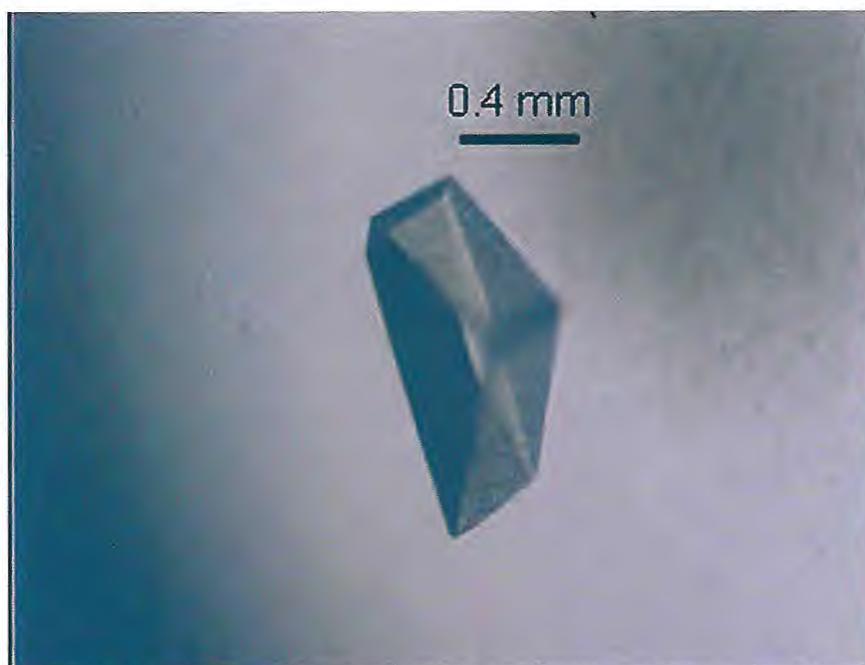


Figura 2.7. Cristal da lectina manose específica de sementes de *Cymbosema roseum* (CRLI).



Figura 2.8. Cristais da lectina lactose específica de sementes de *Cymbosema roseum* (CRLII).

Tabela 2.5. Dados estatísticos da resolução total da CRLI e da coleta de dados da CRLII

	CRLI	CRLII
Coleta de Dados		
Número de observações	238.361	280.204
Número de observações únicas	80.568	28.311
R_{merge} (%)	5,4 (32,5)	11,7 (48,2)
Limite de resolução (Å)	34,92 – 1,77	48,79 – 2,5
Completeza (%)	97,0 (98,0)	96,3 (96,3)
Multiplicidade	3,7	4,8
$(I)/\sigma$	7,1 (2,2)	5,4 (1,4)
Comprimento de onda (Å)	1,431	1,431
Grupo especial	$P2_12_12_1$	$P2_1$
Parâmetros de cela (Å)	a = 67,82 b = 103,14 c = 122,09	a = 49,41 b = 89,28 c = 100,49
Refinamento		
Limite de resolução (Å)	34,99 – 1,8	----
R_{factor} (%)	20,45	----
R_{free} (%)	25,49	----
Número de aminoácidos no arranjo biológico	948	----
Número de moléculas de água	343	----
RMS desvios dos valores ideais		----
Comprimento das ligações (Å)	0,016	----
Ângulos das ligações (graus)	2,012	----
Fatores de Temperatura		
Média do B-fator para toda a proteína (Å ²)	14,52	----
Gráfico de Ramachandran		
Resíduos nas regiões mais favorecidas	88,1 %	----
Resíduos nas regiões adicionalmente permitidas	11,2 %	----
Resíduos nas regiões generosamente permitidas	0,7 %	----
Resíduos nas regiões não permitidas	----	----

2.4.4. Estrutura Geral da lectina manose específica de *Cymbosema roseum*

Estrutura Geral e Glicosilação

A estrutura da CRLI foi determinada por substituição molecular usando-se a estrutura da lectina de sementes de *C. ensiformis* (PDB: 1CJP) como modelo de busca. Foi determinado que a estrutura da CRLI apresenta um tetrâmero na unidade assimétrica. Como descrito anteriormente, cada monômero é formado por 237 resíduos de aminoácidos constituindo uma estrutura em sanduíche β (SRINIVAS *et al.*, 2001). A estrutura geral da CRLI nativa foi refinada a 1.8 Å de resolução. O modelo apresentou boa estequiometria com uma estrutura geométrica bem definida (Figura 2.9) (Tabela 2.5). Além dos já conhecidos sítios de ligação a carboidratos e a metais, a CRLI possui um sítio de ligação a aminoácidos não-protéicos na interface dos monômeros de cada dímero canônico, como observado na lectina de *Canavalia gladiata* (CGL) por Delatorre e colaboradores (2007).

A estrutura oligomérica da CRLI é formada por dois dímeros canônicos e esses dímeros estão associados por pontes salinas entre as folhas β . Próximo ao Asp 139 existe uma densidade eletrônica bem definida (mapa fo-fc contornado a 5σ), não elucidada pelo modelo, onde está ligado o ácido α -aminobutírico (Abu), um aminoácido não-protéico envolvido na resposta de plantas a patógenos (TON e MAUCH-MANI, 2004).

Na estrutura da CRLI, existem três possíveis sítios de glicosilação, Asn14, Asn55 e Asn131. Na região da Asn14, a estrutura revela uma densidade eletrônica não explicada que, possivelmente, seria uma hexose. Porém, não há densidade suficiente para explicá-la no mapa, provavelmente pela característica vibracional do glicano que reduz o espectro vibracional bem como o espalhamento causado por seus átomos na difração de raios X.

O cristal da CRLI é ortorrômbico e pertence ao grupo especial $P2_12_12_1$. As lectinas de leguminosas normalmente cristalizam em diferentes grupos espaciais, mas os grupos espaciais ortorrômbicos compreendem mais de 68% desses cristais.

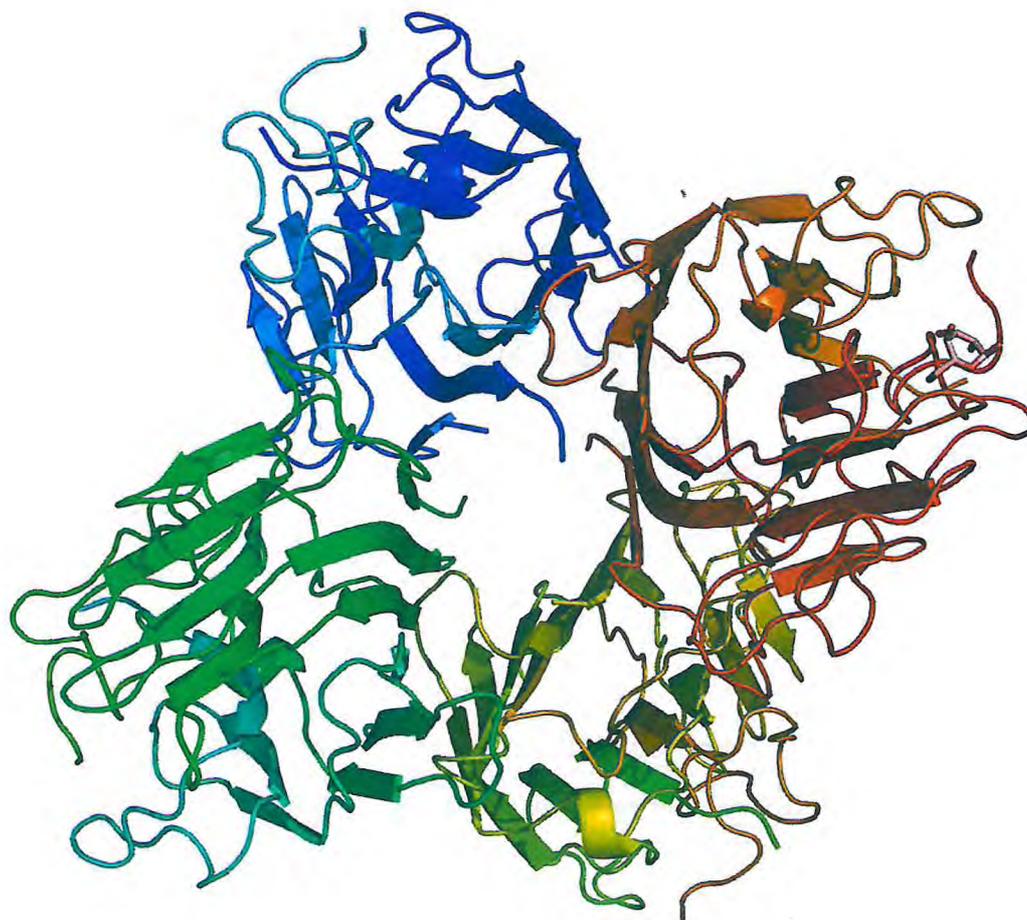


Figura 2.9. Estrutura geral da lectina CRLI. Lectina manose específica com arranjo quaternário *jellyroll* semelhante às lectinas tipo ConA, formada por dímero de dímeros canônicos .

O empacotamento cristalino de lectinas de leguminosas, normalmente, não forma contatos entre os diferentes tetrâmeros. Este aspecto pode ter uma relação com o padrão de associação e oligomerização relativamente estável que a maioria das lectinas de leguminosas apresenta (GALLEGO DEL SOL *et al.*, 2007).

Sítios de ligação a metais e a carboidratos

Os aminoácidos envolvidos no sítio de ligação a metais são conservados. A ligação do íon cálcio induz a uma isomerização trans-cis da ligação peptídica Ala207-Asp208, que é conservada em todas as lectinas de leguminosas com estruturas conhecidas. A ligação cis-peptídica contribui para a estabilização do domínio cálcio através da orientação do posicionamento dos resíduos Asn14 e Arg228. Os resíduos que desempenham a coordenação dos metais são Glu8, Asp10, Tyr12, Asn14, Asp19 e His24, além de duas moléculas de água (Figura 2.10).

O sítio de ligação a carboidratos também é altamente conservado em lectinas do tipo ConA. A importância dessa conservação dos aminoácidos para a interação com monossacarídeos tem sido amplamente descrita (HAMODRAKAS *et al.*, 1997). Os resíduos de aminoácidos que interagem com o monossacarídeo são conservados e, normalmente, ocorre a formação de cinco a oito pontes de hidrogênio entre estes e os aminoácidos das lectinas de Diocleinae. Os resíduos de aminoácidos envolvidos neste domínio são Asn14, Leu99, Tyr100, Asp208 e Arg228 (HAMODRAKAS *et al.*, 1997).

Sítio de ligação ao ácido α -aminobutírico (Abu)

O sítio de ligação do Abu está posicionado na interface de contato dos monômeros que formam o dímero canônico na CRLI, exatamente como descrito na estrutura da CGL (PDB: 2D7F). A molécula ligante está acessível a superfície do solvente através do grupo carboxila e interage por ponte de hidrogênio com o Asp139 de uma cadeia e uma molécula de água intersticial, a qual interage diretamente com Asn124. Na outra cadeia, a interação é feita por ponte de hidrogênio com a Ala125 e através de outra molécula de água com Gln137, além de interações hidrofóbicas com Leu126 e Val179 (Figura 2.11). As interações hidrofílicas que ocorrem entre o Abu e o Asp139 são pontes de hidrogênio entre o oxigênio OD2 do grupo hidroxila do Asp139 e o oxigênio do Abu a uma distância de

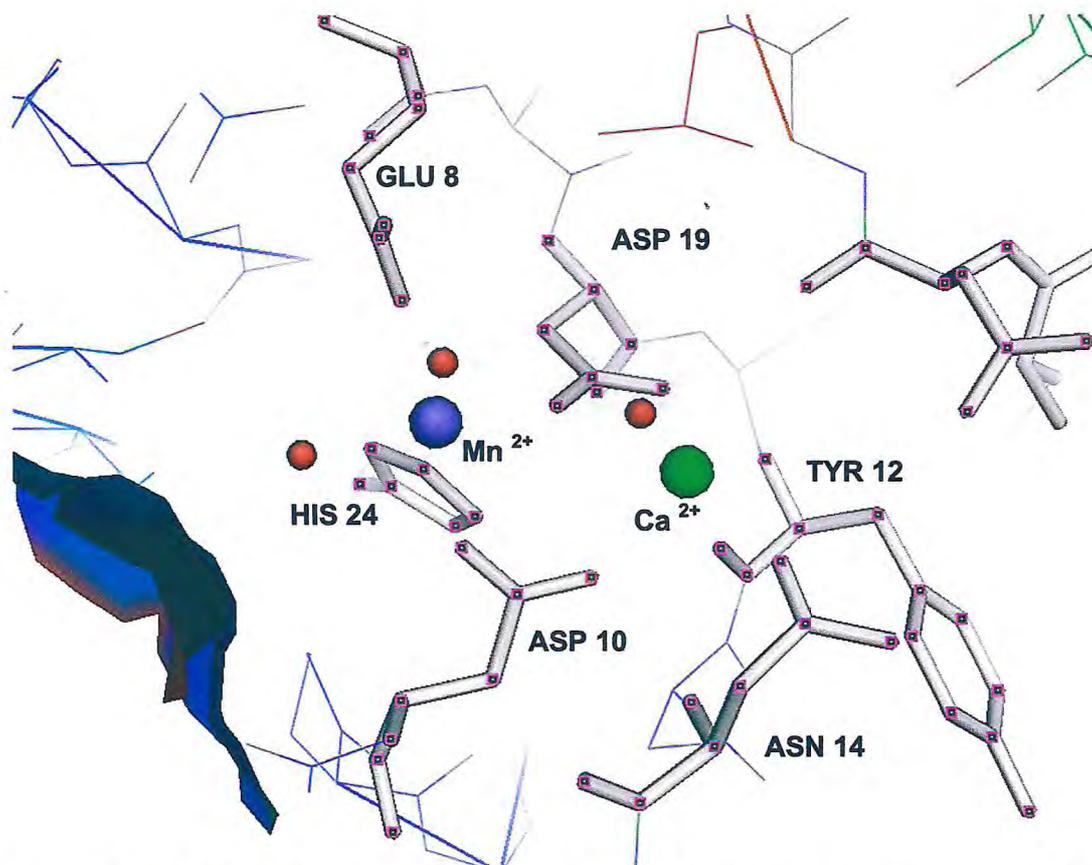


Figura 2.10. Sítio de ligação a metais da CRLI. Os resíduos que desempenham a coordenação dos metais são Glu8, Asp10, Tyr12, Asn14, Asp19 e His24, além de duas moléculas de água. A bola verde representa o íon Mn^{2+} e a bola roxa o íon Ca^{2+} .

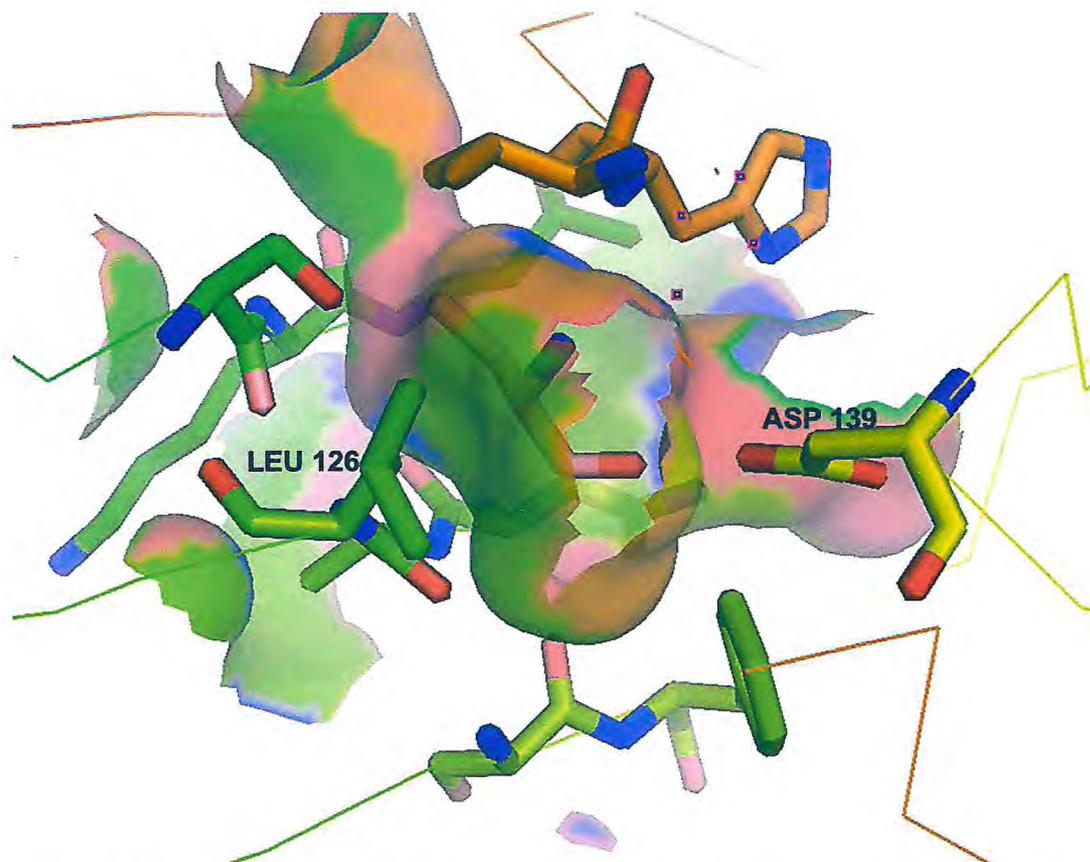


Figura 2.11. Sítio de ligação ao ácido α -aminobutírico (Abu). O sítio de ligação do Abu está posicionado na interface de contato dos monômeros que formam o dímero canônico, entre os resíduos Asp139 de uma cadeia e Leu126 da outra.

2,75 Å. O mesmo oxigênio do Abu ainda constrói uma outra ponte de hidrogênio com uma molécula de água a 2,6 Å e o nitrogênio do Abu também interage com uma molécula de água a 2.8 Å.

A capacidade da lectina ligar-se a metabólitos especiais como discutida por Delatorre *et al.* (2007), está focada basicamente na capacidade de ligação ao Abu. Porém, sítios hidrofóbicos conservados em outras lectinas são capazes de ligar-se a adenina e hormônios vegetais derivados de adenina (EDELMAN e WANG, 1978). A ligação de adenina foi descrita para várias lectinas tetraméricas, incluindo DBL, PHA-E e SBA (HAMELRYCK *et al.*, 1998; BOUCKAERT *et al.*, 1999). Essa nova propriedade de ligação ao Abu descrita para CGL e CRLI é um suporte para a importância das lectinas como proteínas envolvidas no mecanismo de defesa de plantas

2.5. Conclusão

As lectinas manose- e lactose-específicas de sementes de *C. roseum* apresentam estruturas primárias distintas. Essas diferenças estruturais mostram a relação direta com o arranjo quaternário e na especificidade de lectinas. As diferentes formas com que essas lectinas interagem com carboidratos sugerem que elas devem desempenhar ações complementares no mecanismo de defesa de plantas, uma vez que a CRLI apresenta a capacidade de ligar-se a um aminoácido não protéico envolvido em respostas contra patógenos.

2.6. Referências Bibliográficas

1. 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 database of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, 25: 3389-3402.
2. BAUMANN, C.M., RÜDIGER, H., STROSBERG, A.D. (1979). A comparison of the two lectins from *Vicia cracca*. *FEBS Lett.*, 102: 216-218.
3. BOUCKAERT, J., HAMELRYCK, T., WYNS, L., LORIS, R. (1999). Novel structures of plant lectins and their complexes with carbohydrates. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 9: 572-577 .
4. CALVETE, J.J., SANTOS, C.F., MANN, K., GRANGEIRO, T.B., NIMTZ, M., URBANKE, C., CAVADA, B.S. (1998). Amino acid sequence, glycan structure, and proteolytic processing of the lectin of *Vatairea macrocarpa* seeds. *FEBS Lett.*, 425: 286-292.
5. CARRINGTON, D.M., AUFFRET, A., HANKE, D.E. (1985). Polypeptide ligation occurs during post-translational modification of concanavalin A. *Nature*, 313, 64-67.
6. CAVADA, B.S., BARBOSA, T., ARRUDA, S., GRANGEIRO, T.B., BARRAL NETTO, M. (2001). Revisiting proteus: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 2: 123-135.
7. CAVADA, B.S., MARINHO, E.S., SOUZA, E.P., BENEVIDES, R.G., DELATORRE, P., SOUZA, L.A., NASCIMENTO, K.S., SAMPAIO, A.H., MORENO, F.B., RUSTIGUEL, J.K., CANDURI, F., DE AZEVEDO JR., W.F., DEBRAY, H. (2006). Purification, partial characterization and preliminary X-ray diffraction analysis of a mannose-specific lectin from *Cymbosema roseum* seeds. *Acta Crystallographica Section F*, 62: 235-7.
8. CHAI, W., HOUNSELL, E.F., CASHMORE, G.C., ROSANKIEWICZ, J.R., FEENEY, J., LAWSON, A.M. (1992). Characterization by mass spectrometry and ¹H-NMR of novel hexasaccharides among the acidic O-linked carbohydrate chains of bovine submaxillary mucin. *Eur. J. Biochem.*, 207: 973-980.

9. CHAPLIN, M.F. (1982). A rapid and sensitive method for the analysis of carbohydrate components in glycoproteins using gas-liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 123: 336-341.
10. CODEVILLE, B., STRECKER, G., WIERUSZESKI, J.M., VLIAGENTHART, J.F.G., VAN HALBEEK, H., PETER-KATALINIC, J., EGGE, H., SPIK, G. (1992). Heterogeneity of bovine lactotransferrin glycans. Characterization of alpha-D-Galp-(1-->3)-beta-D-Gal- and alpha-NeuAc-(2-->6)-beta-D-GalpNAc-(1-->4)- beta-D-GlcNAc-substituted N-linked glycans. *Carbohydr. Res.* 236, 145-164.
11. Collaborative Computational Project, Number 4. (1994). *Acta Cryst.* D50, 760-763.
12. COOPER C.A., GASTEIGER E., PACKER N. (2001). GlycoMod - A software Tool for Determining Glycosylation Compositions from Mass Spectrometric Data *Proteomics*, 1:340-349.
13. COOPER C.A., GASTEIGER E., PACKER N. Predicting Glycan Composition from Experimental Mass Using GlycoMod (in) *Handbook of Proteomic Methods* (Conn P.M. ed.), pp. 225-232, Humana Press, Totowa, NJ (2003).
14. CUNNINGHAM, B.A., HEMPERLY, J.J., HOPP, T.P., GERALD, M. (1979). Favin versus concanavalin A: Circularly permuted amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 76: 3218-3222.
15. DELATORRE, P., ROCHA, B. A. M., SOUZA, E. P., OLIVEIRA, T.M., BEZERRA, G.A., MORENO, F.B., FREITAS, B.T., SANTI-GADELHA, T., SAMPAIO, A. H., AZEVEDO JR., W. F., CAVADA, B. S. (2007). Structure of a lectin from *Canavalia gladiata* seeds: new structural insights for old molecules. *BMC Struct. Biol.*, 7: 52.
16. EDELMAN, G.M., WANG J.L. (1978) Binding and Functional Properties of Concanavalin-A and Its Derivatives. 3. Interactions with Indoleacetic-Acid and Other Hydrophobic Ligands. *J. Biol. Chem.*, 253: 3016-3022
17. ELGAVISH, S., SHAANAN, B. (1998). Structures of the *Erythrina corallodendron* lectin and of its complexes with mono- and disaccharides. *J. Mol. Biol.*, 277: 917-932.
18. FARIA, R.A., ANDRADE-NETO, M., PINTO, L.S., CASTELLON, R.R., CALVETTE, J.J., CAVADA, B.S. (2004). Biochemical and chemical partial

- characterization of *Bauhinia forficata* Link seeds. Arch. Latinoam. Nutr. 54, 349-353.
19. GADELHA, C.A.A., MORENO, F.B.M.B., SANTI-GADELHA, T., CAJAZEIRAS, J.B., ROCHA, B.A.M., ASSREUY, A.M.S., MOTA, M.R.L., PINTO, N.V., MEIRELES, A.V.P., BORGES, FREITAS, B.T., CANDURI, F., SOUZA, E.P., DELATORRE, P., CRIDDLE, D.N., DE AZEVEDO, W.F. JR., CAVADA, B.S. (2005). Native crystal structure of a nitric oxide-releasing lectin from the seeds of *Canavalia maritima*. Journal of Structural Biology, 152: 185-194.
20. GALLEGO DEL SOL, F., CAVADA, B.S., CALVETE, J.J. (2007). Crystal structures of *Cratylia floribunda* seed lectin at acidic and basic pHs. Insights into the structural basis of the pH-dependent dimer-tetramer transition. Journal of Structural Biology, 158: 1-9.
21. GOLDSTEIN, I.J., WINTER, H.C. (1999). The *Griffonia simplicifolia* I-B4 isolectin. A probe for alpha-D-galactosyl end groups. Subcellular Biochem., 32: 127-141.
22. GOWDA, L.R., SAVITHRI, H.S., RAO, D.R. (1994). The complete primary structure of a unique mannose/glucose-specific lectin from field bean (*Dolichos lab lab*). J. Biol. Chem., 269: 18789-18793.
23. HAGUE, D.R. (1975). Studies of Storage Proteins of Higher Plants: I. Concanavalin A from Three Species of the Genus *Canavalia*. Plant Physiol., 55: 636-642.
24. HAMELRYCK, T.W., LORIS, R., BOUCKAERT, J., DAO-THI, M.H., STRECKER, G., IMBERTY, A., FERNANDEZ, E., WYNS, L., ETZLER, M.E. (1999). Carbohydrate binding, quaternary structure and a novel hydrophobic binding site in two legume lectin oligomers from *Dolichos biflorus*. J Mol Biol., 286: 1161-1177.
25. HAMELRYCK, T.W., MOORE, J.G., CHRISPEELS, M.J., LORIS, R., WYNS, L. (2000). The role of weak protein-protein interactions in multivalent lectin-carbohydrate binding: crystal structure of cross-linked FRIL. J.Mol.Biol., 299: 875-883.
26. HAMODRAKAS, S.J., KANELLOPOULOS, P.N., PAVLOU, K., TUCKER, P.A. (1997). The Crystal Structure of the Complex of Concanavalin A with 48-Methylumbelliferyl- α -D-glucopyranoside. J. Struc. Biol., 118: 23-30.

27. IGLESIAS, J.L., LIS, H., SHARON, N. (1982). Purification and properties of a D-galactose/N-acetyl-D-galactosamine-specific lectin from *Erythrina cristagalli*. Eur. J. Biochem., 123: 247-52.
28. JANCARIK, J., KIM., S.H. (1991). Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. Journal of Applied Crystallography, 24: 409-411.
29. KARLSSON, N.G., NORDMAN, H., KARLSSON, H., CARLSTEDT, I., HANSSON G.C. (1997). Glycosylation differences between pig gastric mucin populations: a comparative study of the neutral oligosaccharides using mass spectrometry. Biochem. J., 326: 911-917.
30. KONOZY, E.H., BERNARDES, E.S., ROSA, C., FACA, V., GREENE, L.J., WARDA, R.J. (2003). Isolation, purification, and physicochemical characterization of a D-galactose-binding lectin from seeds of *Erythrina speciosa*. Arch. Biochem. Biophys. 410, 222-229.
31. KONOZY, E.H., MULAY, R., FACA, V., WARD, R.J., GREENE, L.J., ROQUE-BARRIERA, M.C., SABHARWAL, S., BHIDE, V.S. (2002). Isolation, purification, and physicochemical characterization of a D-galactose-binding lectin from seeds of *Erythrina speciosa*. Biochimie, 84: 1035-1043.
32. KUMAR, N.S., RAO D.R. (1986). The nature of lectins from *Dolichos lablab*. J. Biosci., 10: 95-109.
33. LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature, 227: 680-685.
34. LASKOWSKI, R.A., MACARTHUR, M.W., MOSS, D.S., THORNTON, J.M. (1993). PROCHECK: A program to check the stereochemical quality of protein structures J. Appl. Cryst., 26: 283-291.
35. LATHA, V.L., RAO, R.N., NADIMPALLI, S.K. (2006). Affinity purification, physicochemical and immunological characterization of a galactose-specific lectin from the seeds of *Dolichos lablab* (Indian lablab beans). Protein Expr. Purif., 45: 296-306.
36. LESLIE, A. G. W. (1992). Newsletter on Protein Crystallography, 26.
37. LOTAN, R., SKUTELSKY, E., DANON, D., SHARON, N. (1975). The purification, composition, and specificity of the anti-T lectin from peanut (*Arachis hypogaea*). J. Biol. Chem., 250: 8518-23.
38. MATTHEWS, B.W. (1968). Solvent content of protein crystals. J.Mol. Biol., 33: 491-497.

39. MCREE, D.E. (1999). XtalView/Xfit--A versatile program for manipulating atomic coordinates and electron density. *J. Struct. Biol.* 125, 156-165.
40. MO, H., LIN, Z., SUN, C. (1990). Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry. (KOCOUREK, J. & FREED, D.L.J. eds.), Sigma Chemical Company, St.Louis, USA.
41. MORAES, S.M., CAVADA, B.S., MOREIRA, R.A., ROQUE-BARREIRA, M.C., SANTOS-DE-OLIVEIRA, R., PINTO, V.P., OLIVEIRA, J.T. (1996). Purification, physicochemical characterization and biological properties of a lectin from *Erythrina velutina* forma aurantiaca seeds. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 29: 977-85.
42. MOREIRA, R.A., CAVADA, B.S. (1984). Lectin from *Canavalia brasiliensis* (MART.). Isolation, characterization and behavior during germination. *Biologia Plantarum*, 26, 113-120.
43. MOREIRA, R.A., BARROS, A.C.H., STEWART, J.C., PUSZTAI, A. (1983). Isolation and characterization of a lectin from the seeds of *Dioclea grandiflora* (Mart.) Planta, 158, 63-69.
44. MURSHODOV, G. N. *et al.* (1999) Efficient anisotropic refinement of macromolecular structures using FFT. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 55, 247-55.
45. MURSHODOV, G. N., DODSON, E. J., VAGIN, A. A. Macromolecular refinement. In: Dodson, E., Moore, M., Ralph, A. and Bailey, S., eds. Proceedings of the CCP4 study weekend. Daresbury Laboratory, Warrington, UK. 1996. p. 93-104.
46. PEREZ, G. (1998). Isolation and characterization of a novel lectin from *Dioclea lehmanni* (Fabaceae) seeds. *International Journal of Biochemistry. Cell Biology*, 30: 843-53.
47. PEREZ, G., HERNANDEZ, M., MORA, E. (1990). Isolation and characterization of a lectin from the seeds of *Dioclea lehmanni*. *Phytochemistry*, 29: 1745-9.
48. RAVISHANKAR, R., THOMAS, C.J., SUGUNA, K., SUROLIA, A., VIJAYAN, M. (2001). Crystal structures of the peanut lectin-lactose complex at acidic pH: retention of unusual quaternary structure, empty and carbohydrate bound combining sites, molecular mimicry and crystal packing directed by interactions at the combining site. *Proteins*, 43: 260-70.

49. ROZWARSKI, D.A., SWAMI, B.M., BREWER, C.F., SACCHETTINI, J.C. (1998). Crystal structure of the lectin from *Dioclea grandiflora* complexed with core trimannoside of asparagine-linked carbohydrates. *Journal of Biological Chemistry*, 273(49): 32818-25.
50. RUDIGER H. (1977). Purification and properties of blood-group-specific lectins from *Vicia cracca*. *Eur. J. Biochem.*, 72: 317-322.
51. SALINOVICH, O., MONTELARO, R.C. (1986). Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 156, 341-347.
52. SAPER, M.A., LIS, H., SHARON, N., SHAANAN, B. (1987). Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the lectin from *Erythrina corallodendron*. *J. Mol. Biol.*, 193: 823-4.
53. SAVAGE, A.V., DONOHUE, J.J., KOELEMAN, C.A., VAN DEN EIJNDEN, D.H. (1990). Structural characterization of sialylated tetrasaccharides and pentasaccharides with blood group H and Le(x) activity isolated from bovine submaxillary mucin. *Eur. J. Biochem.*, 193: 837-843.
54. SHARON, N., LIS, H. (2003). *Lectins*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Netherlands.
55. SILVA, J.A., DAMICO, D.C., BALDASSO, P.A., MATTIOLI, M.A., WINCK, F.V., FRACETO, L.F., NOVELLO, J.C., MARANGONI, S. (2007). Isolation and biochemical characterization of a galactoside binding lectin from *Bauhinia variegata candida* (Bvcl) seeds. *Protein J.* 26, 193-201.
56. SRINIVAS, V.R., REDDY, G.B., AHMAD, N., SWAMINATHAN, C.P., MITRA, N., SUROLIA, A. (2001). Legume lectin family, the 'natural mutants of the quaternary state', provide insights into the relationship between protein stability and oligomerization. *Biochim Biophys Acta*, 1527:102-11.
57. SVENSSON, C., TENEBERG, S., NILSSON, C.L., KJELLBERG, A., SCHWARZ, F.P., SHARON, N., KRENGEL, U. (2002). High-resolution crystal structures of *Erythrina cristagalli* lectin in complex with lactose and 2'-alpha-L-fucosyllactose and correlation with thermodynamic binding data. *J.Mol.Biol.*, 321: 69-83.
58. THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G., GIBSON, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through

- sequence^{*} weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22: 4673-4680.
59. TON, J., MAUCH-MANI, B. (2004). α -amino-butyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-dependent priming for callose. *Plant J.*, 38: 119-130.
60. VAN HALBEEK, H., DORLAND, L., Vliegenthart, J.F.G., Kochetkov, K., Arbatsky, N.P., Derevitskaya, V.A. (1982). Characterization of the primary structure and the microheterogeneity of the carbohydrate chains of porcine blood-group H substance by 500-MHz ¹H-NMR spectroscopy. *Eur. J. Biochem.*, 127: 21-29.
61. VARGIN, A., TEPLYAKOV, A. (1997). MOLREP: an Automated Program for Molecular Replacement. *J. Appl. Cryst.* 30, 1022-1025.
62. YAMAUCHI, D., MINAMIKAWA, T. (1990). Structure of the gene encoding concanavalin A from *Canavalia gladiata* and its expression in *Escherichia coli* cells. *Febs Lett.*, 260: 127-130.
63. YOSHIDA, K., TAZAKI, K. (1999). Expression patterns of the genes that encode lectin or lectin-related polypeptides in *Robinia pseudoacacia*. *Aust. J. Plant. Physiol.*, 26: 495-502.
64. ZENTENO, E., VASQUEZ, R., CORDOBA, F., WIERUSZESKI, J.M., MONTREUIL, J., DEBRAY H. (1995). Specificity of the isolectins from the plant cactus *Machaerocereus eruca* for oligosaccharides from porcine stomach mucin. *Glycoconj. J.*, 12: 699-706.
65. ZHU, K., HUESING, J.E., SHADE, R.E., BRESSAN, R.A., HASEGAWA, P.M., MURDOCK, L. (1996). An insecticidal N-acetylglucosamine-specific lectin gene from *Griffonia simplicifolia* (Leguminosae). *Plant Physiol.*, 110: 195-202.

Capítulo 3. Estrutura Cristalográfica
da Quimerolectina com Atividade
Quitinásica de Sementes de *Parkia*
platycephala

Capítulo 3. Estrutura Cristalográfica da Quimerolectina com Atividade Quitinásica de sementes de *Parkia platycephala*

3.1. Introdução

Lectinas compreendem uma classe heterogênea de (glico)proteínas que se ligam de maneira reversível e específica a carboidratos sem alterar sua estrutura covalente (VAN DAMME *et al.*, 1998). As lectinas são capazes de decifrar glicocódigos codificados em estruturas de glicanos na superfície celular em processos como comunicação celular, defesa contra patógenos, fertilização, desenvolvimento, infecções por parasitas, metástase tumoral e defesa de plantas contra herbívoros (GABIUS e GABIUS, 1997). Mecanismos de reconhecimento de carboidratos estão relacionados de forma independente a um pequeno número de arranjos protéicos (VAN DAMME *et al.*, 1998) (e.g. domínio *jelly-roll*, lectinas do tipo C, motivo hélice β , motivo folha β , domínio prima β , enovelamento de lectinas de monocotiledôneas; exemplos estão disponíveis no banco de dados de lectinas no sítio <http://www.cermav.cnrs.fr/lectines/>). As lectinas de sementes de leguminosas constituem a família de lectinas mais amplamente estudada. Essas lectinas têm mostrado uma significativa importância no estabelecimento das bases estruturais (RINI, 1995; WEIS e DRICKAMER, 1996; ELGAVISH e SHAANAN, 1997; LORIS *et al.*, 1998; BOUCKAERT *et al.*, 1999; VIJAYAN e CHANDRA, 1999) e termodinâmicas (CHERVENAK e TOONE, 1995; DAM *et al.*, 1998; DAM *et al.*, 2000a; DAM *et al.*, 2000b) do reconhecimento seletivo de carboidratos.

Muitos dos estudos com lectinas da família Leguminosae envolvem membros da subfamília Papilionoideae, enquanto que investigações sobre lectinas das outras duas subfamílias, Caesalpinoideae e Mimosoideae, são escassos. Até o presente momento, apenas lectinas de Mimosoideae foram funcionalmente e estruturalmente caracterizadas e todas elas pertencendo ao gênero *Parkia*, incluindo *Parkia speciosa* (SUVACHITTANONT e PEUTPAIBOON, 1992), *P. javanica* (UTARABHAND e AKKAYANONT, 1995), *P. discolor* (CAVADA *et al.*, 2000) e *P. platycephala* (CAVADA *et al.*, 1997; MANN *et al.*, 2001; RAMOS *et al.*, 1999; GALLEG DEL SOL *et al.*, 2005a; GALLEG DEL SOL *et al.*, 2005b). O gênero *Parkia* (Leguminosae, Mimosoideae) destaca-se como o grupo mais primitivo entre as leguminosas (HEYWOOD, 1971) e é um gênero pantropical de árvores que

compreende cerca de 30 espécies encontradas em regiões neotropicais das Honduras até o sudeste brasileiro, oeste africano, a região nordeste da Malásia e o sul da Tailândia. *P. platycephala* é uma importante árvore forrageira que cresce em várias regiões do nordeste brasileiro. A lectina de sementes de *P. platycephala* (PPL) é uma proteína não glicosilada de cadeia única com 47,9 kDa, composta de três domínios prisma β relacionados à jacalina (GALLEGO DEL SOL *et al.*, 2005a; GALLEGO DEL SOL *et al.*, 2005b).

A especificidade da PPL por manose, que é um abundante componente de glicoconjugados expostos na superfície celular de bactérias e fungos, sugere uma ação da lectina na defesa contra patógenos vegetais (VAN DAMME *et al.*, 1998). Além disso, a PPL apresenta similaridade de seqüência primária com proteínas codificadas de genes de defesa reguladores de stress e patogênese em diversas plantas, o que colabora para uma ancestralidade comum com lectinas relacionadas à jacalina e proteínas de defesa (MANN *et al.*, 2001). Além das lectinas, as quais o real mecanismo de defesa em plantas ainda necessita ser elucidado (CHRISPEELS e RAIKHEL, 1991), as plantas defendem-se de patógenos secretando enzimas relacionadas à patogênese, como xilanases e quitinases, que são capazes de degradar a parede celular de patógenos bacterianos e fúngicos (COLLINGE *et al.*, 1993; HAMEL *et al.*, 1997; KASPRZEWSKA, 2003). Em artigo previamente publicado por nosso grupo, foi reportado o isolamento de uma endoquitinase de sementes de *P. platycephala* (PPL2) com atividade hemaglutinante e sua cristalização (CAVADA *et al.*, 2005). A sua seqüência completa de aminoácidos foi obtida por sequenciamento do gene colando como cDNA (ROCHA, 2005) e a caracterização bioquímica da proteína que revela sua atividade endoquitinásica e lectínica foi reportada por Castellón (2004).

A seqüência completa da PPL2 após analisada pelo programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) revelou extensa similaridade (superior a 75%) com um grande número de quitinases de plantas. Entre elas destacam-se a quitinase básica do tipo III de *Nicotiana tabacum* (P29061),; a quitinase ácida de *Glycine max* (BAA77677), a quitinase b de *Phytolacca americana* (Q9S9F7), a quitinase de *Psophocarpus tetragonolobus* (BAA08708), a quitinase de *Vitis vinifera* (CAC14014) e a quitinase básica de *Vigna unguiculata* (Q43684). Essas proteínas são poli(1,4-(N-acetil- β -D-glicosamina))-glicano hidrolases da família 18 das glicosil hidrolases (EC 3.2.1.14) (HENRISSAT, 1991; KASPRZEWSKA, 2003), as quais têm

por protótipo a*hevamina isolada da seringueira (*Hevea brasiliensis*) (JEKEL *et al.*, 1991; VAN SCHELTINGA *et al.*, 1994).

Experimentos de cromatografia gasosa mostraram que a PPL2 é capaz de liberar da quitina 3 μg GlcNAc/h/mg de proteína, mostrando sua capacidade de hidrolisar ligações glicosídicas β (1 \rightarrow 4) que une as moléculas de 2-aceto-amido-2-desoxi- β -D-glicopiranosídeos (GlcNAc) na forma de quitina. A atividade endoquitinásica também pode ser evidenciada uma vez que a PPL2 é capaz de hidrolisar ligações glicosídicas β (1 \rightarrow 4) internas, originando produtos do tipo GlcNAc, (GlcNAc)₂, e (GlcNAc)₃. (Castellón, 2004).

3.2. Objetivos

Objetivo Geral

Determinar a estrutura tridimensional por cristalografia de raios X da quitinase com atividade hemaglutinante, PPL2, isolada de sementes de *Parkia platycephala*.

Objetivos Específicos

Purificar a endoquitinase com atividade hemaglutinante PPL2.

Cristalizar a proteína purificada.

Resolver a estrutura tridimensional por substituição molecular.

Determinar o sítio catalítico e as pontes dissulfeto presentes na estrutura.

Caracterizar a estrutura quaternária formada pelos monômeros de PPL2.

3.3. Material e Métodos

3.3.1. Purificação da lectina GlcNAc específica de *Parkia platycephala*

Sementes maduras de *P. platycephala* foram coletadas e moídas em moedor de café. A farinha foi delipidada com *n*-hexano, secada à temperatura ambiente e mantida seca para uso posterior. As proteínas solúveis foram extraídas em temperatura ambiente, por agitação contínua durante 12 horas na proporção de 1:15 (m/v) em 500 mM de solução de HCl, contendo 150 mM de NaCl. O material insolúvel foi separado por centrifugação a 10.000 x *g*, por 20 minutos, a 5 °C. O sobrenadante teve seu pH ajustado para 7,0, tendo sido deixado em repouso por 12 h a 4 °C. O precipitado foi removido por centrifugação e o sobrenadante submetido à precipitação com 60 % de sulfato de amônio. Após centrifugação, o precipitado foi ressuspense em um pequeno volume de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,0, contendo NaCl 100 mM, dialisado contra este tampão e submetido a cromatografia de afinidade em coluna de Red-Sepharose (26 x 1,5 cm) equilibrada com o mesmo tampão de ressuspensão. O material não ligado foi eluído na lavagem da coluna com o tampão de equilíbrio e a fração retida foi removida com NaCl 3 M adicionado ao tampão de equilíbrio e dialisada também contra o tampão de equilíbrio (CAVADA *et al.*, 2005). A sua atividade hemaglutinante foi testada como descrito por Castellón (2004), apenas para confirmar a integridade da proteína.

A fração protéica retida em coluna de Red Sepharose foi posteriormente fracionada por HPLC em coluna de fase reversa como descrito por Cavada *et al.* (2005). As frações foram coletadas manualmente, liofilizadas e estocadas a -70 °C para serem utilizadas nos experimentos de cristalização.

3.3.2. Cristalografia de Raios X

3.3.2.1. Cristalização da Proteína

A proteína liofilizada PPL2 foi diluída na concentração de 7,5 mg.mL⁻¹ em água grau MiliQ para os experimentos de cristalização. PPL2 foi cristalizada pelo método de difusão de vapor em gota suspensa a 20 °C como descrito por Cavada *et al.*

(2005). Os cristais pertencem ao grupo espacial $P2_12_12_1$ com um monômero na unidade assimétrica.

3.3.2.2. Coleta de Dados da Difração de Raios X

Para a coleta de dados, os cristais foram mergulhados em uma solução crioprotetora contendo 75 % da solução de cristalização (sulfato de amônio 0,2 M, citrato tri-sódico desidratado 0,1 M, pH 5,6, PEG 4000 30 % (m/v) e glicerol 25 %). Os cristais foram resfriados a 100K por um *spay* de nitrogênio líquido.

Os dados foram coletados a uma resolução máxima de 1,73 Å em fonte de luz Síncrotron na estação MX1 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (Campinas, Brasil). Os dados foram processados e escalonados utilizando os programas MOSFLM (LESLIE, 1992) e SCALA (CCP4, 1994), respectivamente. Os dados cristalográficos estão resumidos na tabela 3.1.

3.3.2.3. Resolução da Estrutura Cristalográfica da PPL2

A estrutura tridimensional da PPL2 foi determinada por substituição molecular utilizando o programa *AMoRe* (CCP4, 1994), utilizando dados na faixa de resolução de 15-3,0 Å, e as coordenadas da hevamina (Código PDB: 2HVM) (VAN SCHELTINGA *et al.*, 1994) como modelo de busca. Funções de rotação e translação confirmaram uma molécula na unidade assimétrica. A posição e orientação da molécula, como uma única entidade de corpo rígido, foram refinadas por 20 ciclos com REFMAC (CCP4, 1994), utilizando reflexões na faixa de resolução entre 32,31-1,73 Å. As substituições apropriadas dos resíduos de aminoácidos que diferem entre o modelo hevamina e a seqüência da PPL2 foram realizadas com o auxílio do programa Xfit (McRee, 1999) Vários passos de reconstrução do modelo foram realizados através de refinamentos de restrições utilizando o REFMAC até a obtenção de um modelo a 1,73 Å de resolução. Moléculas de íon sulfato foram posicionadas interagindo com o modelo na inspeção do mapa $F_o - F_c$. Para cada ciclo de refinamento, a estereoquímica do modelo foi monitorada com o PROCHECK, também incorporado ao pacote de programas do CCP4. Finalmente, as moléculas de água foram posicionadas no modelo em vários passos de refinamento, utilizando

Tabela 3.1. Dados estatísticos da resolução da estrutura tridimensional da PPL2

	Dados da resolução geral	Camada de mais alta resolução
Coleta de Dados		
Número de observações	95.262	12.669
Número de observações únicas	25.805	3.521
R_{merge}	0,040	0,228
Limite de mais alta resolução (Å)	1,73	1,73
Limite de mais baixa resolução (Å)	32,31	1,83
Completeza (%)	95,5	90,4
Multiplicidade	3,7	3,6
$I/\sigma(I)$	13,1	2,4
Comprimento de onda (Å)		1,431
Grupo espacial		P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Parâmetros de cela (Å)		a = 55,19, b = 59,95, c = 76,70
Refinamento		
Faixa de resolução (Å)		1,73 – 32,31
R_{factor} (%)		16,88
R_{free} (%)		19,87
Número de átomos da proteína (não-hidrogênios)		2.086
Número de íons sulfato		04
Número de moléculas de água		249
RMS desvios dos valores ideais		
Comprimento das ligações (Å)		0,012
Ângulos das ligações (graus)		1,48
Fatores de Temperatura		
Média dos B-fatores para toda a cadeia (Å ²)		13,26
Média dos B-fatores para os íons sulfato (Å ²)		41,97
Média dos B-fatores para moléculas de água (Å ²)		24,29
Gráfico de Ramachandran		
Resíduos nas regiões mais favorecidas		195 (87, 8 %)
Resíduos nas regiões adicionalmente permitidas		26 (11, 7 %)
Resíduos nas regiões generosamente permitidas		1 (0, 5 %)

o Arp/Warp e foram verificadas uma a uma manualmente. As coordenadas atômicas, corrigidas no XtalView (McRee, 1999) estão acessíveis no *Protein DataBank* (<http://www.rcsb.org/pdb/>) através da coordenada 2GSJ.

3.4. Resultados e Discussão

3.4.1. PPL2, uma Nova Lectina Monomérica não Glicosilada com Afinidade por GlcNAc

PPL2 foi purificada de sementes de *P. platycephala* por cromatografia de afinidade em Red-Sepharose como descrito por Castellón (2004) (Figura 3.1A). A proteína foi capaz de aglutinar eritrócitos de coelho tratados com tripsina (128 unidades de hemaglutinação/mL) e esta atividade foi inibida por GlcNAc (19 mM) como previamente descrito por Castellón (2004). A massa molecular aparente da PPL2 determinada por SDS-PAGE é de 43 kDa (não reduzida) e 31 kDa após redução. Contudo, a massa molecular medida por espectrometria de massas em MALDI-TOF é de 29.407 Da, mesmo na presença de 4-vinilpiridina (Castellón, 2004) (Figura 3.1A). Porém, o tratamento redutor aumentou a massa da PPL2 a 30.052 Da (Figura 3.1B). O incremento de massa de 645 Da indicou que a PPL2 sofreu a incorporação de 6 grupos piridil-etil. Os dados combinados evidenciam a existência de seis cisteínas que formam pontes dissulfeto. A seqüência da PPL2 previamente obtida por cDNA confirma essa característica. A massa molecular aparente da PPL2 em uma faixa de pH variando entre 2,5-8,5 foi determinada por ultracentrifugação analítica e apresentou 34 ± 3 kDa (Castellón, 2004) (Figura 3.1B). Os dados associados evidenciam que esta é uma proteína monomérica pH-independente. A análise de carboidratos ligados a cadeia mostrou que não havia nenhum monossacarídeo presente na amostra protéica após tratamento com glicosidases, o que indica fortemente a não glicosilação da lectina (Castellón, 2004).

3.4.2. PPL2 Apresenta Atividade Quitinásica

As quitinases vegetais constituem uma classe de proteínas relacionadas à patogênese, que desempenham importante papel na defesa contra patógenos, através da degradação de quitina presente na parede celular de fungos e cutícula de

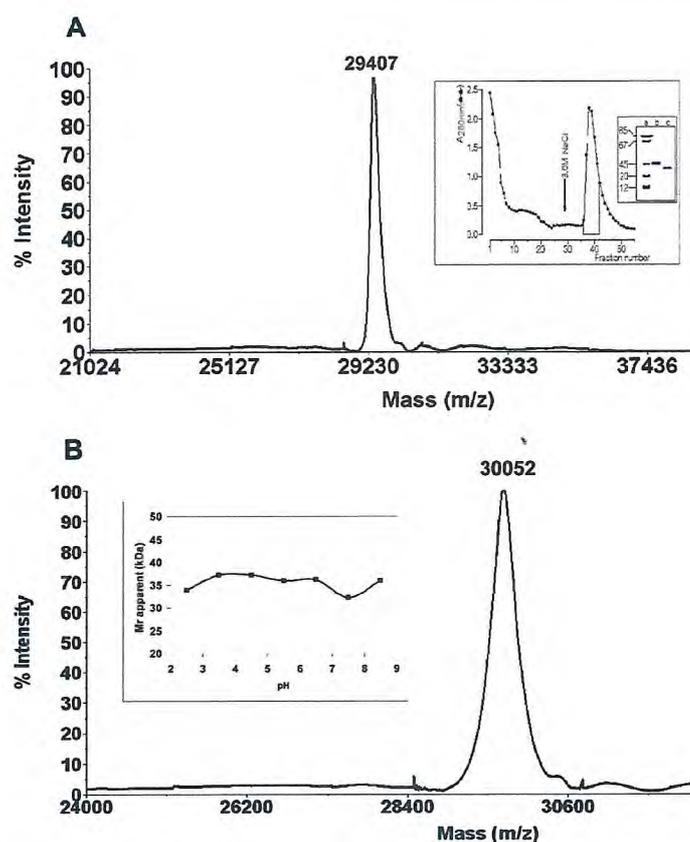


Figura 3.1. Purificação e determinação da massa molecular da PPL2. (A) Determinação da massa da PPL2 purificada por cromatografia de afinidade (quadro) através de espectrometria de massas por MALDI-ToF. Quadro: Fração precipitada com 60 % de saturação em sulfato de amônio do extrato de sementes de *Parkia platycephala*, ressuspenso em Tris 50 mM pH 7,0, contendo NaCl 100 mM, aplicado na coluna de Red Sepharose. O material retido foi eluído com 3 M NaCl. Frações que exibem atividade hemaglutinante estão representadas na área cinza. No painel ao lado direito, encontra-se a eletroforese em SDS da PPL2; linha a, marcadores de massa molecular, linhas b e c, PPL2 não reduzida e reduzida, respectivamente. **(B)** Determinação da massa da PPL2 reduzida e metilada por MALDI-ToF. Quadro: Massas moleculares aparentes da PPL2 nativa determinadas por centrifugação analítica em diferentes pHs (CASTELLÒN, 2004).

insetos (ROBERTUS e MONZINGO, 1999). A primeira quitinase isolada de espécies da subtribo Mimosoideae é uma quitinase antifúngica de *Leucaena leucocephala* (KAOMEK *et al.*, 2003). Esta proteína pertence à classe I de quitinases da família 19 das glicosil hidrolases, porém sua estrutura primária não está relacionada à PPL2.

Deve-se notar, também, que as sementes de *P. platycephala* contêm duas diferentes lectinas: uma glicose/manose específica (PPL) (GALLEGO DEL SOL *et al.*, 2005a; GALLEGO DEL SOL *et al.*, 2005b) e outra ligante a GlcNAc como aqui descrito. O fato de a manose ser um importante constituinte de glicoconjugados da superfície de vírus, bactérias e fungos já indica que tanto a PPL como outras lectinas com especificidade por glicose/manose possam atuar na defesa de plantas contra patógenos (VAN DAMME *et al.*, 1998). Estruturalmente, o arranjo dos sítios de ligação a carboidratos do dímero da PPL (GALLEGO DEL SOL *et al.*, 2005b) sugere um mecanismo de interações multivalentes, que levam a uma ligação cruzada dos carboidratos ligantes como parte da estratégia do hospedeiro para defender-se do patógeno em um mecanismo de opsonização.

A PPL2 com sua atividade endoquitinásica descrita, juntamente com uma atividade lectínica pelo mesmo substrato, atuaria como um mecanismo paralelo de defesa da planta contra organismos que apresentam quitina na constituição de suas estruturas de revestimento. A capacidade de reconhecer e ligar-se reversivelmente à resíduos de quitina seria uma forma de ampliar a capacidade e eficiência da reação enzimática de quitinase dessa proteína.

A existência de lectinas glicose/manose e quitinases em plantas é recorrente, como pode ser observado para *Canavalia ensiformis* (Leguminosae), que em suas sementes possui concanavalina A, uma lectina de arranjo tridimensional característico das lectinas de leguminosas (*jellyroll*) (LORIS *et al.*, 1998), e a concanavalina B, que compartilha cerca de 40 % de similaridade seqüencial com quitinases vegetais da família 18 das glicosil hidrolases (HENNIG, 1995). A atividade quitinásica nesta proteína, ao contrário da PPL2, não foi evidenciada, o que pode ser explicado por modificações nos resíduos que formam o sítio catalítico dessas quitinases, tornando-a inativa

3.4.3. Estrutura Tridimensional da PPL2

A Figura 3.2 mostra a estrutura da PPL2. O mapa de densidade eletrônica 2Fo–Fc contornado a 1σ mostrou que, com exceção de um pequeno loop entre a hélice α_4 e folha β_5 , correspondente aos resíduos Asn144 a Lys149 (veja figura 3.3), a maioria dos resíduos de aminoácidos da proteína está corretamente assinalado nesta densidade. O modelo da PPL2 tem ótima estereoquímica geral sem apresentar nenhum resíduo em regiões não permitidas do gráfico de Ramachandran (Tabela 3.1).

A estrutura da PPL2 consiste de um barril $(\beta/\alpha)_8$ com dimensões aproximadas de 50 Å X 40 Å X 25 Å, que incluem três pontes dissulfeto (Cys20-Cys67, Cys50-Cys57 e Cys158-Cys187) e cinco ligações cis-peptídicas. Duas dessas ligações (Gly147-Lys148 e Lys148-Lys149) estão localizadas em regiões de baixa densidade eletrônica, enquanto que as três restantes (Ala31-Phe32, Phe160-Pro161 e Trp253-Asp254), estão bem definidas na densidade. Não foi detectada a presença de íons metálicos ou outros ligantes no mapa Fo-Fc, nem na análise dos picos no mapa de Patterson.

3.4.4. Comparação Estrutural e Análise dos Motivos Conservados

Os aspectos gerais do modelo da PPL2 são conservados em outras quitinases vegetais da família GH18, por exemplo, a hevamina (PDB 2HVM), o inibidor de xilanase XIP-I de *Triticum aestivum* (1TE1), e ConB (1CNV), com as quais compartilha 68 %, 40 % e 40 % de similaridade, respectivamente (Figura 3.3). A estrutura tridimensional da PPL2 pode ser comparada com todas elas (hevamina, XIP-I e ConB), apresentando desvios quadráticos médios (r.m.s.d.), para todos os átomos de $C\alpha$, de 0,90 Å, 1,01 Å e 1,14 Å, respectivamente. Em particular, dois motivos consenso descritos para as glicosil hidrolases da família 18 (VAN SCHELTINGA *et al.*, 1994) são conservados na PPL2; a presença das folhas β_3 e β_4 e uma rede de pontes de hidrogênio entre os resíduos Asp120, Gly121 e Val74 (Figuras 3.3 e 3.4).

Por outro lado, a maior divergência estrutural entre essas proteínas GH18 e a PPL2 está relacionada aos *loops* do sítio ativo, que compreendem os resíduos de

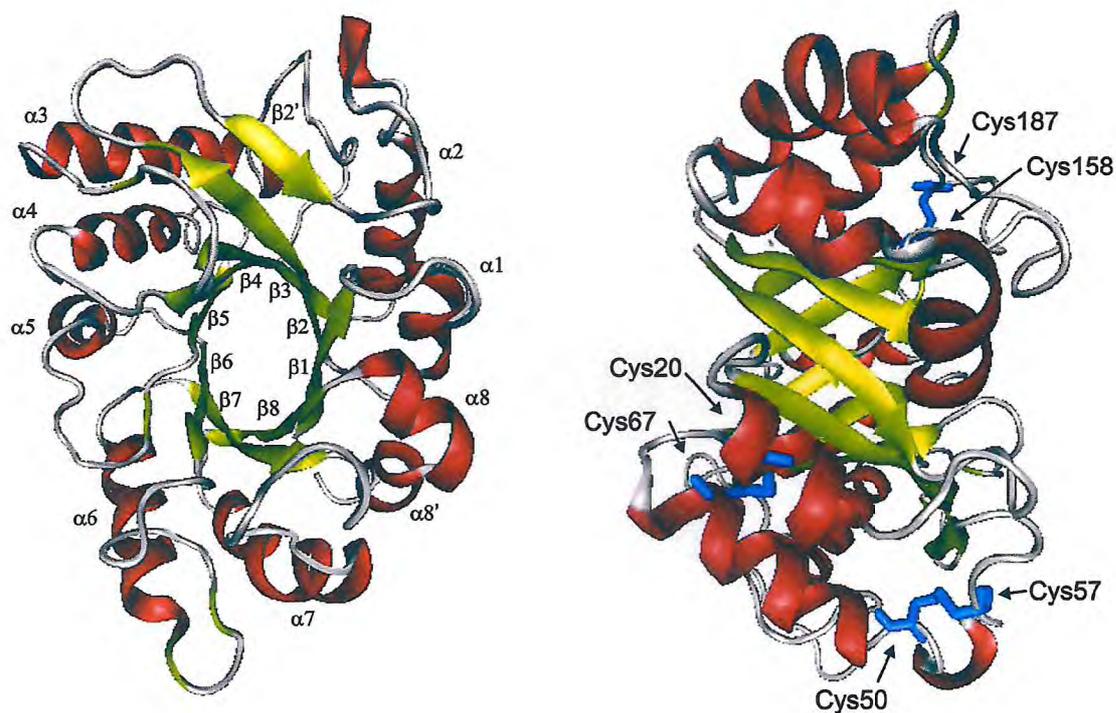


Figura 3.2. Estrutura tridimensional da PPL2. Os painéis A e B mostram duas visões do arranjo tridimensional barril $(\alpha\beta)_8$ da PPL2. As hélices α (vermelho) e as folhas β (amarelo) estão numeradas de 1-8. As pontes dissulfeto estão destacadas em azul. O sítio ativo está localizado na face direita do modelo

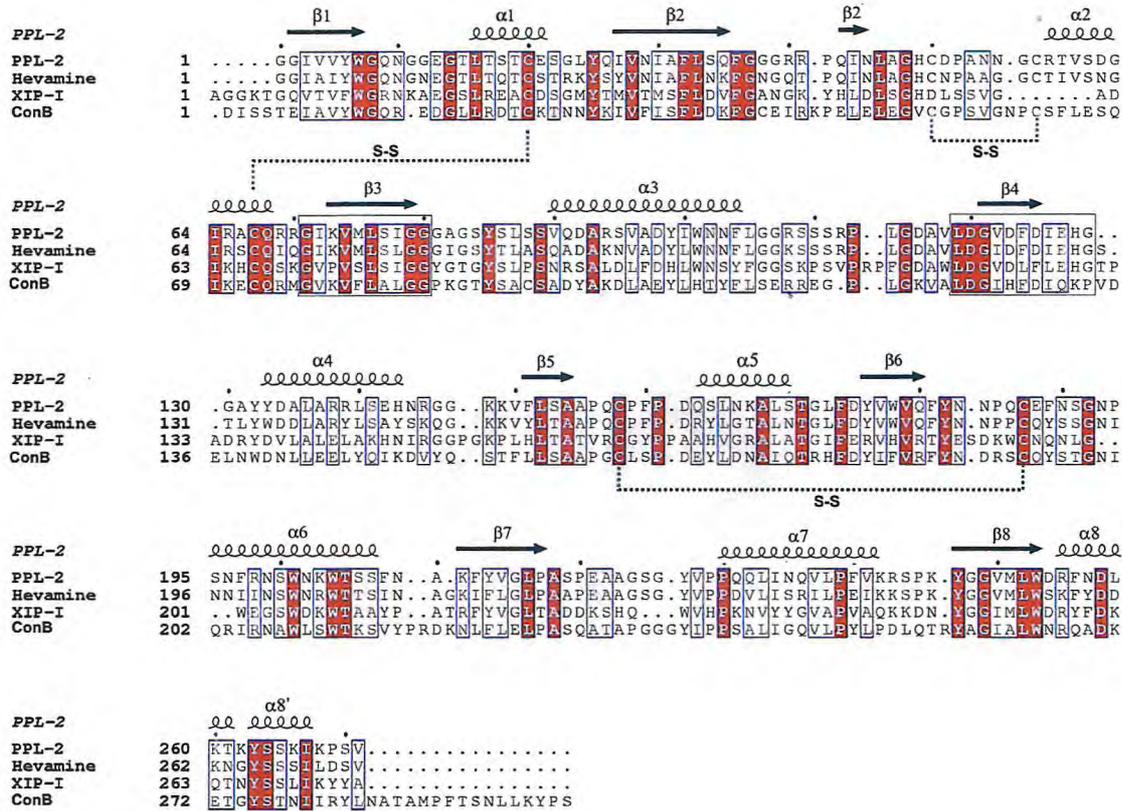


Figura 3.3. Alinhamento múltiplo das seqüências da PPL2, hevamina, XIP-I (inibidor de xilanase de *Triticum aestivum*) e ConB (proteína tipo quitinase, inativa, de *Canavalia ensiformis*). Os resíduos conservados nas quatro proteínas estão marcados de vermelho com letras brancas. Substituições conservativas em pelo menos duas das proteínas estão destacadas em quadros com letras vermelhas. Os resíduos de cisteína envolvidos na formação de pontes dissulfeto (S-S) estão conectados por linhas pontilhadas. A estrutura secundária da PPL2 está mostrada na parte superior do alinhamento: setas representam as folhas β e as molas hélices α.

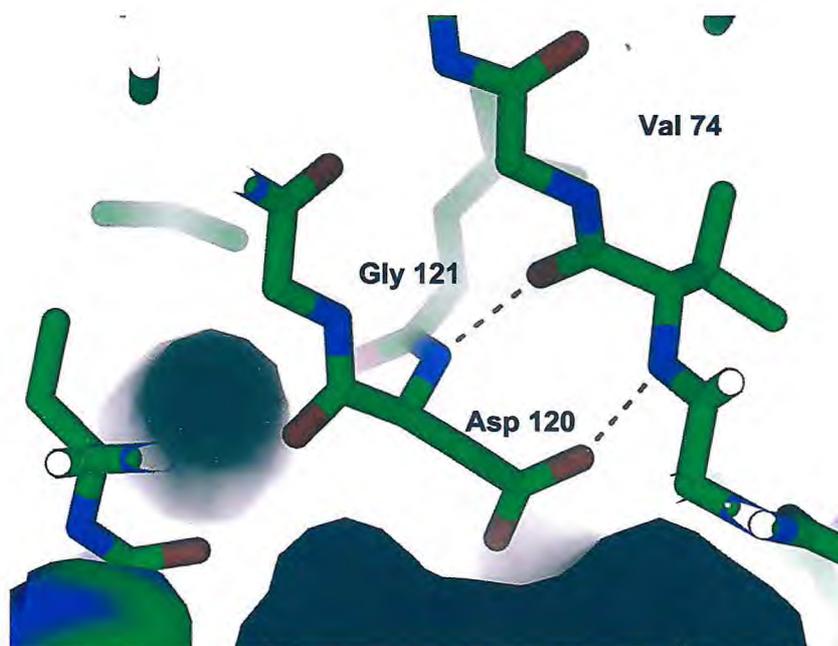


Figura 3.4 Rede de pontes de hidrogênio da estrutura da PPL2. Os resíduos da PPL2: Asp120, Gly121 e Val74 representam um motivo conservado na família das glicosil hidrolases 18.

Asp125, Glu127* e Tyr182 (Figura 3.2 e Figura 3.3). Os resíduos Asp125 e Glu127 estão localizados no loop $\beta_4\alpha_4$ e a Tyr182 no loop $\beta_6\alpha_6$. A elevada conservação estrutural com relevância na função enzimática da proteína sugere que essas quitinases devam compartilhar de um mesmo mecanismo catalítico. Além disso, os dados sobre a PPL2 indicam uma afinidade por GlcNAc de forma reversível. Isso a classifica como uma quimerolectina e sugere um mecanismo evolutivo de aumento da eficiência da atividade quitinásica na defesa contra patógenos causada por ciclos de ancoragem-clivagem-liberação e posterior ancoragem em outra região do polímero da quitina. Desta maneira, o processo de degradação da quitina tornaria-se mais efetivo e acelerado.

3.5. Conclusão

A PPL2 é uma quimerolectina similar a endoquitinases da família 18 das glicosil hidrolases, que exhibe atividade hemaglutinante contra eritrócitos de coelho, capacidade de ligar-se reversivelmente a GlcNAc e atividade catalítica contra quitina. Tais atividades sugerem um mecanismo evolutivo, que resultou no aumento da eficiência da atuação desta quimerolectina ao ancorar o substrato sobre o qual sua atividade catalítica está direcionada.

3.6. Referências Bibliográficas

1. 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.
2. CASTELLÓN, R.E.R. Purificação e caracterização parcial de uma nova proteína de sementes de *Parkia platycephala* Benth com potencial na defesa de plantas, 2004. Tese de Doutorado.
3. 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.
4. CAVADA, B.S., SANTOS, C.F., GRANGEIRO, T.B., SILVA, L.I.M., CAMPOS, M.J.O., SOUSA, F.A.M., CALVETE, J.J. (1997). Isolation and partial characterization of a lectin from *Parkia platycephala* Benth seeds. *Physiol Mol. Biol Plant*, 3: 109-115.
5. CAVADA, B.S., CASTELLÓN, R.E.R., VASCONCELOS, G.G., ROCHA, B.A.M., BEZERRA, G.A., DEBRAY, H., DELATORRE, P., NAGANO, C.S., TOYAMA, M., PINTO, V.P.T., MORENO, F.B.M.B., CANDURI, F., De AZEVEDO Jr., W.F. (2005). Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a new chitin-binding protein from *Parkia platycephala* seeds. *Acta Crystallogr F.*, 61: 841-843.
6. CHERVENAK, M.C., TOONE, E.J. (1995) Calorimetric Analysis of the Binding of Lectins with Overlapping Carbohydrate Binding. *Biochemistry*, 34: 5685-5695.
7. CHRISPEELS, M.J., RAIKHEL, N.V. (1991). Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. *Plant Cell.*, 3: 1-9.
8. Collaborative Computational Project, Number 4. (1994). *Acta Cryst.*, D50: 760-763.
9. COLLINGE, D.B., KRAGH, K.M., MIKKELSEN, J.D., NIELSEN, K.K., RASMUSSEN, U., VAD, K. (1993) Plant chitinases. *Plant J.*, 3: 31-40.

10. DAM, T.K., CAVADA, B.S., GRANGEIRO, T.B., SANTOS, C.F., CECCATTO, V.M., 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.
11. DAM, T.K., CAVADA, B.S., GRANGEIRO, T.B., SANTOS, C.F., 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.
12. 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.
13. ELGAVISH, S., SHAANAN, B. (1997). Lectin-carbohydrate interactions: different folds, common recognition principles. *Trends Biochem. Sci.*, 22: 462-467.
14. GABIUS, H.J., GABIUS, S. (1997). *Glycoscience. Status and perspectives.* Chapman and Hall, Weinheim, Germany.
15. GALLEGU DEL SOL, F., GÓMEZ, J., HOOS, C., NAGANO, C.S., CAVADA, B.S., ENGLAND, P., CALVETE, J.J. (2005a). Energetics of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- α -D-mannose binding to the *Parkia platycephala* seed lectin and its use for MAD phasing. *Acta Cryst.*, F61: 326-331.
16. GALLEGU DEL SOL, F., NAGANO, C.S., CAVADA, B.S., CALVETE, J.J. (2005b). The first crystal structure of a Mimosoideae lectin reveals a novel quaternary arrangement of a widespread domain. *J. Mol. Biol.*, 353: 574-583.
17. HAMEL, F., BOIVIN, R., TREMBLAY, C., BELLEMARE, G. (1997). Structural and evolutionary relationships among chitinases of flowering plants. *J. Mol. Evol.*, 44: 614-624.
18. HENNIG, M., JANSONIUS, J.N., VAN SCHELTINGA, A.C.T., DIJKSTRA, B.W., SCHLESIER, B.J. (1995). Crystal structure of concanavalin B at 1.65 Å

- resolution. An "inactivated" chitinase from seeds of *Canavalia ensiformis*, J. Mol. Biol., 254: 237-246.
19. HENRISSAT, B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. Biochem. J., 280: 309-316.
20. HEYWOOD, V.H. (1971) Chemotaxonomy of the Leguminosae (Harborne, J.B. & Boulter, D., eds.) pp 1-29. Academic Press, London.
21. JEKEL, P.A., HARTMANN, B.H., BEINTEMA, J.J. (1991). The primary structure of hevamine, an enzyme with lysozyme/chitinase activity from *Hevea brasiliensis* latex. Eur. J. Biochem., 200: 123-130.
22. KAOMEK, M., MIZUNO, K., FUJIMURA, T., SRIYOTHA, P., CAIRNS, J.R. (2003). Cloning, expression, and characterization of an antifungal chitinase from *Leucaena leucocephala* de Wit. Biosci. Biotechnol. Biochem., 67: 667-676.
23. KASPRZEWSKA, A. (2003). Plant chitinases-Regulation and function. Cell Mol. Biol. Lett. 8: 809-824.
24. LORIS, R., HAMELRYCK, T., BOUCKAERT, J., WYNS, L. (1998). Legume lectin structure. Biochim. Biophys. Acta, 1383: 9-36.
25. LESLIE, A. G. W. (1992). Joint CCP4 and ESF-EACMB. Newsletter on Protein Crystallography, 26.
26. MANN, K., FARIAS, C.M., GLALLEGO DEL SOL, F., SANTOS, C.F., GRANGEIRO, T.B., NAGANO, C.S., CAVADA, B.S., CALVETE, J.J. (2001). The amino-acid sequence of the glucose/mannose-specific lectin isolated from *Parkia platycephala* seeds reveals three tandemly arranged jacalin-related domains. Eur. J. Biochem., 268: 4414-4422.
27. MCREE, D.E. (1999). XtalView/Xfit--A versatile program for manipulating atomic coordinates and electron density. J. Struct. Biol. 125, 156-165.
28. 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.
29. RINI, J.M. (1995). Lectin Structure. Annu. Rev. Biomol. Struct., 24: 551-577.

30. ROBERTUS, J.D., MONZINGO, A.F. (1999). The structure and action of chitinases. *EXS*, 87: 125-135.
31. ROCHA, B.A.M. Caracterização estrutural por cristalografia de raios X e sequenciamento de aminoácidos de uma nova proteína quitina ligante de sementes *Parkia platycephala* Benth, 2005. Tese de Doutorado.
32. SUVACHITTANONT, W., PEUTPAIBOON, A. (1992). Lectin from *Parkia speciosa* seeds. *Phytochemistry*, 31: 4065-4070.
33. UTARABHAND, P., AKKAYANONT, P. (1995). Purification of a lectin from *Parkia javanica* beans. *Phytochem.*, 38: 281-285.
34. 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 rôles. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 17: 575-692.
35. VAN SCHELTINGA, A.C.T., KALK, K.H., BEINTEMA, J.J., DIJKSTRA, B.W. (1994). Crystal structures of hevamine, a plant defense protein with chitinase and lysozyme activity, and its complex with an inhibitor. *Structure*, 2: 1181-1189.
36. VIJAYAN, M., CHANDRA, N. (1999). Lectins. *Curr. Op. Struct. Biol.*, 9: 707-714.
37. WEIS, W.I., DRICKAMER, K. (1996). Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. *Annu. Rev. Biochem.* 65, 441-473.

**Capítulo 4: Sequenciamento da
Lectina da Fração Albumina de
Sementes de *Acacia farnesiana***

Capítulo 4 – Lectina da Fração Albumina de Sementes de *Acacia farnesiana*

4.1. Introdução

Acacia farnesiana é um membro da família Leguminosae pertencente à subfamília Mimosoideae. As lectinas de leguminosas compreendem uma família de proteínas homólogas, que apresentam alta similaridade na seqüência de aminoácidos e estrutura terciária, embora sua especificidade a carboidratos e estruturas quaternárias variem bastante (SHARAON e LIS, 2003).

Nesta subfamília, apenas as lectinas de sementes dos gêneros *Acacia* (GUZMAN-PARTIDA *et al.*, 2004) e *Parkia* (SUVACHITTANONT e PEUTPAIBOON, 1992; UTARABHAND e AKKAYANONT, 1995; CAVADA *et al.*, 1997; CAVADA *et al.*, 2000) e a quimerolectina de *P. plathycephala* (PPL2) (CAVADA *et al.*, 2005) foram isoladas e caracterizadas detalhadamente. No gênero *Parkia*, estão disponíveis também estruturas tridimensionais da lectina de *P. plathycephala* nativa (PPL) (1ZGR) (GALLEGO DEL SOL *et al.*, 2005a) e em complexo com 5-bromo-4-cloro-3-indoil- α -D-manose (1ZGS) (GALLEGO DEL SOL *et al.*, 2005b).

No gênero *Acacia*, as isolectinas Vinorama (VL2–VL4), purificadas de sementes de *A. constricta* (vinorama), em sua caracterização, análises através de imunoenaios mostraram uma homologia seqüencial com diferentes lectinas do gênero *Phaseolus* (GUZMAN-PARTIDA *et al.*, 2004). A lectina de sementes de *A. farnesiana* (AFAL), isolada por cromatografia de troca iônica a partir da fração albumina, apresentou capacidade de ligar-se à quitina em experimentos cromatográficos que buscavam caracterizar sua afinidade. Esta apresenta uma seqüência N-terminal relacionada e similar a lectinas do gênero *Phaseolus* (SANTI-GADELHA, 2005). Contudo, isolectinas de *P. vulgaris* normalmente ligam-se a N-glicanos de GlcNac 1→6 ramificados. Uma lectina tipo PHA, que se liga a quitina, pode representar uma proteína de defesa mais potente contra insetos, fungos, nematóides e bactérias (SHARAON e LIS, 2003).

Outra evidência experimental particularmente interessante para AFAL é a sua capacidade de oligomerizar de forma tempo dependente. Isto pode ser visto em experimentos cromatográficos de exclusão molecular, que demonstram a formação de picos recorrentes com três massas moleculares diferentes, mesmo quando cada um deles foi ressubmetido a novas cromatografias. Esta propriedade também

acabou por ser confirmada em cromatografias de afinidade em quitina, quando os dois picos (retido e não retido) apresentavam atividade e demonstravam dois novos picos também ativos quando submetidos à cromatografia de exclusão molecular com o mesmo padrão eletroforético (SANTI-GADELHA, 2005).

Variações na estrutura quaternária de lectinas estimularam alguns estudos para investigar a oligomerização por ultracentrifugação (CALVETE *et al.*, 1999) e cristalografia de raios X (GALLEGO DEL SOL *et al.*, 2006). Como visto para as lectinas de *Dioclea grandiflora*, *D. guianensis* e *Cratylia floribunda* (bCFL), sobre as quais são discutidos a oligomerização pH dependente (GALLEGO DEL SOL *et al.*, 2006).

A oligomerização, que ocorre com lectinas e influencia sua atividade de acordo com o ambiente e as condições do meio em que a proteína se encontra, é um processo decorrente de interações entre resíduos-chave na interface entre os dímeros.

4.2. Objetivos

Objetivo Geral

Caracterizar e sequenciar por espectrometria de massas, a lectina quitina ligante isolada da fração albumina de sementes de *Acacia farnesiana*

Objetivos Específicos

Estabelecer por similaridade, a relação filogenética da AFAL com outras famílias de lectinas de leguminosas.

Determinar os aspectos estruturais da AFAL por correlação com outras lectinas.

Relacionar a estrutura primária da AFAL ao seu processo de oligomerização tempo dependente.

4.3. Material e Métodos

4.3.1. Purificação da AFAL (Lectina de sementes de *Acacia farnesiana*)

As sementes de *A. farnesiana* foram trituradas para obtenção de uma farinha fina. As proteínas presentes na farinha de sementes de *A. farnesiana* foram extraídas em solução de NaCl 0,5 M, 1:10 (m/v), sob agitação constante durante 4 horas à temperatura ambiente. A suspensão foi centrifugada a $9.000 \times g$ por 20 minutos, a 4 °C. O sobrenadante (extrato protéico) foi filtrado em papel de filtro e submetido à diálise contra água (20 trocas) para separação das frações albuminas e globulinas. A fração das albuminas (1 mg) foi submetida a cromatografia de troca iônica em coluna de amônio quaternário (Mono Q HR 5/5), acoplada a um sistema de cromatografia de alta performance (Akta System). A amostra dissolvida em 1 mL do tampão de equilíbrio foi aplicada na coluna de troca iônica previamente equilibrada com Tris-HCl 0,1 M, pH 7,0. O pico retido na coluna foi eluído com um fluxo de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, com tampão de equilíbrio contendo NaCl em um gradiente linear de 0-1,0 M (SANTI-GADELHA, 2005).

4.3.2. Seqüenciamento de Aminoácidos

A seqüência de aminoácidos da AFAL foi obtida por espectrometria de massas (Q-ToF MS/MS), através da digestão das proteínas com tripsina, quimotripsina e termolisina. A proteína foi suspendida em bicarbonato de amônio 100 mM (1:1 m/v), pH 8,6, e agitada por 1 min. Cada solução de proteína foi misturada a uma solução de tripsina de pâncreas bovino ($2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ da solução de bicarbonato de amônio) na proporção de $25 \mu\text{L}/\text{mL}$ de solução protéica, incubada por 3 h a 37 °C e estocada em alíquotas a -20 °C. A digestão com quimotripsina foi realizada nas mesmas proporções e no mesmo tampão descrito acima, apenas com o pH modificado para 8,0 a 23 °C. Já a digestão com termolisina foi conduzida com uma relação substrato: enzima de 50:1 (m/m) em 0,1 M de Tris-HCl (pH 7,6) contendo 0,05 M de NaCl e 0,05 M de CaCl_2 a 37 °C, por 4 h.

A amostra digerida foi injetada em uma fonte de ionização nano-electrospray e analisada em um instrumento Micromass™ quadrupolo "time of flight" com uma

resolução de 8.000 e uma acurácia de 10 ppm (LC-Q-ToF-MS-MS). Os espectros foram processados usando o programa Biolynx 4.0 e os peptídeos seqüenciados pelos programas ProteinLynx e MASCOT. Foram utilizados programas de alinhamento para análise de similaridade e homologia entre as seqüências de aminoácidos obtidas e todo o banco não redundante de proteínas depositadas no Nacional Center of Biotechnology Information (NCBI). Para alinhamentos locais e múltiplos foram utilizados os programas BLAST e CLUSTALW, respectivamente. A predição da estrutura secundária foi realizada com o apoio do programa Advanced Protein Secondary Structure Prediction Server (RAGHAVA, 2000).

4.4. Resultados e Discussão

4.4.1. Seqüência Primária da AFAL

A lectina isolada da fração albumina de sementes de *Acacia farnesiana* (AFAL) por Santi-Gadelha (2005) apresenta um seqüência de aminoácidos N-terminal muito semelhante à da lectina de *A. constricta*, além de outras lectinas isoladas dos gêneros *Phaseolus* e *Dolichos*, e uma menor similaridade com lectinas do gênero *Robinia*. A princípio esses dados sugerem que a AFAL pode ser classificada como uma lectina do tipo *P. vulgaris* (PHA) o que do ponto de vista estrutural tem uma significância importante, podendo até mesmo apresentar o arranjo quaternário formado por dímeros de dímeros canônicos que é peculiar a lectinas relacionadas à lectinas de *P. vulgaris* (HAMELRYCK *et al.*, 1996).

A similaridade N-terminal da AFAL com a lectina de *A. constricta* (subfamília Mimosoideae) é de 87,5 %, não apresentando similaridade com as duas lectinas de *Parkia platycephala* (PPL e PPL2), também representantes da subfamília Mimosoideae. Contudo, AFAL apresenta uma similaridade de 62,1 % com o N-terminal da lectina de *P. vulgaris* (subfamília Papilionoideae). Foi postulado que as isolectinas de *P. vulgaris* pertencem a um grupo de proteínas com seqüência altamente conservada e que parte das lectinas de leguminosas tem sua origem evolutiva decorrente de um gene ancestral comum, provavelmente assegurando a manutenção das funções fisiológicas dessas proteínas (HEMPERLY e CUNNINGHAM, 1983). Este fato poderia indicar um elo entre as subfamílias Mimosoideae e Papilionoideae.

A seqüência completa da AFAL foi obtida por sobreposição de peptídeos sequenciados por espectrometria de massas em tandem e apresenta 227 aminoácidos (Figura 4.1), correspondendo a uma massa molecular de 25 kDa, de acordo com a massa molecular aparente obtida por SDS-PAGE (29 kDa) e com a massa da proteína intacta detectada por espectrometria de massas MALDI-Tof (24±1 kDa) (SANTI-GADELHA, 2005). O pI calculado para esta seqüência foi de 4,4, o qual também se apresentou bastante similar ao pI experimental previamente medido (pI = 4,0 ± 0,5) (SANTI-GADELHA, 2005). O alinhamento entre a seqüência da AFAL e o banco de dados do NCBI revelou similaridade com lectinas de Phaseolae. AFAL tem 68 %, 66 % e 63 % de similaridade com a aglutinina de leucócitos de *P. vulgaris* (PHAL) (HAMELRYCK *et al.*, 1996), aglutinina de *P. vulgaris* (PHA) (LIOI *et al.*, 2003) e a lectina de *Dolichos biflorus* (DBL) (HAMELRYCK *et al.*, 2000), respectivamente (Figura 4.2). A análise de aminoácidos presentes na seqüência em comparação aos dados de Santi-Gadelha (2005) é bastante similar para todos os grupos de aminoácidos. O alinhamento também demonstra pelo menos cinco importantes regiões com elevado grau de conservação entre AFAL e as outras três lectinas de Phaseolae (Figura 4.2). A seqüência da proteína está depositada no banco de dados *UniProt Knowledgebase*, com número de acesso P84849.

4.4.2. Aspectos Estruturais da AFAL

O elevado grau de conservação da seqüência de AFAL em relação às lectinas do gênero *Phaseolus* destaca importantes regiões nessa proteína. O sítio de ligação a metais permanece conservado e bastante similar ao da PHA, com a região consistindo basicamente de quatro resíduos de aminoácidos, que coordenam a ligação dos metais de transição, estabilizando o sítio de ligação a carboidratos; Glu112, Asp114, Asp122 e His127 coordenam o íon Mn^{2+} e Asp114, Tyr117, Asn118 e Asp122 coordenam o íon Ca^{2+} . O sítio de ligação a carboidratos também apresenta elevado grau de conservação com os seguintes aminoácidos componentes: Phe06, Asn07, Glu08, Val19 e Glu185. Uma seqüência hidrofóbica conservada é observada na AFAL, PHA e PHA-L (Val-Leu-Ile-Thr-Tyr). Na AFAL, esta seqüência estende-se do resíduo 147 até o 151.

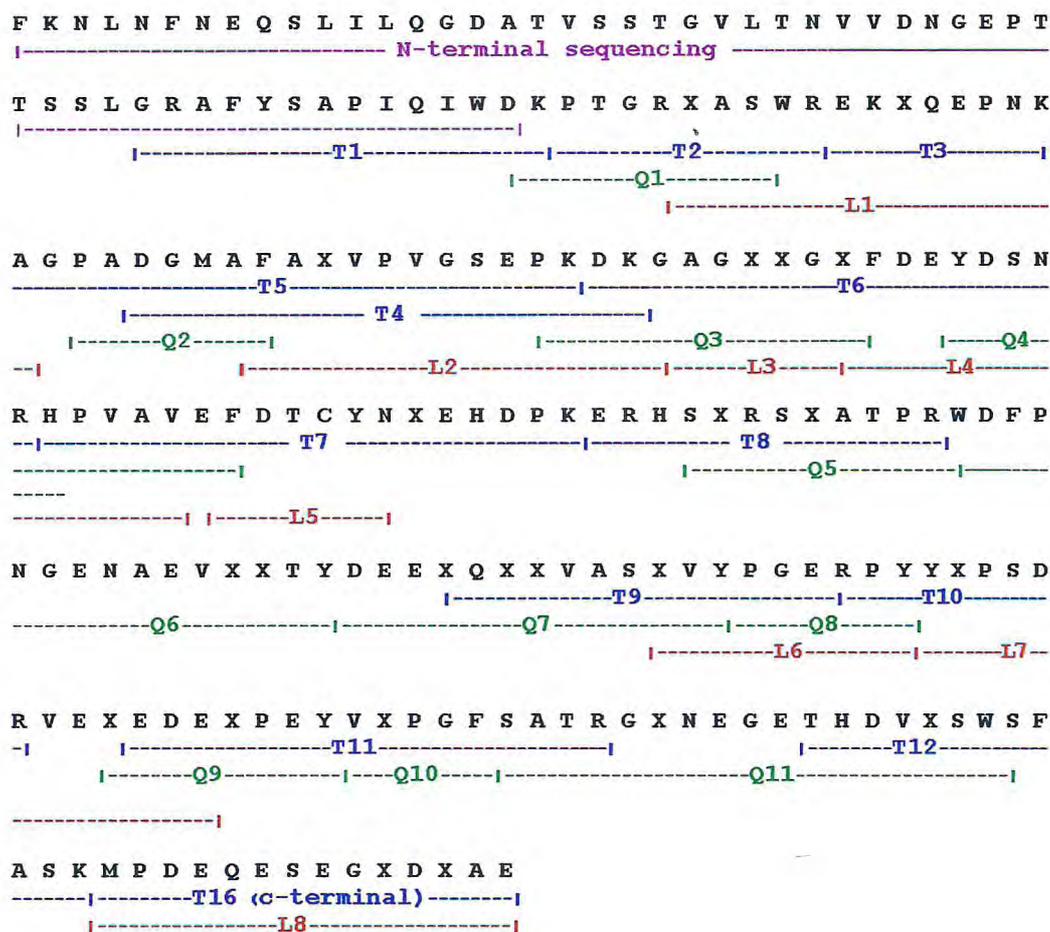


Figura 4.1. Sequência de aminoácidos da AFAL obtida por espectrometria de massas em tandem. Os peptídeos obtidos e sequenciados através das digestões enzimáticas são mostrados nas sobreposições com as letras (T) para digestão com tripsina, (Q) quimotripsina e (L) termolisina.

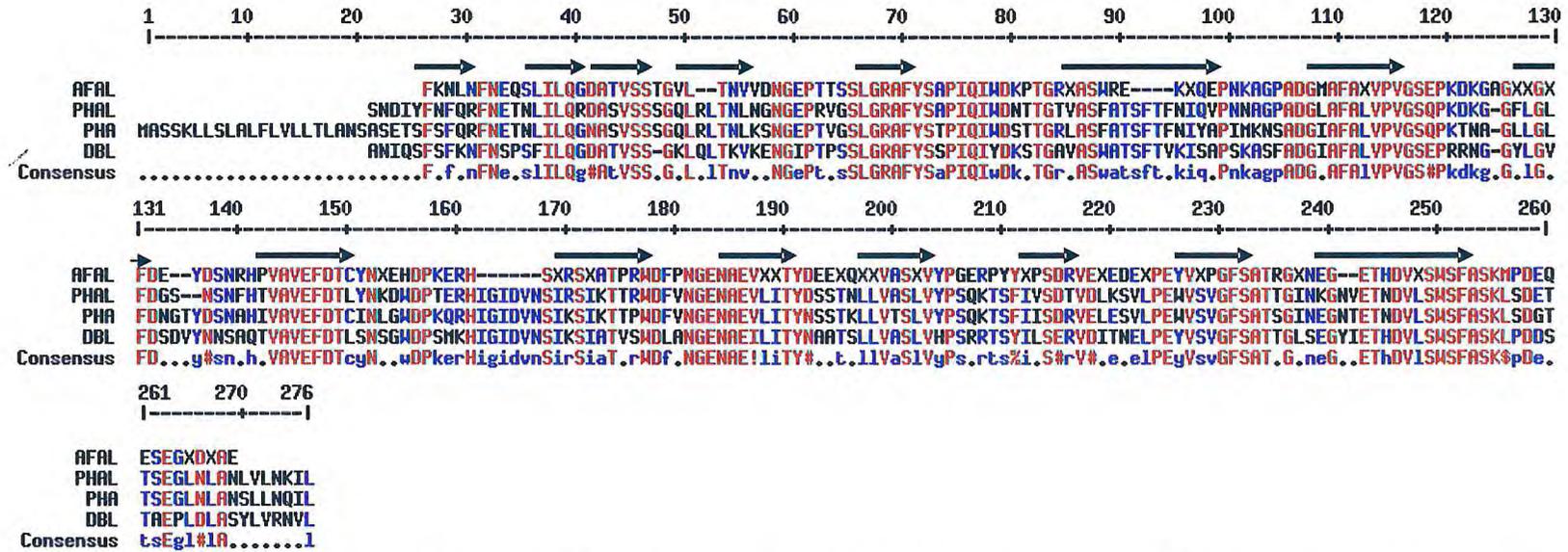


Figura 4.2. Alinhamento de seqüências de AFAL e da aglutinina de leucócitos de sementes de *Phaseolus vulgaris* (PHA-L), aglutinina de *P. vulgaris* (PHA) e lectina de *Dolichos biflorus* (DBL). AFAL tem 68%, 66% e 63% de similaridade com PHA-L, PHA e com DBL, respectivamente.

A predição da estrutura secundária da lectina confirma a predominância de motivos compostos por folhas β (15 exatamente), de forma semelhante ao padrão de estrutura secundária em lectinas de leguminosas. A interface da estrutura quaternária dessas lectinas é construída por contato convencional de folhas β , criando dímeros formados por 15 folhas β contínuas, curvadas e antiparalelas e com uma outra interface formada por interações de Van der Waals entre duas folhas β (HAMELRYCK *et al.*, 1996; HAMELRYCK *et al.*, 2000).

4.4.3. Oligomerização tempo dependente da AFAL

Estudos cromatográficos mostraram que a AFAL forma agregados; primeiro na forma dimérica e, posteriormente, na forma tetramérica. Esta variação na agregação de monômeros da proteína pode ter importância significativa na sua ação biológica. Os dados previamente descritos por Santi-Gadelha (2005) permitem especular sobre a importância da formação de agregados na capacidade de ligação da AFAL a polissacarídeos e sobre as variações que esse processo causa na afinidade da proteína por quitina, tornando-a dinâmica.

Uma vez que ocorrem variações recorrentes no arranjo quaternário da AFAL, isto pode aumentar ou reduzir a afinidade da mesma por quitina, indicando uma atuação biológica diferente para a lectina em ambientes celulares distintos e em instantes diversos do processo de ativação protéica. A estabilidade dessas estruturas quaternárias nas lectinas de leguminosas foi muito bem descrita para lectinas de *Dioclea guianensis* (WAH *et al.*, 2001), *Dioclea grandiflora* (CALVETE *et al.*, 1999) e *Cratylia floribunda* (GALLEGO DEL SOL *et al.*, 2006).

Segundo esses estudos, os resíduos importantes nas seqüências de lectinas dessas três espécies são aqueles capazes de fazer interações na interface dimérica por pontes de hidrogênio e interações de Van der Waals (WAH *et al.*, 2001). A comparação das lectinas de *Dioclea guianensis* com a de *D. grandiflora* (que não apresenta equilíbrio dímero tetrâmico) indicou que a substituição da His 131 por Asn reduz drasticamente contatos inter-dímeros e desordena o "loop" 117-123, que, na forma ordenada, estabiliza a associação tetramérica pH-independente na lectina de *D. grandiflora* (WAH *et al.*, 2001). Porém, esses resíduos quando alinhados com a lectina da PHA apresentam-se localizados em regiões que dificilmente irão interferir

na interação entre os dímeros. Os resíduos observados na PHA que estão envolvidos na interação entre os dímeros são Ser186 e Lys184 de um monômero com Ser190 e Lys149 do outro. Na AFAL, esses resíduos correspondem a Tyr e Arg em um monômero e Ser e Arg no outro (Figura 4.3). A manipulação desses resíduos por mutagênese sítio dirigida e a resolução da estrutura tridimensional poderiam auxiliar na compreensão da oligomerização que ocorre na AFAL.

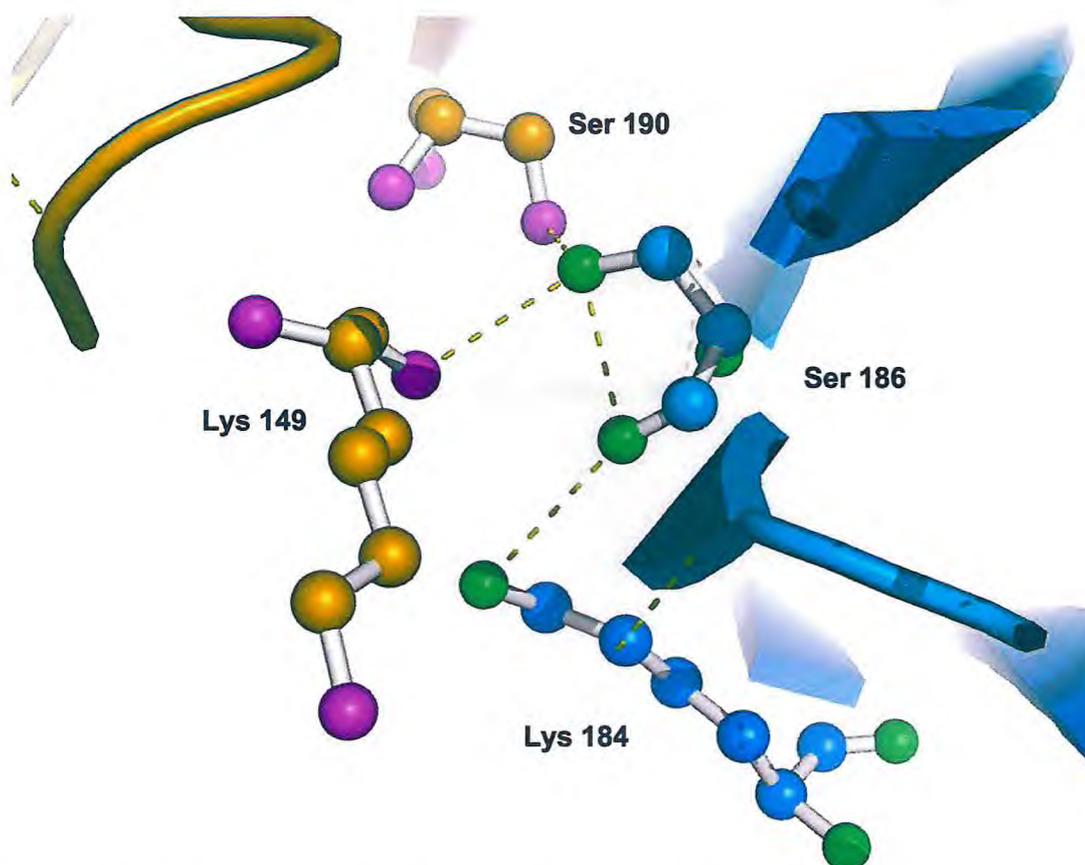


Figura 4.3. Contato entre dímeros da lectina de *Phaseolus vulgaris*, que apresenta similaridade de 68 % com a lectina de *Acacia farnesiana*. Os resíduos Ser186 e Lys184 de um monômero (amarelo) com a Ser190 e a Lys149 do outro (azul) estão envolvidos na interação entre os dímeros da PHA. Na AFAL esses resíduos correspondem a uma Tyr e Arg em um monômero e a uma Ser e uma Arg no outro.

4.5. Conclusão

AFAL é uma lectina quitina ligante que apresenta elevada similaridade com lectinas do tipo PHA, mesmo sendo uma lectina isolada de mimosoídea. Sua elevada similaridade estende-se a regiões extremamente importantes na atividade de lectinas, como o sítio de ligação a metais e a carboidrato e a uma seqüência hidrofóbica extremamente conservada em lectinas de Leguminosae.

A estrutura secundária também se mostra extremamente semelhante às lectinas de leguminosas de uma maneira geral. Os resíduos presentes na formação das interfaces diméricas são regiões reconhecidas por sua importância nos processos de oligomerização nessas lectinas e, na AFAL, alterações significativas nestes pode ser a causa do processo oligomérico tempo dependente.

4.6. Referências Bibliográficas

1. CALVETE, J.J., THOLE, H.H., RAIDA, M., URBANKE, C., ROMERO, A., GRANGEIRO, T.B., RAMOS, M.V., ROCHA, I.M.A., GUIMARÃES, F.N., CAVADA, B.S. (1999), Molecular characterization and crystallization of Diocleinae lectins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1430: 367-375.
2. CAVADA, B.S., CASTELLÓN, R.E.R., VASCONCELOS, G.G., ROCHA, B.A.M., BEZERRA, G.A., DEBRAY, H., DELATORRE, P., NAGANO, C.S., TOYAMA, M.H., PINTO, V.P.T., MORENO, F.B.M.B., CANDURI, F., DE AZEVEDO, W.F.JR. (2005). Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a new chitin-binding protein from *Parkia platycephala* seeds. *Acta Crystallographica Section F*, 61: 841-843.
3. 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*). *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 30: 271-280
4. CAVADA, B.S., SANTOS, C.F., GRANGEIRO, T.B., SILVA, L.I.M.M., CAMPOS, M.J.O., SOUSA, F.A.M., CALVETE, J.J. (1997). Isolation and partial characterization of a Lectin from *Parkia platycephala* Benth seeds. *Physiology and Molecular Biology of Plant*, 3: 109-115.
5. GALLEGU DEL SOL, F., CAVADA, B.S., CALVETE, J.J. (2006) Crystal structures of *Cratylia floribunda* seed lectin at acidic and basic pHs. Insights into the structural basis of the pH-dependent dimer-tetramer transition. *J. Struct. Biol.*, 158: 1-9.
6. GALLEGU DEL SOL, F., NAGANO, C., CAVADA, B.S., CALVETE, J.J. (2005a). The first crystal structure of a mimosoideae lectin reveals a novel quaternary arrangement of a widespread domain. *Journal of Molecular Biology*, 353: 574-583.
7. GALLEGU DEL SOL, F., GOMEZ, J., HOOS, S., NAGANO, C.S., CAVADA, B.S., ENGLAND, P., CALVETE, J.J. (2005b). Energetics of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-alpha-D-mannose binding to the *Parkia platycephala* seed lectin and its use for MAD phasing. *Acta Crystallographica Section F*, 61: 326-31.

8. GUZMAN-PARTIDA, A.M., ROBLES-BURGUENO, M.R., ORTEGA-NIEBLAS, M., VAZQUEZ-MORENO I. (2004). Purification and characterization of complex carbohydrate specific isolectins from wild legume seeds: *Acacia constricta* is (vinorama) highly homologous to *Phaseolus vulgaris* lectins. *Biochimie*, 86: 335-42.
9. HAMELRYCK, T.W., DAO-THI, M.H., POORTMANS, F., CHRISPPEELS, M.J., WYNS, L., LORIS, R. J. (1996). The Crystallographic Structure of Phytohemagglutinin-L. *J. Biol. Chem.*, 271: 20479-485
10. HAMELRYCK, T.W., LORIS, R., BOUCKAERT, J., DAO-THI, M.H., STRECKER, G., IMBERTY, A., FERNANDEZ, E., WYNS, L., ETZLER, M.E. (2000). Carbohydrate binding, quaternary structure and a novel hydrophobic binding site in two legume lectin oligomers from *Dolichos biflorus*. *J. Mol. Biol.*, 286: 1161-1177.
11. HEMPERLY, J.J., CUNNINGHAM, B.A. (1983). Circular permutation of amino acid sequences among legume lectins. *Trends Biochem. Sci.* 5, 100–102.
12. LIOI, L., SPARVOLI, F., GALASSO, I., LANAVE, C., BOLLINI, R. (2003). Lectin-related resistance factors against bruchids evolved through a number of duplication events. *Theor. Appl. Genet.*, 107: 814-822.
13. RAGHAVA, G.P.S. (2000). Protein secondary structure prediction using nearest neighbor and neural network approach. *CASP*, 4: 75–76.
14. SANTI-GADELHA, T. Isolamento, Purificação, Caracterização e atividade biológica da lectina da fração das albuminas de *Acacia farnesiana* (L.) Wild (Leguminosae-Mimosoidae), 2005. Tese de Doutorado.
15. SHARON, N., LIS, H. (2003). *Lectins*, 2nd ed., Kluwer Academic Publishers, Dordresh, Netherlands.
16. SUVACHITTANONT, W., PEUTPAIBOON A. (1992). Lectin from *Parkia speciosa* seeds. *Phytochemistry*, 319: 4065-70.
17. UTARABHAND, P., AKKAYANONT, P. (1995). Purification of a lectin from *Parkia javanica* beans. *Phytochemistry*, 38: 281-285.
18. 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). 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.*, 310:885-94.

Capítulo 5 – Considerações Gerais e **Anexos**

5.1. Considerações Gerais e Perspectivas

Os estudos estruturais desenvolvidos nesse trabalho apresentaram alguns aspectos que podem ser utilizados como ponto de partida para estudos futuros que venham a favorecer o conhecimento das lectinas da família Leguminosae.

Os dados que revelam e ampliam o conhecimento sobre a ação de lectinas como proteína de defesa, associados a informações previamente obtidas por diversos autores, abre um espaço na fisiologia vegetal para a busca da relação *in situ* das lectinas da subtribo Diocleinae com aminoácidos não protéicos, moléculas hidrofóbicas e metabólitos especiais.

O processo de conclusão da resolução da estrutura da CRLII pode não só concretizar a descrição de um novo arranjo quaternário para as lectinas como relacioná-lo mais amplamente a afinidade por compostos de lactose/galactose que essa proteína apresenta. Estratégias de co-cristalização e *soaking* com as duas lectinas de *Cymbosema roseum* determinarão com efetividade as bases da interação com carboidratos.

Já na família das mimosóideas, informações sobre lectinas dessas espécies é apenas o início da caracterização de um grupo aparentemente diverso de lectinas. Portanto, a caracterização da semelhança da lectina de *Acacia farnesiana* com lectinas de espécies do gênero *Phaseolus* como previamente observado para *Acácia constricta* revela um elo quimiotaxonômico que merece ser estudado e compreendido, não só para efeito sistemático, mas também para associar valor funcional a essas proteínas. Aspectos funcionais da AFAL estão possivelmente associados a um fenômeno de oligomerização tempo dependente, que também pode ser a causa da dificuldade de realizar procedimentos de cristalização com esta proteína. A abordagem adotada para tentar cristalizá-la poderia ser a mutagênese sítio-dirigida em resíduos que estariam relacionados à estabilização do arranjo quaternário para propiciar condições vibracionais reduzidas que são necessárias para a cristalização.

A presença de uma lectina com atividade quitinásica (quimerolectina) em sementes de *Parkia platycephala* revela também um grupo de proteínas que estão relacionadas a defesa de plantas contra patógenos com uma propriedade evolutiva relacionada ao domínio lectínico que possivelmente está associado ao aumento da interação enzima: substrato com propriedades tão distintas.

5.2. Anexo 1 (Publicações)

1. Structure of a lectin from *Canavalia gladiata* seeds: new structural insights for old molecules. BMC Structural Biology 7, 52, 2007. (Online)
doi: [10.1186/1472-6807-7-52](https://doi.org/10.1186/1472-6807-7-52)

2. Structural analysis of *Canavalia maritima* and *Canavalia gladiata* lectins complexed with different dimannosides: new insights into the understanding of the structure-biological activity relationship in legume lectins. Journal of Structural Biology, 2007. (in press)
doi: [10.1016/j.jsb.2007.07.012](https://doi.org/10.1016/j.jsb.2007.07.012)

3. Crystal structure of a lectin from *Canavalia maritima* (ConM) in complex with trehalose and maltose reveals relevant mutations in ConA-like lectins. Journal of Structural Biology, EUA, 2006.
doi: [10.1016/j.jsb.2006.03.011](https://doi.org/10.1016/j.jsb.2006.03.011)

4. New crystal forms for Diocleinae lectins in the presence of different dimannosides. Acta Crystallographica. F62, 1100-1103, 2006.
doi: [10.1107/S1744309106038887](https://doi.org/10.1107/S1744309106038887)

5. cDNA cloning and 1.75 Å crystal structure determination of PPL2, an endochitinase and N-acetylglucosamine binding hemagglutinin from *Parkia platycephala* seeds. Febs Journal, Inglaterra, 273, 3962-3974, 2006.
doi: [10.1111/j.1742-4658.2006.05400.x](https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05400.x)

6. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the lectin from *Dioclea rostrata* Benth seeds. Acta Crystallographica F62, 166-168, 2006.
doi: [10.1107/S1744309106001801](https://doi.org/10.1107/S1744309106001801)

7. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a lectin from *Canavalia maritima* seeds. Acta Crystallographica F, Dinamarca, F61, 87-89, 2005.
doi: [10.1107/S1744309104029197](https://doi.org/10.1107/S1744309104029197)

8. Native crystal structure of a nitric oxide-releasing lectin from the seeds of *Canavalia maritima*. Journal of Structural Biology, EUA, 152, 185-194, 2005.
doi: [10.1016/j.jsb.2005.07.012](https://doi.org/10.1016/j.jsb.2005.07.012)

9. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a new chitin binding protein from *Parkia platycephala* seed. Acta Crystallographica Section F, Dinamarca, 61, 9: 841-843, 2005.
doi: [10.1107/S1744309105024462](https://doi.org/10.1107/S1744309105024462)

10. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the lectin from *Canavalia gladiata* seeds. Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography, Dinamarca, 60, 1493-1495, 2004.
doi: [10.1107/S0907444904014489](https://doi.org/10.1107/S0907444904014489)