



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

EDUARDO HENRIQUE SALVIANO BEZERRA

**ANÁLISE ESTRUTURAL DO DOMÍNIO DE RECONHECIMENTO À
CARBOIDRATO DA LECTINA DE *Canavalia brasiliensis* E SUA
RELAÇÃO NA INDUÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO**

FORTALEZA - CE

2011

EDUARDO HENRIQUE SALVIANO BEZERRA

**ANALÍSE ESTRUTURAL DO DOMÍNIO DE RECONHECIMENTO À
CARBOIDRATO DA LECTINA DE *Canavalia brasiliensis* E SUA
RELAÇÃO NA INDUÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO**

Dissertação de mestrado submetida à
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em
Bióquímica, da Universidade Federal do Ceará,
como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica.

Área de concentração: Bioquímica Vegetal

Orientador: Prof. Dr. Benildo de Sousa Cavada
Co-Orientador: Prof. Dr. Bruno Anderson Matias
da Rocha

FORTALEZA
2011

EDUARDO HENRIQUE SALVIANO BEZERRA

Análise estrutural do sítio de reconhecimento à carboidrato de uma lectina de *Canavalia brasiliensis* e sua relação na indução da produção de Óxido Nítrico.

Dissertação de mestrado submetida à coordenação do Curso de Pós Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal

Aprovada em: 17 / 02 / 2011

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr Benildo Sousa Cavada (Orientador)

Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Bruno Anderson Matias do Rocha (Co-Orientador)

Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Plínio Delatorre (Examinador)

Universidade Federal da Paraíba

Ao Pai batalhador, à Mãe dedicada e à amada Denise.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, pilar principal da minha vida. Onde fui formado no caráter, esforço e honestidade do meu pai, na dedicação e carinho de minha mãe, compreensão e altivez de minha irmã. O homem que sou hoje é reflexo do abraço de minha família.

Agradeço ao Professor Benildo, que é o começo de tudo na minha vida profissional. Sem seu apoio, conhecimento e paciência eu não poderia alcançar os objetivos que tenho e terei, pois foi ele que abriu as portas de seu laboratório, que adotei como minha casa e assim espero que sempre seja. Obrigado pela oportunidade, isso é muito importante pra mim.

Ao Professor Bruno, que me presenteou com amizade, conhecimento, rumo e carões, tudo necessário nessa caminhada. E que mesmo perto ou longe nunca me deixou sem algum desses fatores e orientação.

Ao Professor Plínio, que desenvolveu no Biomol o ambiente que eu trabalho e que eu cresci. Seu conhecimento e vontade proporcionaram as condições pra que eu pudesse vislumbrar o fascinante mundo da biologia estrutural.

Ao meu amigo Talessss e minhas irmãs do laboratório, Raquel e Maria Julia. Que já me suportam a muito tempo, sempre tive o seu apoio e sempre estarei com eles. Obrigado pelo fundamental, amizade.

Meus amigos iluministas, Rafael, Helton, Pereira, Ito, Rômulo e Mayron. Momentos de prata, colóquios de ouro.

Agradeço aos amigos Emanuel Marinho, Marcia, Joana, Vitor, Raniere, Claudener, Camila, Batista, Rodrigo, Athur, Alfa, Fernando, Guilherme, Ivandra, Roniere, Mayara, Mayara novamente, Vinícius, Rafael, Suzete e pela ajuda fundamental Kássia e Vanir.

Um agradecimento especial para a mulher que foi essencial para a realização desse trabalho. Denise você é intensa e a força para minhas realizações.

"O aspecto mais triste da vida de hoje é que a ciência ganha em conhecimento mais rapidamente que a sociedade em sabedoria."

Isaac Asimov

RESUMO

Lectinas podem ser definidas como proteínas de origem não imune que possuem pelo menos um domínio não catalítico que se liga reversivelmente de maneira específica a mono ou oligossacarídeos. Dentre as lectinas de origem vegetal, as lectinas de leguminosas são as mais estudadas, em especial as lectinas pertencentes subtribo *Diocleinae*. As lectinas da subtribo *Diocleinae* apresentam um alto grau de similaridade em sua seqüência primária e estrutura tridimensional, mas apresentam diferentes intensidades em suas atividades biológicas em que são aplicadas, como a indução da produção de óxido nítrico. A estrutura da recém cristalizada lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) objetiva esclarecer como essas variações ocorrem baseado na geometria dos resíduos que compõe o domínio de reconhecimento á carboidrato (DRC). A lectina de *Canavalia brasiliensis* foi purificada e cristalizada pelo método de difusão de vapor a 293 K. Cristais adequados foram obtidos na condição contendo 200 mM de cloreto de sódio, 100 mM de hepes pH 8.5 e 1.8 M e sulfato de amônio. O cristais apresentam um grupo espacial ortorrômbico I222, a cela unitária tem dimensões de $a=68.3 \text{ \AA}$, $b=73.0 \text{ \AA}$, $c=99.5 \text{ \AA}$ e ângulos de $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$, sendo observado um monômero na unidade assimétrica e um conteúdo de 49.5 % de solvente. O refinamento satisfatório apresentou um “ R_{factor} ” e “ R_{free} ” de respectivamente 20.4% e 25.3%. Foram determinados parâmetros no potencial de atividade biológica registrada na literatura, onde a lectina de *Canavalia maritima* (ConM) tem alto potencial de indução a produção de óxido nítrico comparado com a lectina de *Canavalia ensiformis* (ConA) que tem um baixo potencial de indução. Diferenças significativas foram encontradas entre coordenadas dos resíduos que compõe o DRC de lectinas da subtribo *Diocleinae*, e comparando esses dados com os potenciais de atividade biológica foi estipulado um padrão distinto de distancias para lectinas com alto e baixo potencial de indução. A lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) apresenta um padrão de distancias de uma ótima indutora de óxido nítrico como ConM, porém apresenta uma atividade inferior que ConA. As distancias da DRC explicam a diferença na atividade, mas a ConBr se mostra um caso excepcional, onde uma avaliação do volume do sítio mostra um sítio extremamente reduzido, o que explica sua discrepância na atividade biológica.

Palavras-chave: Lectinas, *Canavalia brasiliensis*, indução óxido nítrico.

ABSTRACT

Lectins may be defined as proteins of nonimmune origin that have at least one non-catalytic domain that reversibly binds specifically to mono or oligosaccharides. Among plant lectins, legume lectins are the most studied, in particular those lectins belonging to subtribe *Diocleinae*. The lectins from subtribe *Diocleinae* show a high degree of similarity in their primary sequence and three-dimensional structure but have different intensities in their biological activities in which they are applied, such as induction of nitric oxide production. The structure of the newly crystallized lectin from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) aims to clarify how these variations are based on the geometry of the residues that comprise the carbohydrate recognition domain (CRD). The lectin from *Canavalia brasiliensis* was purified and crystallized by vapor diffusion method at 293 K. Suitable crystals were obtained under the condition containing 200 mM sodium chloride, 100 mM HEPES pH 8.5 and 1.8 M ammonium sulfate. The crystals have a space group orthorhombic I222, the unit cell has dimensions $a = 68.3 \text{ \AA}$, $b = 73.0 \text{ \AA}$, $c = 99.5 \text{ \AA}$ and angles $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ been observed a monomer in the asymmetric unit with a content of 49.5% solvent. The refinement showed a satisfactory "R_{factor}" and "R_{free}" of respectively 20.4% and 25.3%. Parameters were determined in the potential of biological activity reported in literature, where the lectin from *Canavalia maritima* (ConM) has high potential for inducing nitric oxide production compared with the lectin from *Canavalia ensiformis* (ConA), which has a low potential for induction. Significant differences were found between coordinates of the residues that comprise the CRD of lectins from the subtribe *Diocleinae*, and comparing these data with potential biological activity was provided a distinct pattern of distances to lectins with high and low potential for induction. The lectin from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) shows a pattern of distances for a great inducer of nitric oxide as ConM, but shows a lower activity than ConA. The distances of CRD explain the difference in activity, but ConBr shown an exceptional case where an assessment of the volume of the site shows a very small site, which explains their discrepancy in biological activity.

Keywords: lectins, *Canavalia brasiliensis*, induction of nitric oxide.

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
FIGURA 01	Representação esquemática de Merolectinas, Hololectinas, Quimerolectinas e Superlectinas.....	16
FIGURA 02	Arquitetura de um motivo <i>Jelly-roll</i>	22
FIGURA 03	Alinhamento de sequencia primária da lectina de <i>Canavalia ensiformis</i> (ConA), lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i> (ConBr) e Lectina de <i>Canavalia maritima</i> (ConM).....	26
FIGURA 04	Representação esquemática da biossíntese das lectinas semelhantes a ConA no processamento chamado de permutação circular.....	28
FIGURA 05	Diagrama de fases da concentração de uma proteína. Onde pode ser observado a zona metastável (área 1) corresponde à zona ideal para o crescimento dos cristais sem nucleação de novos cristais; a zona de nucleação (área 2) é onde os cristais nucleiam e crescem, e zona de precipitação (área 3) é a zona onde as proteínas não nucleiam e precipitam saindo da solução.....	32
FIGURA 06	Técnicas da gota suspensa e gota sentada do método de difusão por vapor.....	32
FIGURA 07	Placas de cristalização linbro para gota suspensa (esquerda) e gota sentada (direita).....	40
FIGURA 08	Unidade de cristalização do Biomol-Lab.....	40
FIGURA 09	Cristais de ConBr em sua condição otimizada.....	44
FIGURA 10	A estrutura da ConBr previamente depositada (Código do PDB 1AZD) está demonstrada em amarelo e a nova estrutura está demonstrada em cinza. (A) <i>Loop</i> 68-17, (B) <i>loop</i> 117-123, (C) <i>loop</i> 148-151, (D) <i>loop</i> 202-205.....	48
FIGURA 11	Representação do Omit map da estrutura do ácido á-aminobutírico acid (Abu) em uma visão estereoscópica.....	49
FIGURA 12	(A) Mostra claramente a região de interação hidrofóbica que interage com o Abu. (B) Essa figura denota as principais	

	interações hidrofílicas entre Abu e os resíduos do dímero canônico.....	50
FIGURA 13	Representação do “laço” formado pela interação do Abu (Densidade em amarelo) com Leu 115 e Leu 126 e como ele estabiliza o loop 117-123, promovendo uma densidade mais evidente.....	50
FIGURA 14	As linhas pontilhadas mostram as distâncias entre os resíduos envolvidos nas mudanças da geometria do DRC, onde em ConBr apresenta uma distância menor entre Gly227-Tyr12, Leu99-Tyr12 e Leu99-Asn14 e um distanciamento das outras distâncias, o que caracteriza os melhores indutores de óxido nítrico. As medidas estão mensuradas em angstroms.....	53
FIGURA 15	A sobreposição de ConBr(Cinza), ConM(verde) e ConA(laranja). ConBr apresenta uma conformação diferente de ConA sem mudanças na estrutura primária, o que favorece a interação entre Asp203 e Tyr100 igualmente como ConM, que mostra a substituição na Ser202, aproximando essa distância.....	54
FIGURA 16	Avaliação das distâncias do domínio de reconhecimento á carboidrato relacionando maiores e menores distâncias para maiores e menores indutores. As medidas estão mensuradas em angstroms.....	54
FIGURA 17	Lectinas do gênero <i>Canavalia</i> induzindo relaxamento em aorta endotelizada precontrainda com fenilefrina. Dados comparando as respostas de ConBr, ConM e ConA com o controle (100% contração de Fenilefrina). Significância \pm S.E.M.; * $p < 0.05$ em relação ao controle, # $p < 0.05$ em relação à ConBr e ConA. (Adaptado de ASSREUY <i>et al.</i> , 2009 e GADELHA <i>et al.</i> , 2005).....	55

LISTA DE TABELAS

	Pág.
TABELA 01 Sete diferentes tipos de interface formados durante a oligomerização de lectinas de leguminosas.....	23
TABELA 02 Dados da Estação Experimental W01B-MX2 do LNLS.....	41
TABELA 03 Estatística da coleta de dados, refinamento e qualidade da estrutura.....	45
TABELA 04 Distâncias entre o Abu e o resíduo do sítio composto pelo dímero canônico.....	51
TABELA 05 Distância (Å) entre os resíduos de aminoácidos envolvidos na interação com carboidratos.....	52

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Considerações gerais.....	13
1.2 Lectinas.....	15
1.2.1 Definição	15
1.2.2 Origem e histórico	17
1.2.3 Ocorrência das Lectinas.....	18
1.2.4 Lectinas de leguminosas.....	20
1.2.5 Aspectos estruturais de lectinas de leguminosas	21
1.2.6 Relação estrutura função	24
1.2.7 Relevância das diferenças estruturais de seus DRCs com sua intensidade de se ligar a carboidratos.	24
1.2.8 Subtribo <i>Diocleinae</i>	25
1.2.9 Lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i> (ConBr).....	26
1.3 Purificação	28
1.4 Lectinas e a sua indução á produção de óxido nítrico	29
1.5 Cristalização	30
1.5.1 Cristalização de proteínas.....	30
1.5.2. Cristalização por difusão de vapor	31
1.5.3 O método da matriz esparsa.....	33
1.5.4 Difração de Raios X	34
1.5.5 Substituição Molecular	36
1.6 Refinamento	37
2. OBJETIVOS.....	38
2.1 Objetivos gerais	38
2.2 Objetivos específicos.....	38
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3.1 Cristalização da ConBr.....	39
3.2 Coleta de dados de difração de raios X	41
3.3 Substituição Molecular e Refinamento.....	42
3.4 Análise da estrutura	42

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
4.1 Cristal de ConBr	44
4.2 Dados da Difração	45
4.3 Substituição molecular e refinamento	46
4.4 Estrutura geral da ConBr	47
4.5 O arranjo tridimensional do domínio de reconhecimento á carboidrato (DRC) e o entendimento sobre sua influência na indução da produção de NO.....	51
4.6 Avaliação do volume do sítio de ligação a carboidrato e sua relação com a atividade biológica.	55
5. CONCLUSÕES.....	57
REFERÊNCIAS	58

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

Nos mais diversos fenômenos bioquímicos que acontecem dentro de uma célula em sua totalidade, as proteínas participam de forma fundamental nesses processos, com as mais diversas funções, como: função estrutural, enzimática, proteção imunitária, reconhecimento de sinais moleculares, transporte e armazenamento e controle do metabolismo. Essa gama de atividades exercidas pelas proteínas pôde ter um aprofundamento de seu entendimento, a partir do desenvolvimento das técnicas de biologia estrutural, que possibilitam o estudo de sítios de ligação, arranjos que essas proteínas assumem e análise para desenho de medicamentos entre outros. A técnica mais comum para resolução da estrutura tridimensional de macromoléculas biológicas tem sido a cristalografia de raios X e até hoje é a técnica principal para investigação da estrutura tridimensional de macromoléculas biológicas (BLUNDELL & JOHNSON, 1976; DRENTH, 1994). Uma grande contribuição á essa técnica ocorreu nos anos de 1980, e foi relacionada com a introdução da radiação síncrotron, para experimentos de difração de raios X de rotina (DAUTER, 2002). De um processo lento, tendo geralmente muitos dias, o experimento de difração foi reduzido para apenas algumas horas, e hoje, com as linhas de luz mais poderosas de terceira geração, apenas alguns segundos são suficientes. Além disso, a qualidade dos dados tem dramaticamente aumentado, apesar da dimensão cada vez mais reduzida dos cristais (hoje apenas 10 μm) (JASKOLSKI, 2010).

As quatro maiores classes de moléculas orgânicas em sistemas vivos são proteínas, lipídios, ácidos nucleicos e carboidratos. Os carboidratos são as moléculas orgânicas mais abundantes na natureza, e aproximadamente todos os organismos sintetizam e metabolizam carboidratos (Wade, 1999). A complexa diversidade de carboidratos em sistemas vivos é um resultado direto de muitas características: A habilidade de diferentes tipos e números de resíduos de açúcar de formar ligações glicosídicas, as características estruturais dessas moléculas, o tipo de ligação anomérica, a posição e a presença ou ausência de

ramificações (Mody et al., 1995; Gorelik et al., 2001). A variabilidade estrutural e a complexidade de glicanos na superfície celular os permite funcionar como moléculas sinalizadoras, moléculas de reconhecimento e de adesão (Sharon & Lis, 1989,1993; Ofek et al., 2003).

As lectinas são um grupo de proteínas que por definição, são proteínas de origem não-imune que contêm pelo menos um domínio não-catalítico capaz de ligar-se a mono ou oligossacarídeos específicos de maneira reversível, podendo ou não apresentar em sua estrutura domínios catalíticos. Elas são subdivididas em quatro tipos: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas. Esta divisão foi concebida em termos do domínio de ligação a carboidratos e de, eventualmente, a outro não relacionado (VAN DAMME *et al.*, 1998). Dentro de um âmbito estrutural, as lectinas são proteínas amplamente estudadas (KOGELBERG, 2001; BRINDA et al., 2005; SINHA, 2007). 2004). Os estudos estruturais realizados em lectinas animais sugeriram que a atividade de ligação de carboidrato na maioria das lectinas foi gerado por um número de resíduos de aminoácidos limitado, designado como o domínio de reconhecimento de carboidratos (DRC) (Sharon & Lis, 2004). O DRC reconhece normalmente o terminal não redutor de resíduos de carboidratos de glicoproteínas e glicolípídeos da membrana celular (Mody et al., 1995). CRDs de lectinas também pode discriminar entre isômeros anoméricos em função de suas especificidades. Por exemplo, a lectina concanavalina A (ConA) se liga especificamente a um anômero α de glicose e manose, mas não ao anômero β (Mody et al., 1995).

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 Definição

Lectinas podem ser definidas como proteínas que possuem pelo menos um domínio não-catalítico que se liga reversivelmente para um mono- oligossacarídeo específico (PEUMANS & VAN DAMME, 1995). Esta definição não se detém em características das lectinas como hemaglutinação de células ou precipitação de glicoconjugados, mas sim focar no tipo de ligação e de que forma acontece com seus ligantes.

As lectinas são divididas estruturalmente em quatro grupos. As merolectinas consistem de apenas um domínio de ligação a carboidrato sendo, portanto monovalentes e não têm a capacidade de aglutinar células e/ou precipitar glicoconjugados. As hololectinas são constituídas de domínios carboidrato-ligantes, porém contém ao menos dois de tais domínios idênticos ou muito homólogos e que se liga a açúcares estruturalmente similares. As hololectinas, grupo em que se encontra a maioria das lectinas de planta, são di ou multivalentes e aglutinam células e/ou precipitam glicoconjugados. As quimerolectinas são proteínas de fusão consistindo de um ou mais domínios de ligação a carboidratos, dispostos de forma seqüencial a um domínio não relacionado. Este último domínio pode ter uma atividade enzimática bem definida ou alguma outra atividade biológica que atua independentemente do domínio de ligação a carboidratos. Dependendo do número dos sítios de ligação a carboidratos, as quimerolectinas podem comportar-se como merolectinas ou como hololectinas. Finalmente, as superlectinas são aquelas lectinas que se ligam pelo menos a dois tipos de carboidratos estruturalmente diferentes (Figura 1) (PEUMANS & VAN DAMME, 1998). Mais recentemente lectinas são definidas como um dos grupos mais importantes de proteínas responsáveis por decifrar o glicocódigo (Gabijs, 2000). Elas desempenham um papel central em uma variedade de eventos biológicos, funcionando como reconhecimento moléculas em células e interações célula-célula (Sharon & Lis, 2004).

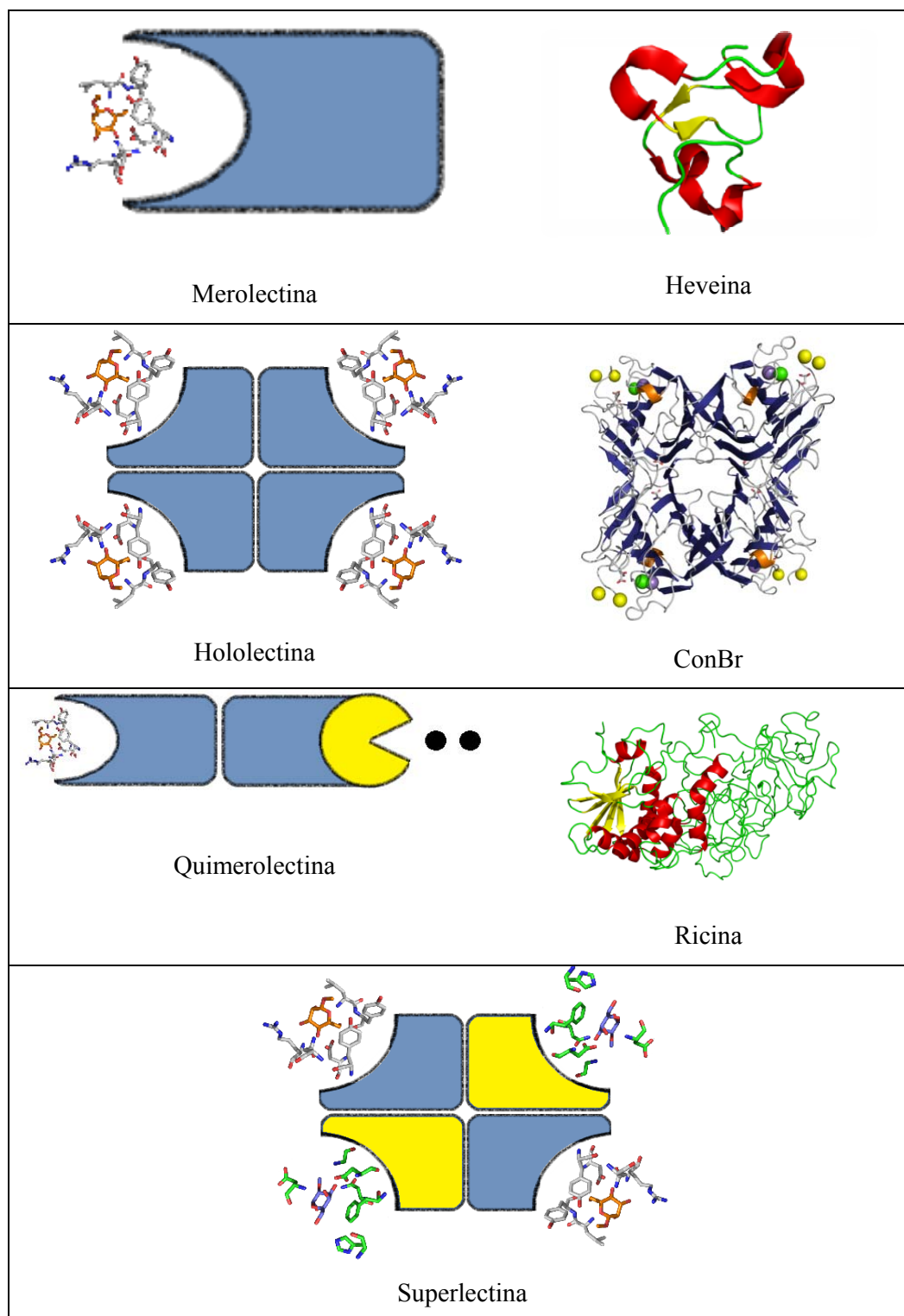


Figura 1- Representação esquemática de Merolectinas, Hololectinas, Quimerolectinas e Superlectinas.
Fonte: Peumans e Van Damme (1998).

1.2.2 Origem e histórico

A primeira observação de uma atividade aglutinante derivada de lectinas foi feita por Silas Weir Mitchell em 1860 a partir a do veneno da cobra (*Crotalus durissus*) (MITCHEL *et al.*, 1860, 1886). O primeiro relato de identificação de uma lectina vegetal foi por Peter Hermann Stillmark em 1888 na sua tese de doutorado como orientado de Robert Kobert da universidade de Dorpat(Tartu) na Estônia. Essa hemaglutinina a qual também era altamente tóxica foi isolada por Stillmark de sêmenes de mamona (*Ricinus communis*) e foi nomeada ricina. Em seguida H.Hellin, também de Tartu, demonstrou a presença de uma hemaglutinina tóxica, a abrina, em sementes de jequiriti (*Abrus precatorius*). Ricina e abrina logo se tornaram comercialmente disponíveis, o que promoveu Paul Ehrlich, do Instituto Real de Terapia Experimental (Frankfurt), á aplicá-las como antígenos modelos para estudo imunológicos. Embora as preparações disponíveis para ele fossem muito brutas, ele foi capaz de estabelecer com elas em meados de 1890 muitos dos princípios de imunologia fundamentais.

Resultados anteriores de Stillmark indicavam alguma seletividade nas aglutinações promovidas pela ricina por células vermelhas de diferentes animais. Karl Landsteiner da Universidade de Vienna descobriu os grupos sanguíneos A, B e O em 1900 e aproximadamente uma década depois ele demonstrou que vários extratos de sementes apresentavam atividade hemaglutinantes diferentes quando testadas com eritrócitos de diferentes animais (LANDSTEINER & RAUBISCHEK 1907).

Em 1919, James B.Summer da Universidade Cornell (Ithca, Nova York), isolou do feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*) uma proteína chamada concanavalina A e dessa maneira obter uma hemaglutinina pura pela primeira vez. Contudo duas décadas depois Summer e Howell (1936) divulgaram que a concanavalina A aglutina tanto células como eritrócitos e leveduras como também precipita glicogênio em solução. Eles também mostraram a inibição da concanavalina A com sacarose, demonstrando pela primeira vez a especificidade de lectinas por açúcares. Por volta de 1940, William C. Boyd Universidade de Boston e por Karl O. Renkonen da Universidade de Helsinki, Finland, descobriram a especificidade de hemaglutininas por grupos sanguíneos humanos específico. Eles encontraram que extratos brutos de *Phaseolus limensi* e *Vicia cracca* aglutinavam eritrócitos

do grupo sanguíneo A, mas não células do grupo B ou O, onde um extrato de *Lotus tetragonolobus* aglutinou especificamente eritrócitos do grupo sanguíneo O. Lectinas foram primeiramente designadas com aglutininas ou fitohemaglutininas por serem achadas quase exclusivamente em plantas, mas a habilidade de aglutininas de plantas distinguirem entre eritrócitos de diferentes tipos sanguíneos levou Boyd e Shapleigh (1954) a propor a essas aglutininas o nome de lectinas, do latim *legere*, que quer dizer escolher.

Uma das grandes atividades atribuídas as lectinas foi descoberta por Joseph C. Aub do Hospital Geral de Massachusetts em Boston. Ele descobriu que a aglutinina de germe de trigo (WGA) tinha a habilidade de reconhecer e aglutinar preferencialmente células malignas (AUB *et al.*, 1963, 1965).. Isso foi demonstrado novamente pelas publicações de Max M. Burguer da Universidade de Princeton juntamente com Leo Sachs e Michael Imbar do Instituto Weissmann que concanavalina A exibe a mesma atividade. Essas investigações proveram evidências demonstrando que mudanças nos carboidratos da superfície celular estão associadas com o desenvolvimento de câncer e aponta para o fato que a alta susceptibilidade á hemaglutinação por lectinas era compartilhada por todas as células malignas, é conhecido hoje que isso não é uma verdade generalizada.

O avanço da tecnologia, e os fatos históricos citados anteriormente, demonstram que as lectinas das mais diversas origens provêm um arsenal de ferramentas biotecnológicas de um amplo espectro de ação, sendo um alvo de estudo com uma grande área de pesquisa e aplicações biológicas.

1.2.3 Ocorrência das Lectinas

Como no caso da ricina (aglutinina de *Ricinus communis*) e a ConA (lectina de *Canavalia ensiformis*), a busca mais rica para a maioria das lectinas são as sementes. Esses órgãos na planta são comumente os mais estudados, mas há lectinas também em raízes (*Urtica*, *Phitolacca*, *Sambucus*, *Tricosantes*, *Calystegia*), tubérculos ou bulbos (*Solanum*, *Galanthus*, *Scillia*, *Allium*, *Crocus*, *Tulipa*, *Íris*), casca (*Sambucus*, *Sophora*, *Robinia*, *Maackia*, *Laburnum*, *Cytisus*, *Cladrastis*, *Hevea*, *Abies*) ou folhas (*Aloe*, *Lactuca*, *Vicia*, *Unijuga*, *Viscum album*) (RUDIGER & GABIUS, 2001).

As Lectinas são proteínas que se tratando em um caráter filogenético, estão extremamente difundidas, estando presente em todas as classes e famílias de seres vivos, desde bactérias e vírus até mamíferos (LIENER *et al.*, 1986). Em invertebrados, estão presentes em praticamente todas as classes examinadas como caranguejos (UMETSU *et al.*, 1991), esponjas (MOURA, 2006), larvas de insetos (GRUBHOFFER & MATHA, 1991), carrapatos (SHARON & LIS, 1989^a), ouriço do mar (YAMADA & AKETA, 1982) e insetos (YU & KANOS, 2000), onde estão presentes Principalmente na hemolinfa e órgãos sexuais (SHARON & LIS, 1989^a). A lectina de *Helix pomatia*, uma espécie de lesma, é a mais conhecida entre as de invertebrados, aglutinando especificamente hemácias humanas do tipo A e sendo inibida por N-Acetilgalactosamina (HAMMARSTROM, 1972).

Em vertebrados as lectinas têm sido encontradas em diferentes tecidos de mamíferos, aves e répteis, sendo algumas semelhantes, outras bastante diferentes em sua estrutura molecular e especificidade por carboidratos. Lectinas de membranas têm sido encontradas em fígado de vários animais (rato, coelho e galinha), em hepatócitos e em células de Kupffer, associadas com a membrana plasmática e com as membranas intracelulares (SHARON & LIS, 1989^a). Foi também identificada a presença de lectinas em membranas de linfócitos de porco (BEZOUSKA *et al.* 1990), o que levou a sugerirem a possibilidade destas proteínas funcionarem como receptores de células NK (“natural killer cells”). Em répteis foram encontradas lectinas com propriedades físico-químicas semelhantes nos venenos das cobras *Agkistrodum contortrix*, *Ancistrodum piscivorous* e *Crotalus atrox* (GARTNER & OGILVE, 1984). No soro de enguia foi encontrada uma potente hemaglutinina de hemácias humanas do tipo O (DESAI & SPRINGER, 1972).

Numerosas bactérias produzem lectinas de superfície comumente fazendo parte das fímbrias. As várias lectinas de bactérias parecem funcionar nas etapas iniciais das infecções, por exemplo, quando ocorre a aderência das bactérias a células epiteliais do trato urinário e gastrintestinal. As lectinas de bactérias também agir como moléculas de reconhecimento em fagocitose de bactérias em ausência de opsoninas por macrófagos de camundongos, de ratos, macrófagos peritoneais, linfócitos e polimorfonucleares humanos (SHARON, 1987).

Em protozoários, a lectina de *Entamoeba histolytica* parece desempenhar importante papel na citotoxicidade em células epiteliais do cólon, atuando na etapa de aderência à célula hospedeira, possuindo ainda, um papel na citotoxicidade celular, distinto

da função de aderência (SAFFER & PETRI, 1991). A seqüência de aminoácidos desta lectina, determinada na sua totalidade, apresentou um total de 1209 aminoácidos, possuindo 16 sítios de glicosilação e uma região hidrofóbica de 28 aminoácidos (MANN *et al.*, 1991).

Em vírus, a lectina parece estar envolvida no processo de adesão à célula hospedeira. A infecção pelo vírus da influenza é iniciada pelo evento de adesão, mediada por uma hemaglutinina da capa do vírion que reconhece e se liga a resíduos de ácido siálico da superfície celular (GLICK *et al.*, 1991).

Lectinas ocorrem também em fungos (*Rhizoctonia solani*, KELLENS & PEUMANS, 1991; *Pholiota aurivella*, KAWAGISHI *et al.*, 1991; *Agaricus bisporus*, PRESANT & KORNFELD, 1972).

Em algas marinhas, o número de trabalhos envolvendo lectinas é ainda pequeno, porém tem crescido bastante nos últimos anos. A primeira lectina de alga isolada foi a da alga vermelha *Ptilota plumosa* (ROGERS *et al.*, 1977). As algas vermelhas são as que apresentam o maior número de espécies com atividade hemaglutinante e também o maior número de lectinas isolada como *Ptilota filicina* (SAMPAIO *et al.*, 1998) e *Hypnea musciformis* (NAGANO *et al.*, 2002), seguidas das algas pardas e verdes, que possuem apenas algumas lectinas isoladas. (SAMPAIO, 1992; SAMPAIO, 1997).

As lectinas de plantas vasculares têm sido as mais estudadas, tendo em vista a grande disponibilidade de sementes e sua facilidade de isolamento. Na classe das angiospermas, a família *Gramineae* (SHIBUYA *et al.*, 1988) possui o maior número de lectinas isoladas e caracterizadas entre as monocotiledôneas. Entre as dicotiledôneas, a classe das *Magnoliatae* tem sido amplamente estudada com lectinas isoladas de suas sementes e dos tecidos vegetativos (PEUMANS *et al.*, 1986; LIENER *et al.*, 1986).

1.2.4 Lectinas de leguminosas

As lectinas de leguminosas constituem à família de lectinas mais estudada, sendo uma ampla família de proteínas estreitamente relacionadas encontradas exclusivamente em espécies representativas desta família (*Leguminosae* ou *Fabaceae*). Mais de 100 lectinas dessa família são conhecidas, quase todas isoladas de sementes (SHARON & LIS, 1990). Por

ser prontamente obtida uma fração purificada e exibir uma extraordinária variedade de especificidade por açúcares, essas lectinas se apresentam adequadas para a resolução de questões de como proteínas se ligam a carboidratos. Compreensões fundamentais do estudo dessas lectinas têm sido amplamente aplicadas para lectinas de outras famílias, como lectinas tipo-C que tem uma grande importância farmacológica (SHARON & LIS, 2002).

Do ponto de vista estrutural as lectinas de leguminosas são geralmente compostas de 2 ou 4 subunidades, iguais ou diferentes com massa molecular em torno de 25 a 30 kDa. Muitas vezes, em cada subunidade monomérica é encontrado um domínio de um ou mais metais (geralmente cálcio ou manganês) e um sítio de ligação a carboidratos com a mesma especificidade. Em termos de subunidades as lectinas são quase sempre compostas de uma cadeia polipeptídica estabilizada por pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e eletrostáticas. Entretanto, algumas lectinas possuem subunidades formadas por duas cadeias polipeptídicas, entre elas as lectinas da tribo *Vicieae*, gêneros *Pisum*, *Vicia*, *Lathyrus*, e *Lens* (ROUGÉ *et al.*, 1987).

Algumas lectinas de leguminosas podem ser encontradas em diferentes isoformas, como por exemplo, é a lectina de *Phaseolus vulgaris* (PHA) que é formada por duas subunidades gênicas diferente, denominadas E (31,7 kDa) e L (29,9 kDa), que combinadas dão origem a uma família de cinco isolectinas tetraméricas: E4, E3L, E2L2, EL3, L4 (FELDSTED *et al.*, 1977). Além da heterogeneidade genética, ou seja, mais de um gene codificando uma lectina, a ocorrência de isoformas pode ser atribuída a processamentos pós-traducionais incompletos (YOUNG *et al.*, 1995).

Lectinas de leguminosas apresentam alto grau de homologia seqüencial e estrutural, apesar da grande variabilidade quanto à especificidade por carboidratos, sendo, portanto um modelo perfeito para estudos estruturais de proteínas (CAVADA *et al.*, 1998).

1.2.5 Aspectos estruturais de lectinas de leguminosas

As lectinas de leguminosas são classificadas como uma família, desde que elas possuam alta similaridade de sequencia, alta similaridade de sequencia terciária e propriedades biofísicas. A maioria dessas lectinas de leguminosas existem como oligômeros

na natureza, a todas elas possuem íons metálicos para apresentarem sua capacidade de se complexarem á carboidratos. O sítio de ligação a metais e ligação a carboidratos, identificados em varias lectinas de leguminosas, são achados estruturalmente adjacentes (LIENER, 1986; VARKI, 2002). Todas elas possuem um motivo *Jelly-roll*, como de ConA. Esse motivo é composto de duas folhas- β dispostas paralelamente, uma anterior com seis fitas e uma dianteria com sete fitas, juntamente com uma pequena folha- β disposta sobre as outras duas. Todas conectas por diversos *loops* de varios tamanhos (Figura 2) (LORIS, 1998; VIJAYAN, 1999).

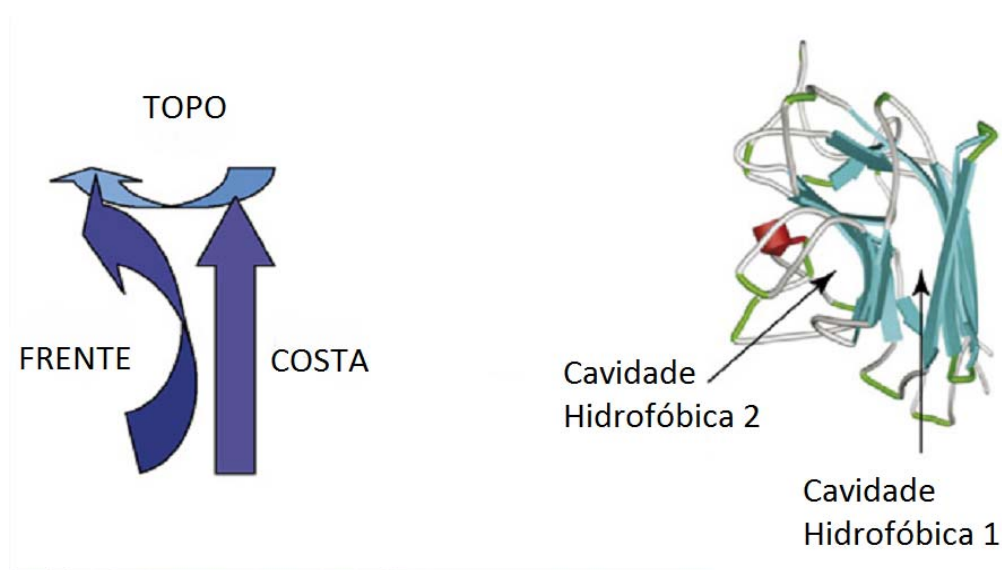
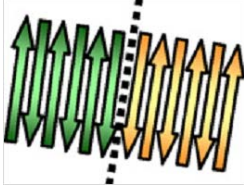
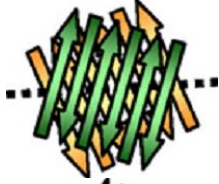

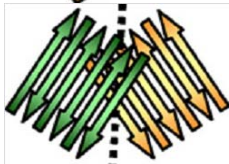


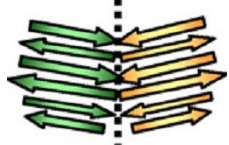


Figura 2- Arquitetura de um motivo *Jelly-roll*.

Fonte: Sinha (2007) adaptado.

Todas as lectinas de leguminosas formam dímeros e tetrâmeros feitos de dímeros. Os tetrâmeros tem principalmente duas interfaces,as quais tem semelhanças com com as interfaces entre os dímeros. A oligomerização entre a forma tetramérica e dimérica é principalmente mediada pelas interações das folhas- β anteriores de duas subunidades para produzir sete tipos diferentes de interface (Tabela 1). Lectinas ConA-like formam dímeros de dímeros. A dimerização inicial é formada pela associação lado a lado gerando uma folha- β única contínua de 12 fitas. Posteriormente outras lectinas de leguminosas achadas, teriam uma associação dimérica similar, e por isso veio a ser conhecido como “Canônico” ou modo de dimerização de lectinas de leguminosas tipo II (SINHA, 2007).

Tabela 1- Sete diferentes tipos de interface formados durante a oligomerização de lectinas de leguminosas.

Tipo de interface	Exemplo	Figura esquemática
Interface canônica ou tipo II	Presente em lectinas diméricas como Ervilha(PSL), Ulex (UEA-I) etc e lectinas tetraméricas como ConA e SBA.	
Interface X1	Observado em dímero DB58 e em uma interface não canônica no tetrâmero de SBA, PHA e etc.	
Interface X2	Observado apenas em tetrâmeros como uma interface não canônica em proteínas como ConA, lectina de <i>Dioclea grandiflora</i> (DGL), etc.	
Interface X3	Observado em dímeros de ECorL e WBA I e II.	
Interface X4	Exibida em GS4, GS1 e PNA.	
Interface X5	Visto em GS1. Interface X4 com um arranjo de ângulo de orientação mútua diferente.	
Interface não usual	Mostrada por PNA pelas subunidades 3 e 4.	

Fonte: Sinha (2007), adaptado.

1.2.6 Relação estrutura função

A diversidade de estrutura primária em posições estratégicas ao longo da interface dímero-dímero de lectinas de leguminosas de relações filogenéticas próximas pode influenciar nas diferenças nas tendências de oligomerização pH-dependente das lectinas de *Diocleinae*. Isto, por sua vez, pode modular a capacidade de lectinas de se ligar e agregar específicas glicoproteínas e glicolipídeos receptores da superfície celular, isto pode suportar a distinta capacidade de acionar respostas celulares. Além disso, diferenças espaciais entre sítios de reconhecimento a carboidrato de lectinas tetraméricas homólogas de *Diocleinae* combinado com diferentes distâncias entre epítomos cognatos de ligantes multivalentes pode conferir distintas especificidades/afinidades para estruturas primárias idênticas de carboidratos nos mesmos ou diferentes tipos celulares (CALVETE *et al.*, 1999).

Portanto, diversos fatos suportam a hipótese de que pequenas diferenças em pontos chaves da estrutura primária de lectinas próximas filogeneticamente provocam um impacto no equilíbrio dímero-tetrâmero, são amplificados por oligomerização, e possuem consequências biológicas importantes (CALVETE *et al.*, 1999).

1.2.7 Relevância das diferenças estruturais de seus DRCs com sua intensidade de se ligar a carboidratos.

As poucas diferenças que ocorrem na seqüência primária de lectinas do gênero *Canavalia* podem determinar diferenças particulares em sua estrutura tridimensional, como a mudança da Pro 202 em ConA para uma Ser 202 em ConM, altera consideravelmente o sítio de reconhecimento á carboidratos. Assim uma diferente distribuição espacial dos resíduos que compõem o sítio de reconhecimento á carboidrato permite distinguir diferentes motivos glicídicos (GADELHA *et al.*, 2005). A importância dessas alterações fica evidente quando estudamos interações com carboidratos mais complexos. Como padrões de interação de

ConM complexada com trealose e maltose, onde a maltose apresenta 9 pontes de hidrogênio e a trealose apenas 5 pontes de hidrogênio (Delatorre *et al.*, 2006).

Dados de comparação entre ConA e ConM complexados com diferentes dímanosídeos (M1-2M, M1-4M e M1-4M), uma vez que esses carboidratos estão presentes em glicosilações em asparagina(N-glicosilações), os quais estão disponíveis em receptores na superfície de células, essas discrepâncias apontam perspectivas estruturais para diferentes atividades biológicas (BEZERRA *et al.*, 2007).

1.2.8 Subtribo *Diocleinae*

As plantas pertencentes à Subtribo *Diocleinae* foram distribuídas na família *Leguminosae*, subfamília *Papilionoideae* tribo *Phaseoleae* (MAXWELL, 1969; AYMARD & CUELLO, 1991). As lectinas da subtribo *Diocleinae* são glucose(manose) específicas, e assim, podem ser isoladas em cromatografia de afinidade em Sephadex G50 (CAVADA *et al.*, 1990). Concanavalina A (ConA), de sementes de *Canavalia ensiformis* (família *Leguminosae*, tribo *Phaseoleae*, sub-tribo *Diocleinae*), foi a primeira lectina isolada, seqüenciada e resolvida sua estrutura tridimensional através de cristalografia de raios-X (SUMMER, 1936; CUNNINGHAN *et al.*, 1975; WANG *et al.*, 1975; HARDMAN & AINSWORTH, 1972; BECKER, 1975). Os muitos estudos bioquímicos, biofísicos e estruturais fizeram a ConA ser uma proteína com um alto grau de caracterização, assim despertando o interesse em lectinas de espécies da mesma subtribo. Contudo, muitas evidências demonstram que as diversas lectinas existentes nessa mesma subtribo apresentam variações em suas atividades biológicas, mesmo apresentando uma grande homologia em suas estruturas primárias (Figura 3). Os resíduos de aminoácidos de ConA que estão envolvidos no sítio de reconhecimento a carboidratos(Tyr12, Asn14, Leu99, Tyr100, Asp208 e Arg228), sítio de ligação a metais (Glu8, Asp10, Tyr12,Asn14, Asp19, His24, Val32, Ser34, Asp208 e Arg228) e cavidade hidrofóbica (Tyr54, Leu81, Leu85, Val89, Val91, Phe111, Ser113, Val179, Ile181, Phe191, Phe212 e Ile214) são completamente conservados nas estruturas primárias de outras lectinas de *Diocleinae* (CAVADA *et al.*, 2001).

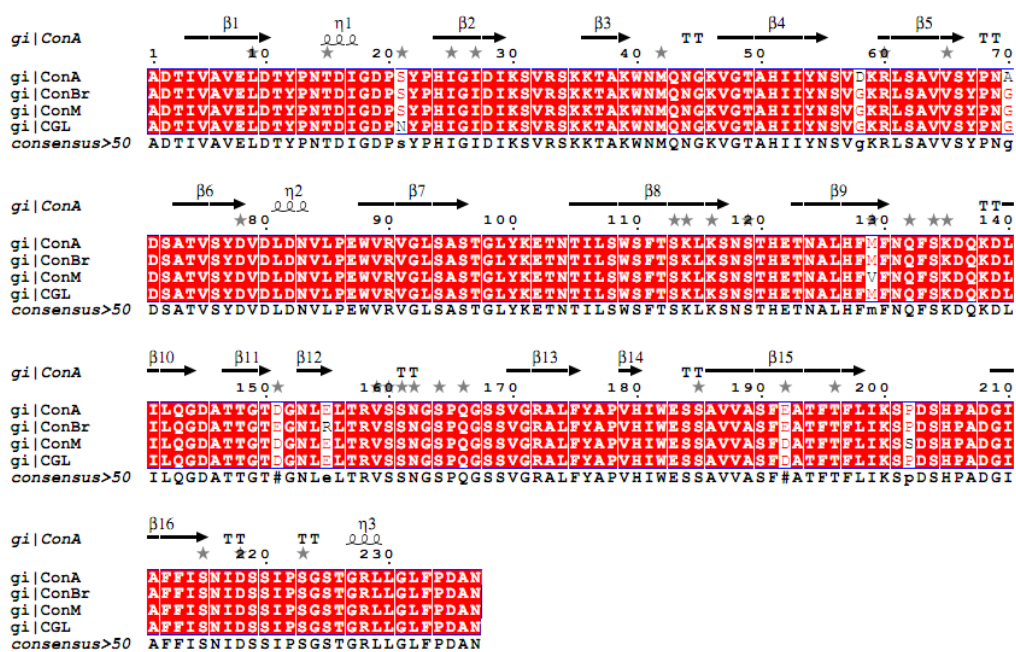


Figura 3- Alinhamento de sequência primária da lectina de *Canavalia ensiformis*(ConA), lectina de *Canavalia brasiliensis*(ConBr) e Lectina de *Canavalia maritima*(ConM) e *Canavalia gladiata*(ConG).

1.2.9 Lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr)

A lectina *Canavalia brasiliensis* (ConBr) é uma proteína tetramérica encontrada em sementes da leguminosa *Canavalia brasiliensis*, conhecida popularmente como feijão-de-boi. A ConBr é composta de subunidades idênticas, cada uma com 25 KDa e possuindo um sítio de reconhecimento a carboidratos, com especificidade para resíduos de D-Glucose, D-Manose, e açúcares derivados. As propriedades biológicas da ConBr conferem a esta proteína um grande potencial biotecnológico ainda não explorado (CAVADA *et al.*, 2001).

ConBr foi isolada e caracterizada em 1984, onde foi estudado que ao longo da germinação no escuro, lectinas de sementes de *Canavalia brasiliensis* as lectinas são preservadas até o final da exaustão das reservas protéicas cotiledonárias e só então eram hidrolisadas para abastecer a plântula de aminoácidos (MOREIRA *et al.*, 1984). Sua estrutura tridimensional foi resolvida por substituição molecular, onde apresentou 99% da sequência de

aminoácidos idêntica a sequência de ConA e apresenta a mesma especificidade a glicose/manose (SANZ-APARICIO *et al.*, 1997). Contudo mostrando diferentes atividades biológicas da ConA, como indução de edema de pata de rato (BENTO *et al.*, 1992) e estimulação in vitro de linfócitos humanos (BARRAL-NETO,1992). Recentemente foi descrito que a lectina ConBr também pode induzir ativação de linfócitos e apoptose (BARBOSA *et al.*, 2001), bem como produção de NO (Óxido Nítrico) por macrófagos (ANDRADE *et al.*, 1999).

As atividades biológicas, no entanto, dependem de um complexo específico processamento pós-traducional da proteína, que resulta na lectina madura e funcional. Por ser um evento fundamental para a produção de uma proteína biologicamente ativa, os mecanismos de processamento pós-traducionais de proteínas devem ser compreendidos em detalhes (CARRINGTON *et al.*, 1985). Neste processo a lectina é produzida como pré-pro-lectina. No retículo endoplasmático ela perde o peptídeo sinal transformando-se no pro-lectina. No complexo de golgi a pro-lectina sofre uma quebra proteolítica perdendo um segmento glicosilado de quinze aminoácidos no centro de sua estrutura e um peptídeo agora na sua região C-terminal, liberando energia suficiente para que haja uma posterior religação. Com essa perda a cadeia inicial é dividida em duas, β e γ , que são religadas, mas em locais diferentes. A cadeia γ que antes estava na região N-terminal é religada á cadeia β havendo uma inversão entre as regiões N e C-terminal formando-se cadeia α (Figura 4). Posteriormente, foi demonstrado que a reação é catalisada por uma asparaginil endopeptidase (MIN & JONES, 1992). Esse evento já era conhecido em bactérias, mas nos eucariotos é exclusivo nas lectinas do tipo ConA. Acredita-se que a maioria das lectinas da subtribo *Diocleinae* apresenta o mesmo processo.

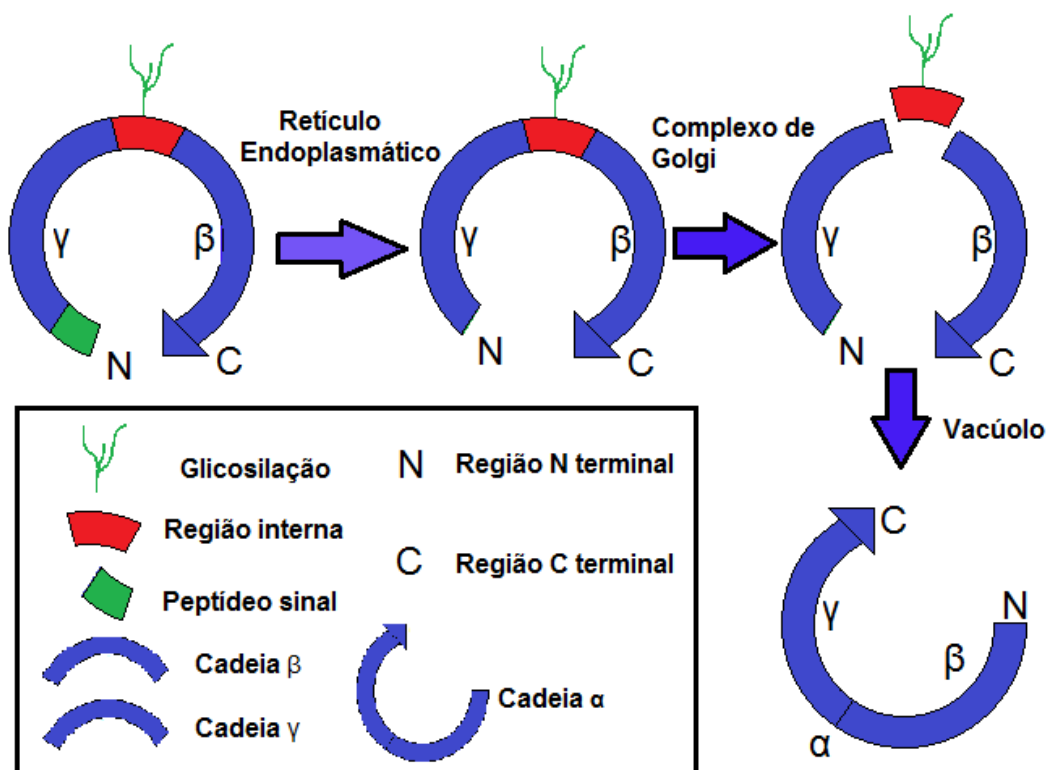


Figura 4- Representação esquemática da biossíntese das lectinas semelhantes a ConA no processamento chamado de permutação circular.

Fonte: Peumans e Van Damme (1998), modificado.

1.3 Purificação

Inicialmente o isolamento e a purificação das lectinas seguem o esquema usado para proteínas em geral sem exploração de suas características especiais. Os métodos usados incluíam precipitação por sais, ácidos e solventes orgânicos. Essas preparações estão longe de serem puras e os resultados obtidos com esses métodos têm que ser vistos com bastante cautela (RUDIGER & GABIUS, 2001).

O progresso nessa área foi alcançado pela introdução dos métodos cromatográficos mais específicos. Atualmente a cromatografia de afinidade, que é baseada na habilidade das lectinas se ligarem reversivelmente a açúcares, é a metodologia mais usada. Conhecimentos prévios da especificidade por açúcar de uma lectina que podem ser obtidos

pela inibição da atividade hemaglutinante de uma preparação bruta de lectinas como, por exemplo, os extratos protéicos totais, permitem a escolha do suporte cromatográfico adequado a ser utilizado na cromatografia de afinidade. A preparação bruta ou parcialmente purificada é então aplicada na coluna apropriada e, após a eluição de todo o material não retido (proteínas sem atividade lectínica), a lectina é então eluída com uma solução de um açúcar inibidor ou por alteração do pH (SHARON & LIS, 1989).

1.4 Lectinas e a sua indução á produção de óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) gerou uma quantidade exponencial de pesquisas desde sua identificação em 1987. Durante a última década esta pequena molécula emergiu como um mediador importante no processo fisiológico e patológico (ALEXANDROVA *et al.*, 2001). O NO é uma importante molécula de sinalização que induz uma variedade de fenômenos, como: relaxamento vascular dependente do endotélio, citotoxicidade mediada por macrófagos, inibição da ativação, adesão e agregação plaquetária, regulação da pressão sanguínea basal, entre outras (CERQUERA & YOSHIDA, 2002).

NO, é o principal mediador do relaxamento dependente do endotélio em aorta de rato, a qual é produzida a partir de arginina e oxigênio pela isoforma da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) em resposta de agonistas como acetilcolina, bradiquinina e substância P (FLEMING & BUSSE, 1999). Uma característica geral de eventos mediados por NO em vasos sanguíneos, é que eles são inibidos por análogos de L-arginina como L-NAME (TARE *et al.*, 2000). L-NAME bloqueia o relaxamento induzido por ConM, isso indica como o NO é liberado pela interação com lectinas exógenas com domínios glicídicos presentes em células endoteliais. (MILLS & HAWORTH, 1986).

Lectinas que são conhecidas por reconhecer moléculas de adesão de células endoteliais em se mostrado fatores de relaxamento do endotélio (EDRF) de vasos sanguíneos (KLEHA *et al.*, 1991, 1995). Em uma aorta de coelho pré-contraída com o endotélio intacto, a aglutinina de germen de trigo (WGA) produziu um relaxamento completamente dependente do endotélio, enquanto os efeitos de ConA foram apenas parcialmente dependentes do endotélio (NOMI *et al.*, 2002).

In vitro, as lectinas isoladas de *C. brasiliensis*, *C. maritima* e *C. gladiata* apresentaram efeito relaxante em aortas isoladas de ratos, pré-contraídas por fenilefrina. Esse relaxamento mostrou-se estritamente dependente de endotélio e realçou a importância da interação ao seu sítio de ligação a carboidrato para ocorrência do efeito. Uma variedade de respostas vasculares de lectinas foram revertidas por seus açúcares ligantes (KLEHA *et al.*, 1991, LIMA *et al.*, 2004; GADELHA *et al.*, 2005). Sendo que a nível vascular, o NO é o principal mediador do relaxamento dependente de endotélio no músculo liso vascular (FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980).

1.5 Cristalização

1.5.1 Cristalização de proteínas

Cristais são caracterizados por apresentarem alto grau de ordenação interna, ou seja, são formados por repetições translacionais de moléculas ou átomos em todas as direções. A formação regular dos cristais permite o uso da técnica de difração de raios X na determinação da estrutura tridimensional de proteínas (DELATORRE *et al.*, 2006).

Cristais de proteínas são bem diferentes de cristais de pequenas moléculas como os sais, e isso se deve principalmente ao alto conteúdo de solvente, que acaba por preservar o caráter bioquímico da molécula, permitindo o acesso de ligantes e dando alguma liberdade dinâmica à molécula. Estes cristais são estabilizados por contatos intermoleculares, e tanto a aderência intermolecular quanto a integridade da rede são asseguradas pelas ligações de hidrogênio entre as moléculas de água e a rede cristalina. A formação de núcleos cristalinos de moléculas protéicas quase sempre ocorre a níveis extremamente altos de supersaturação, porém nesses níveis a formação de precipitados amorfos é cineticamente mais favorável. Apesar de estes precipitados possuírem um estado energético mais alto, eles tendem aparecerem primeiramente no processo de equilíbrio impedindo a formação de cristais (Figura 5) (DELATORRE *et al.*, 2006).

A principal técnica usada para a determinação de estrutura tridimensional de moléculas biológicas é a cristalografia de raios X, porém uso desta requer a existência de um bom cristal da molécula de interesse, ou seja, um cristal que difrate a alta resolução. Desta forma, portanto obter bons cristais é o requisito mínimo para a análise cristalográfica de proteínas (DELATORRE *et al.*, 2006). Através desta técnica pode-se determinar espacialmente a posição atômica de todos os átomos que consistem uma macromolécula biológica como uma proteína. O uso de cristais de proteínas vem desde meados dos anos 30, quando dois cientistas, Bernal e Crowfoot conseguiram o primeiro padrão de difração de raios X de um cristal de pepsina.

1.5.2. Cristalização por difusão de vapor

Nos métodos de cristalização baseados na difusão por vapor, os solventes são transferidos de acordo com a pressão de vapor da amostra versus a pressão de vapor do solvente no reservatório (Figura 6). A técnica foi utilizada pela primeira vez na cristalização da tRNA (VON HIPPEL & SCHLEICH, 1969). Neste sistema, água é retirada da amostra, que sistematicamente diminui seu volume até que a pressão de vapor da água na amostra entre em equilíbrio com a pressão de vapor da água presente na solução do reservatório. As duas mais comuns técnicas de difusão por vapor são os métodos da gota suspensa (“hanging drop”), onde a gota literalmente fica pendurada sobre o reservatório, e o da gota sentada (“sitting drop”), onde a gota fica sentada num poço circundado pela solução do reservatório. Outro método que usa a técnica de difusão por vapor é a gota sanduíche (“sandwich drop”). Destes, o método da gota suspensa é um dos mais usuais e consiste no preparo de gotas em lamínulas de vidro, com volume variando de 1 a 10 μL de solução da amostra acrescidas de igual quantidade da solução do reservatório (VAN HOLDE *et al.*, 1998; RUPP & WANG, 2004).

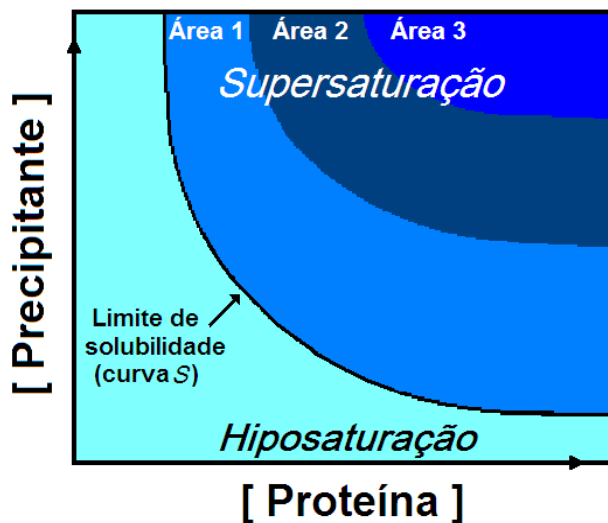


Figura 5- Diagrama de fases da concentração de uma proteína. Onde pode ser observado a zona metastável (área 1) corresponde à zona ideal para o crescimento dos cristais sem nucleação de novos cristais; a zona de nucleação (área 2) é onde os cristais nucleiam e crescem, e zona de precipitação (área 3) é a zona onde as proteínas não nucleiam e precipitam saindo da solução.

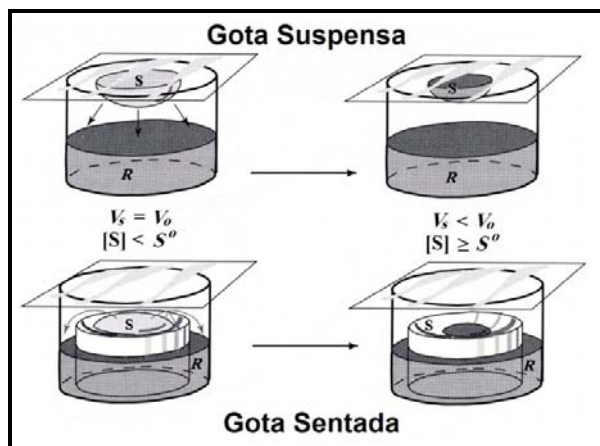


Figura 6- Técnicas da gota suspensa e gota sentada do método de difusão por vapor.

1.4.3 O método da matriz esparsa

Existem hoje no mercado, disponíveis para comercialização por diversas empresas, uma grande variedade de kits de “screening” de cristalização. Por exemplo, a Hampton Research comercializa os “crystal screens” I e II baseados no método da matriz esparsa de Jancarik & Kim (1991); a Decode Biostructures comercializa os “screenings Wizard I e II” baseados numa matriz esparsa randômica e a Jena Bioscience comercializa os “screenings” JB Screen 1-10 e o JB Screen Mixed com 240 condições (HUI & EDWARDS, 2003). Estes kits podem ser usados em conjunto com as diversas técnicas de cristalização atualmente existentes, tornando-os a primeira e melhor escolha, para quem deseja tentar iniciar a cristalização de uma nova proteína. Com esses kits, nada mais é requerido além de combinar uma série de potenciais soluções de cristalização com uma proteína de interesse com o auxílio de uma micropipeta, selar o sistema e esperar pelo sorriso do sucesso. Às vezes isso ocorre, às vezes não, e é neste momento que o cristalógrafo de proteínas deve começar a usar própria inteligência para diagnosticar o problema e inventar o remédio (MCPHERSON, 2004).

O desenvolvimento desses práticos kits, onde um número limitado de condições de cristalização é tentado usando-se pequenas quantidades de proteínas, só foi possível à medida que aumentavam o número de proteínas cristalizadas com sucesso, uma vez que as condições de cristalização se assemelhavam e o número de precipitantes, tampões e aditivos mostrava-se limitado. A partir da observação dos resultados preliminares destes experimentos, tanto nas tentativas com sucesso ou não na primeira vez, foi possível determinar quais tampões, aditivos e agentes precipitantes seriam os mais favoráveis e a partir daí procederam-se sucessivos melhoramentos até se conseguir cristais adequados (CARTER JR. & CARTER, 1979).

Com base nessas observações, e considerando como apenas três os principais fatores que afetam a cristalização (pH e materiais tampões, aditivos e agentes precipitantes) a Dra. Jaru Jancarick, propôs o método da matriz esparsa (JANCARICK & KIM, 1991), onde várias condições diferentes são tentadas ao mesmo tempo para se cristalizar proteínas. Assim foram escolhidas apenas as principais variáveis que afetam o processo de cristalização, já que

considerar todas as possibilidades para cristalização seria inviável dado ao elevado número de variáveis físicas, químicas e bioquímicas e a sua natureza combinatória.

No que diz respeito a variável pH e tampões, foram escolhidas cinco diferentes condições de pH 4,6; 5,6; 6,5; 7,5 e 8,5; e para cada valor de pH foi escolhido o tampão químico que havia mostrado ser o mais adequado para a cristalização de proteínas. A escolha de aditivos também foi baseada na experiência de muitos laboratórios. Para os agentes precipitantes foram escolhidos quatro tipos: 2-propanol, como agente volátil, 2-metil-2,4-pentanediol (MPD) e polietileno glicol (PEG) como agentes não-voláteis, além de vários agentes de salting-out (JANCARICK & KIM, 1991).

Por tentativa e erro a matriz multidimensional de JANCARICK & KIM (1991) foi simplificada de uma proposta original de 58 condições de cristalização para 50 condições, a forma como é comercializada atualmente pela Hampton Research.

1.5.4 Difração de Raios X

Os raios X são radiações eletromagnéticas assim como a luz, porém com comprimento de onda curto. Eles são produzidos quando partículas eletricamente carregadas a altas energias são desaceleradas. Em um tubo de raios X a alta energia é mantida por eletrodos que atraem elétrons em direção a um alvo metálico, o anodo. Os raios X são produzidos no ponto de impacto e irradiam em todas as direções. Tubos com alvo de cobre possuem radiação característica a um comprimento de onda de 1.5 Å, sendo o mais usado em cristalografia de proteínas.

Outra fonte não convencional de produção de raios X é a Fonte de Radiação Síncrotron. Nesta fonte há uma intensa radiação eletromagnética produzida por elétrons de alta energia num acelerador de partículas, abrangendo uma ampla faixa do espectro eletromagnético. A radiação é emitida em um cone estreito paralelo a velocidade instantânea da partícula. As partículas são levadas a moverem-se em trajetórias fechadas circulares ou elípticas. A fonte de radiação síncrotron é composta basicamente por um acelerador linear que produz feixes de elétrons, um amplificador circular (“booster”) onde os elétrons ganham energia atingindo velocidades próximas a da luz, um anel de armazenamento cavidade

toroidal em que os elétrons são obrigados a adotarem trajetórias circulares ou elípticas, várias linhas de luz de instrumentação acopladas ao anel de armazenamento de elétrons que recebe os feixes de fótons, gerados pelos elétrons que circulam no anel de armazenamento. É na linha de luz que os feixes são "preparados" para ter utilidade nas estações experimentais. Cada linha possui um componente chamado monocromador que define a característica da luz que será usada em experimentos científicos, portanto cada linha de luz tem características próprias atendendo a determinado tipo de trabalho. A Estação Experimental é instalada numa linha de luz. Cada estação é formada por equipamentos e instrumentação que permitem a realização de pesquisas utilizando a luz síncrotron. Uma estação experimental inclui o sistema porta-amostra (no qual é colocada a amostra do material que se quer analisar), aparelho goniométrico (que permite posicionar a amostra para receber adequadamente a incidência da luz síncrotron) e detectores de feixes de fótons espalhados ou transmitidos (que registram os acontecimentos físicos que ocorrem nos átomos e moléculas do material em estudo).

No Brasil existe uma única fonte de Radiação Síncrotron, o Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, localizado na cidade de Campinas estado de São Paulo. Este laboratório destina uma de suas estações de trabalho para uso exclusivo em pesquisas interessadas em elucidar estrutura de proteínas com aplicação da técnica de cristalografia de raios X.

Quando um feixe de raios X incidente encontra uma rede cristalina geralmente ocorre um espalhamento, apesar de haver tanto interferência destrutiva quanto construtiva entre os espalhamentos. A difração ocorre quando em certa direção os espalhamentos provenientes de diversos planos atômicos estão em fase, ou seja, há uma interferência construtiva entre as ondas espalhadas dos diversos planos. Esta condição de reforço das ondas espalhadas faz com que a imagem do espalhamento seja gravada em uma placa fotográfica.

A natureza eletromagnética dos raios X permite a analogia da formação da imagem do padrão de difração com a formação de imagem por raios de luz. Em um microscópio óptico o objeto é iluminado por feixes de luz, que ao serem espalhados, são coletados por uma lente objetiva, que recombina todos os raios de luz para formar a imagem do objeto. Da mesma maneira, um cristal é iluminado por feixes de raios X, que após serem espalhados são coletados em uma placa de imagem. Mas neste caso, para que a imagem seja reconstruída, é necessário saber qual a fase e a intensidade de cada raio difratado do padrão de difração, porém a informação referente à fase é perdida no experimento que somente registra a intensidade. A análise do padrão de difração de raios X, obtido a partir de um cristal de uma

substância de interesse, é de fundamental importância na obtenção de dados geométricos precisos da molécula, ou seja, a resolução de sua estrutura tridimensional.

1.5.5 Substituição Molecular

O método da substituição molecular é usado para a determinação inicial das fases, seu uso requer a existência de moléculas similares para serem usadas como modelo de procura. A validação do uso deste método baseia-se no fato de que estruturas similares ou homólogas devem diferir somente em orientação e posicionamento. Alguns passos devem ser seguidos para a resolução inicial da estrutura por este método tais como: encontrar a orientação correta do modelo na cela unitária, localizar os posicionamentos atômicos e a avaliação da qualidade do modelo. Esta técnica é vantajosa em relação a outras técnicas de determinação de fases porque requer somente um conjunto de dados de difração de raios X (SCHWARZENBACHER *et al.*, 2004).

Para a utilização do método da substituição molecular são necessários seis parâmetros que visam o melhor ajuste rotacional e translacional do modelo. Estes parâmetros são afetados por erros intrínsecos de correlação, pela qualidade de dados que pode ser pobre, pela falta de similaridade entre o modelo e a molécula de interesse e pela pequena dimensão do modelo usado na procura em comparação com o conteúdo da cela unitária, ocasionando o aparecimento de muitos picos falhos que inviabilizam a resolução preliminar da estrutura.

Os problemas em substituição molecular podem ser classificados em três tipos:

- Os para qual a solução é propriamente fraca.
- Os que, ainda, são difíceis de resolver.
- E aqueles que simplesmente são impossíveis de resolver por este método.

A utilização do método requer algumas informações iniciais referentes à coleta de dados: parâmetros de cela, resolução, modelos a serem testados, número de moléculas esperadas na unidade assimétrica e limite máximo de resolução. A determinação do modelo a ser usado na substituição molecular deve ser feita por critério de similaridade, através do alinhamento da seqüência primária via BLAST (programa de alinhamento de seqüências de proteínas encontrado na internet).

1.6 Refinamento

O refinamento é um processo de ajuste do modelo obtido por substituição molecular e tem como objetivo encontrar concordâncias entre os fatores de estrutura calculado e observado. O ajuste do modelo consiste em mudanças de parâmetros posicionais e do fator de temperatura para todos os átomos, excetuando o hidrogênio. Alguns fatores adicionais são incluídos no refinamento como comprimentos e ângulos de ligações. Uma estrutura refinada deve encontrar porções perdidas da molécula e erros grosseiros do modelo, bem como apresentar melhoras locais em parâmetros de ligações, no empacotamento de cadeias laterais, nos valores de desvios do ideal estereoquímico.

Quando os parâmetros estereoquímicos apresentam valores próximos aos padrões estabelecidos, estes podem ser controlados apenas com uso de um termo energético, este tipo de refinamento é chamado de refinamento por restrição. No refinamento por restrição, as coordenadas atômicas são as variáveis e os fatores de restrição são os ângulos de ligações, os comprimentos de ligações, os ângulos de torções e os contatos de van der Waals, ou seja, tais fatores são as observações.

Uma forma de avaliar se uma estrutura está inteiramente refinada, ou seja, não apresenta grandes erros sistemáticos é o acompanhamento de R-fator (índice de concordância entre dados do modelo e dados observados por cristalografia). Estruturas com refinamento em excesso apresentam valores de R-fator aceitáveis, devido à facilidade de manipulação dos dados cristalográficos. Em 1992, Brünger introduziu a idéia estatística do R-free, que nada mais é do que a retirada de uma pequena porcentagem, geralmente entre 5 e 10%, de reflexões para serem excluídas do refinamento. O valor do R-free, ao contrário do R-fator, não pode ser direcionado para baixo em um refinamento falso, devido à exclusão de suas reflexões deste processo de superefinamento. O valor de R-free só diminuirá se o refinamento for bem sucedido, portanto um valor alto de R-free e um valor baixo de R-fator indicam um modelo inapropriado.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Avaliar como a geometria dos resíduos que compõe o domínio de reconhecimento à carboidrato (DRC) pode influir na capacidade de induzir a produção de óxido nítrico por lectinas.

2.2 Objetivos específicos

- Obter cristais da lectina de sementes de *Canavalia brasiliensis*;
- Difratá-los em uma resolução adequada para análises do DRC;
- Avaliar a potencia da atividade biológica das lectinas citadas na literatura;
- Comparar a disposição dos resíduos que compõe o sítio e estabelecer qual disposição favoreceria uma maior atividade biológica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cristalização da ConBr

A lectina de sementes de *Canavalia brasiliensis* (ConBr), purificada segundo Moreira *et al.* (1984), foi solubilizada homogeneamente na concentração de $12,5 \text{ mg.ml}^{-1}$ em água deionizada para todos os experimentos de cristalização. A lectina de *Canavalia brasiliensis*, ConBr, foi submetida aos métodos da matriz esparsa e da difusão de vapor em gota suspensa, com o objetivo de obter a condição inicial de cristalização. A matriz esparsa foi montada em placas de linbro (Figura 7), e as condições de procura usadas foram as do kit de cristalização “Crystal Screen I & II” da Hampton Research (Hampton Research, Riverside, CA, USA). As gotas de cristalização contendo $2 \mu\text{l}$ de solução de proteína, $2 \mu\text{l}$ de solução de cristalização e $1 \mu\text{l}$ do ligante, foram montadas em lamínulas de $22 \times 22 \text{ mm}$. As lamínulas foram devidamente vedadas ao reservatório com graxa de silicone e armazenadas em um ambiente com a temperatura de 293 K . O volume de solução de cristalização adicionado a cada reservatório foi de $300 \mu\text{l}$. Com a obtenção dos primeiros cristais, ainda em tamanhos não satisfatórios, foi preparada uma placa de otimização em que se procurou variar pH, concentração do sal e concentração de precipitante.

O experimento de cristalização foi realizado na unidade de cristalização do BioMol-Lab (Figura 8), Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará – UFC. Esta unidade é semi-subterrânea e climatizada a 293 K .

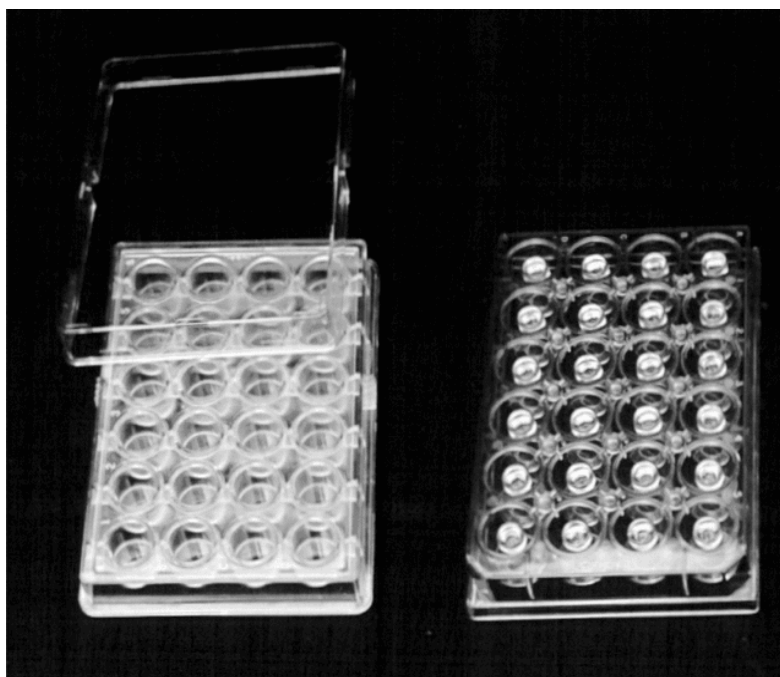


Figura 7- Placas de cristalização linbro para gota suspensa (esquerda) e gota sentada (direita).



Figura 8- Unidade de cristalização do Biomol-Lab.

3.2 Coleta de dados de difração de raios X

As placas de cristalização foram acondicionadas em caixas de isopor para serem transportadas ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, que possui uma estação de trabalho dedicada à cristalografia de proteínas. Esta estação (W01B-MX2) opera na faixa dos raios X a diversos comprimentos de onda (Tabela 2).

Tabela 2- Dados da Estação Experimental W01B-MX2 do LNLS.

Estação W01B-MX2	Especificações
Uso científico:	Análise de estruturas tridimensionais de macromoléculas biológicas.
Faixa de operação:	Pode realizar coletas de difração em diferentes comprimentos de onda (0,8-2,5 Å).
Fonte:	Wiggler multipolar de 2T.
Elementos ópticos:	Espelho colimador vertical, monocromador de cristal duplo de Si(111) e espelho focalizador toroidal.
Resolução em Energia	$(E/dE) = 4500$.
Detetor	MarMosaic 225 (CCD com área de 225x225 mm ²).

Após verificação da integridade dos cristais que chegaram ao síncrotron, os escolhidos para a coleta de dados foram laçados nas gotas e colocados em solução crio protetora composta de solução de cristalização com 30 % de glicerol, evitando assim a formação de camadas de gelo no laço. A temperatura do crio spray foi ajustada para 100 K, com o objetivo de diminuir a vibração térmica do cristal e aumentar a intensidade de espalhamento do mesmo. O cristal foi devidamente posicionado na cabeça goniométrica do difratômetro e alinhado em relação ao feixe de raios X, para que se pudesse iniciar a coleta. Uma primeira imagem foi coletada com a placa de imagem posicionada a 150 mm do cristal e

com tempo de exposição de 30 s. Logo após, foi feita a análise inicial da imagem de difração e decisões quanto à resolução, tempo de exposição, ângulo de oscilação e grupo espacial foram tomadas e averiguadas em novas imagens. Ao término desta etapa a estratégia de coleta foi completada e então um conjunto completo de imagens foi coletado. A integralização do conjunto completo de imagens de difração de raios X foi feita usando o programa Mosflm (programa livre encontrado no pacote colaborativo de programas biológicos CCP4). A qualidade dos dados escalonados foi aferida usando o programa Scala também pertencente ao CCP4. O programa Scala (LESLIE, 1992) monta um arquivo de intensidades com as observações únicas, de posse desse arquivo foram verificadas as extinções sistemáticas e o grupo espacial foi elucidado.

3.3 Substituição Molecular e Refinamento

A proteína usada como modelo na substituição molecular foi a lectina de *Canavalia brasiliensis*. Para a determinação das fases iniciais foi usado o programa MOLREP (VARGIN & TAPLYAKOV, 1997). O modelo inicial gerado por substituição molecular foi inicialmente submetido a refinamentos de corpo rígido, de restrição e posicional. Os mapas de densidade eletrônica foram analisados usando o programa Wincoot (EMSLEY & COWTAN, 2004). Ajustes nas cadeias laterais da proteína foram feitos manualmente com auxílio do programa Wincoot. A cada ajuste novos passos de refinamento posicional foram feitos. Usando o programa Wincoot, foram adicionadas moléculas de água ao modelo final.

3.4 Análise da estrutura

A estrutura da proteína, resolvida no presente trabalho, foi alinhada com a ConBr previamente resolvida a 3.0 Å, ConM e ConA. Então diferenças significantes em estrutura primária e conformações estruturais modificadas como: *loops* com alto fator de temperatura, disposições alteradas, DRC e as distâncias dos resíduos que os compõem. Esses fatores foram analisados e investigados como tais

mudanças podem mudar as características de suas atividades biológicas. Também foi realizada uma busca por ligantes, como o Abu, que apresenta um sítio conservado em outra lectinas da subtribo *Diocleinae* (DELATORRE *et al.*, 2007).O programa Wincoot também foi utilizado para analisar as distâncias estudadas no domínio de reconhecimento a carboidrato e o programa Q-SiteFinder (LAURIE *et al.*,2005) utilizado para reconhecer os sítios de ligação seus resíduos e o volume que o compõe. Foram submetidos a caracterização do DRC e cálculo do volume ConM (Código PDB: 2CWM), ConA (Código PDB: 1JBC) e ConBr (Código PDB: 3JU9). Todas as figuras e sobreposições foram feitas com o programa PyMol (DELANO, 2002) e os mapas de omissão foram gerados usando o programa OMITMAP(BHAT & COHEN, 1984) .

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Cristal de ConBr

A lectina de *Canavalia brasiliensis*, quando submetida ao ensaio de cristalização com o Crystal Screen 2 da Hampton, apresentou pequenos cristais na gota correspondente a condição 32, a qual era composta de 100mM de cloreto de sódio, 100 mM de hepes pH 7,5 e 1,6 sulfato de amônio. A partir desta condição foi elaborado um ensaio de otimização com variações sutis da condição 32, onde foi observada em uma semana a formação de cristais de tamanho considerável de dimensões aproximadas de 0.4 x 0.5 x 0.4 mm (Figura 9) na condição com 200 mM de cloreto de sódio, 100 mM de hepes pH 8.5 e 1.8 M e sulfato de amônio.

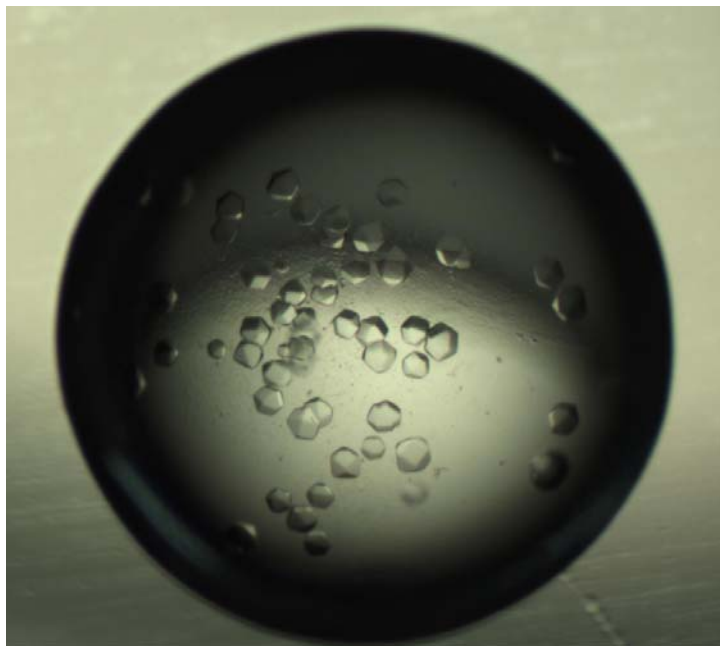


Figura 9- Cristais de ConBr em sua condição otimizada.

4.2 Dados da Difração

O cristal de ConBr foi difratado com uma resolução máxima de 1.8 Å, resfriado a uma temperatura de 100 K usando 30 % de glicerol como crioprotetor para evitar a formação de gelo. Os dados de difração por raios-X foram coletadas em um comprimento de onda de 1.42 Å na linha de trabalho MX1 (Laboratório Nacional de Luz Síncrotron – LNLS, Campinas, Brasil) usando uma placa detectora CCD (MAR research) a uma distância de 130 mm do cristal. Um conjunto de 360 imagens (oscilação 0.5°) foi gravado. Os dados de difração foram indexados, integrados e escalonados usando os programas MOSFLM (LESLIE, 2006) e o SCALA (EVANS, 2006). Os cristais pertencem ao grupo espacial ortorrômbico I222 e o coeficiente de Matthews (MATTHEWS, 1968) foi de 2.43 Å³ Da⁻¹, indicando um monômero na unidade assimétrica. As estatísticas da coleta de dados estão na Tabela 3.

Tabela 3- Estatística da coleta de dados, refinamento e qualidade da estrutura.

Parameters	Values
<u>Data Collection</u>	
Grupo espacial	I222
Parâmetros da célula unitaria (Å)	
A	68,3
B	73,0
C	99,5
Reflexões totais	99052
Número de reflexões únicas	14.784
Moléculas por unidade assimétrica	Monomer
Limite de resolução (Å)	58,9 – 1,8
R _{merge} (%)	6,9 (19,6)*
Completeza (%)	99,2 (99,2)*
Multiplicidade	6,7
(I)/ó	6,9 (3,5)*
<u>Substituição Molecular</u>	

Coeficiente de correlação	69,4
R _{factor} (%)	41,2
<u>Refinamento</u>	
Margem de resolução escalonada(Å)	36,510 – 2,1
R _{factor} (%)	20,4
R _{free} (%)	25,3
Número de residues na unidade assimétrica	237
Número de moléculas de água	139
<u>Fatores de Temperatura</u>	
Estimativa do B value para toda a cadeia da proteína (Å ²)	31
<u>Gráfico de Ramachandran</u>	
Residúos nas regiões permitidas (%)	86,4
Residúos nas regiões generosamente permitidas (%)	13,6
Residúos nas regiões não permitidas (%)	0

*Os valores em parênteses representam a camada de maior resolução

4.3 Substituição molecular e refinamento

A estrutura do cristal foi determinada por substituição molecular usando o programa MOLREP (VARGIN & TEPLYAKOV, 1997). As coordenadas da estrutura da ConBr (Código do PDB 1AZD) (SANZ-APARICIO, 1997), foi usada como modelo de busca, indicando os melhores resultados de coeficiente de correlação com 69.4 % e um Rfator de 41.2 %. As coordenadas do ácido α -aminobutírico (Abu) e glicerol foram obtidas pelo programa PRODRG (SCHUETTELKOPF & VAN AALTEN, 2004).

As estruturas iniciais foram refinadas utilizando REFMAC5 (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994). Algumas regiões da cadeia principal (68-70, 117-123, 148-151, 202-205) foram ajustadas para satisfazer a densidade de elétrons e 139

moléculas de água foram adicionados ao modelo usando o programa COOT (EMSLEY & COWTAN, 2004).

No mapa 2Fo-Fc foi possível observar duas densidades a 5σ próximas à Arg 228, sendo esta região amplamente disponível para ao solvente. Esta região foi resolvida pela adição de um íon cloreto orientado com o nitrogênio da cadeia lateral da Arg 228 e o nitrogênio da ALA236, um outro íon cloreto com uma molécula de água e os nitrogênios da cadeia lateral de ARG228 e ASN14. Uma vez que estão presentes em solução de cristalização para explicar esta densidade de elétrons.

Depois disso, um refinamento de restrições foi realizado, resultando em um R_{factor} de 20,4% e um R_{free} de 25,3%. Um omit map a 3σ foi gerado para o ácido α -aminobutírico (Figura 11) com o programa CCP4 Omit program (Collaborative Computacional Project, Number 4, 1994). As estatísticas de refinamentos cristalográficos são mostradas na tabela 3.

4.4 Estrutura geral da ConBr

A estrutura determinada desse novo cristal de ConBr (Código do PDB 3JU9) revela algumas diferenças da estrutura da ConBr previamente depositada (Código do PDB 1AZD). A estrutura refinada consiste em um monômero da ConBr, 139 moléculas de solvente, dois íons cloreto, um glicerol no DRC e uma única molécula de Abu na unidade assimétrica. O arranjo biológico da ConBr é um tetrâmero, e a nova estrutura resolvida a 2.1 Å alinhada com a ConBr resolvida a baixa resolução não mostra grandes diferenças nas coordenadas da cadeia principal, mas outros segmentos de grande instabilidade como o loop conservado nas lectinas tipo ConA que se refere a região 117-123 comumente descrita como uma região pobre em densidade eletrônica (BOUCKAERT *et al.*, 1999) revelou uma grande melhora no mapa de densidade eletrônica e coordenadas. As regiões 68-70, 117-123, 148-151 e 202-205 apresentou as maiores diferenças entre a estrutura refinada e o modelo, mostrando alterações posicionais nos resíduos de aminoácido (Figura 10).

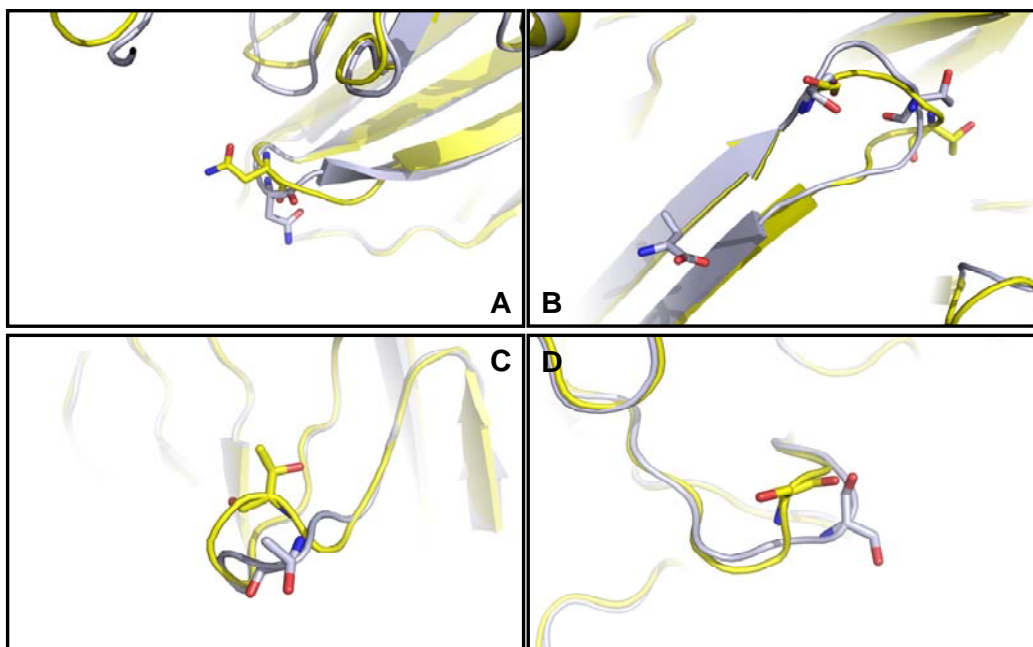


Figura 10- A estrutura da ConBr previamente depositada (Código do PDB 1AZD) está demonstrada em amarelo e a nova estrutura está demonstrada em cinza. (A) *Loop* 68-71, (B) *loop* 117-123, (C) *loop* 148-151, (D) *loop* 202-205.

O mapa fo-fc apresentou uma densidade próximo aos resíduos Leu 115, Leu 126 e Val 179 que corresponde ao aminoácido não protéico ácido α -aminobutírico (Abu) comumente co-purificado com lectinas da subtribo *Diocleinae*, a qual as coordenadas foram anteriormente descritas na lectina de *Canavalia gladiata* lectin (CGL) (Delatorre *et. al.* 2007).

O Abu é um aminoácido não protéico que pode proteger certas plantas de alguns patógenos; por exemplo, quando produzido em algumas plantas do gênero *Arabidopsis*, este induz a resistência a certos patógenos. Abu protege essas plantas contra patógenos através da ativação de mecanismos de defesa naturais da planta, como a deposição de calose e respostas hipersensitivas (HR) e formação de traços de necrose. A indução de resistência é muitas vezes associada a um processo de iniciação que consiste em um aumento da capacidade de mobilização celular a respostas de defesa (TON & MAUCH-MANI, 2004). Muitas lectinas de plantas não possuem apenas funções internas como reserva de nitrogênio e reconhecimento específico, mas também são capazes de interferir no funcionamento de organismos invasores através da interação com glicoconjugados na superfície ou no trato digestivo destes organismos (TAYLOR & KENNEWELL, 1993). Apesar de esta interferência ter sido relatada

como um evento específico de reconhecimento a carboidrato, ela não foi ainda elucidada. Vias reguladas por “stress” para uma rápida e elevada expressão gênica é um dos elementos principais na aclimatação em condições de “stress”. Ácido salicílico, ácido jasmônico, sistemina, etileno e ácido aminobutírico estão envolvidos na potencialização desta expressão gênica e em outros sinais moleculares (BOEGE & MARQUIS, 2005; TON & MAUCHMANI, 2004).

A estrutura do cristal de CGL (Código do PDB 2D7F) mostrou um sítio hidrofóbico que contempla o sítio do Abu. Na estrutura da ConBr, o sítio apresenta uma região na superfície disponível ao solvente. Essas interações hidrofílicas ocorrem através de pontes de hidrogênio entre o nitrogênio do Abu e o nitrogênio da cadeia principal da His 180, oxigênio do Abu e nitrogênio e oxigênio da cadeia principal da Ala 125. O Abu também interage com 2 moléculas de água com seu oxigênio e nitrogênio com distâncias de respectivamente 2.7 Å e 2.8 Å. Em adição. O Abu intermedeia contatos entre as subunidades que compõe o dímero canônico, estabelecendo pontes de hidrogênio com Asp 139 e Met 129 (Tabela 4). As interações do Abu com a ConBr são observadas na figura 12.

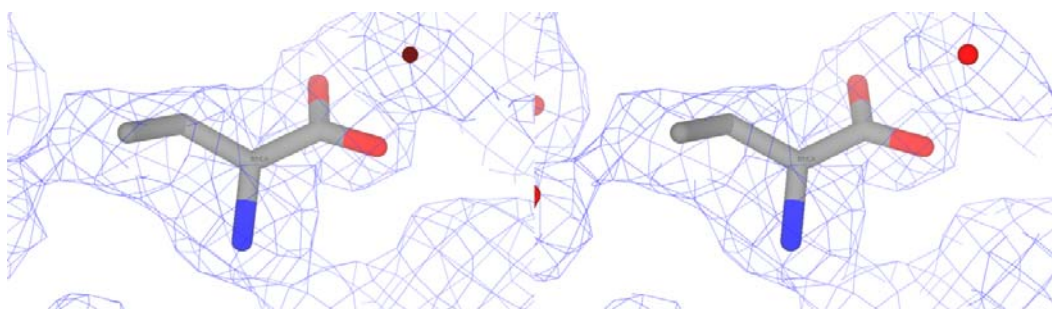


Figura 11- Representação do Omit map da estrutura do ácido α -aminobutírico (Abu) em uma visão estereoscópica.

Os resíduos Leu 115, Leu 125, Ala 126 e Val 179, que compõe o sítio hidrofóbico, são conservados em lectinas de leguminosas (DELATORRE, 2007) e essas interações do Abu localizadas nas extremidades do *loop* 117-123 (Figura 13). traz um aumento do espalhamento dessa área melhorando a densidade eletrônica (Figura 14). Estudos anteriores de estruturas de ConA não mostraram de forma clara as posições atômicas devido a pobre densidade eletrônica na superfície do *loop* (BOUCKAERT, 1999).

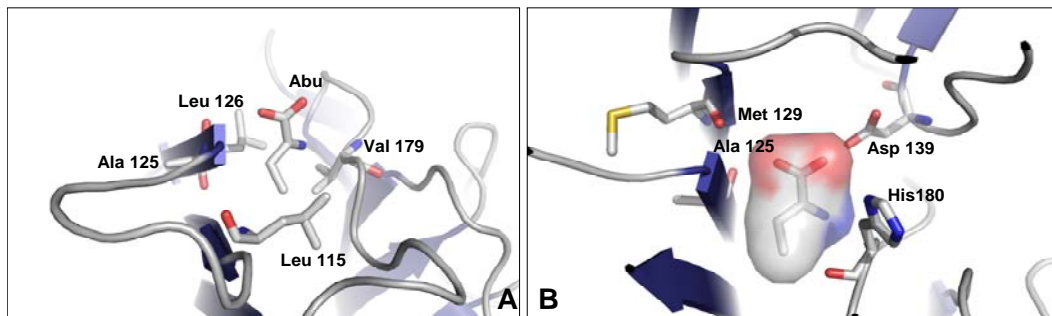


Figura 12- (A) Mostra claramente a região de interação hidrofóbica que interage com o Abu. (B) Essa figura denota as principais interações hidrofílicas entre Abu e os resíduos do dímero canônico.

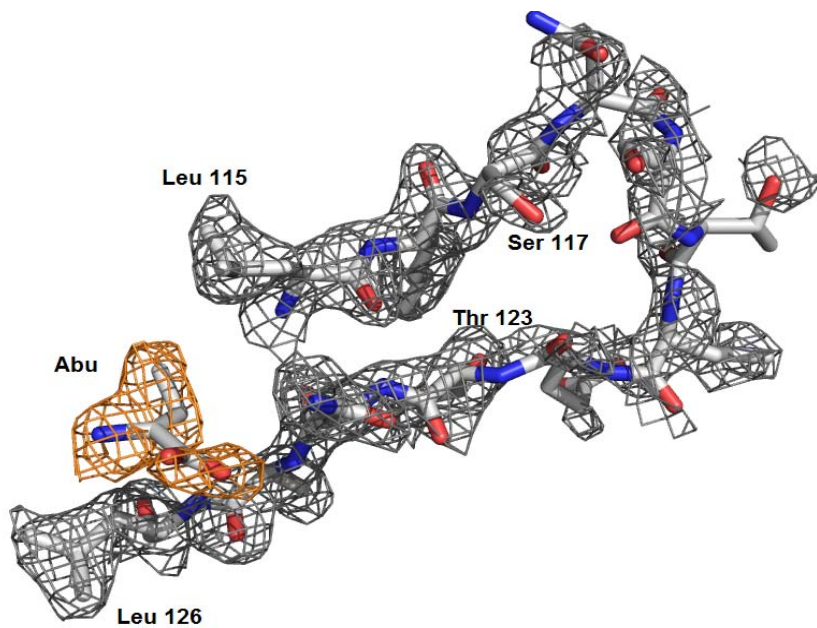


Figura 13- Representação do “loop” formado pela interação do Abu (Densidade em amarelo) com Leu 115 e Leu 126 e como ele estabiliza o loop 117-123, promovendo uma densidade mais evidente.

Tabela 4- Distâncias das interações hifrofilicas do sítio de ligação ao Abu.

Abu Átomo	Resíduo	Cadeia	Distância (Å)
N1	His180 N1	A	2.7
O	ALA125 N	A	3.4
O	ALA125 O	A	3.4
OTX	ASP139 OD2	B	2.6
O	MET129 O	B	3.4

4.5 O arranjo tridimensional do domínio de reconhecimento á carboidrato (DRC) e o entendimento sobre sua influência na indução da produção de NO

Lectinas da subtribo *Diocleinae* apresentam um alto grau de homologia de estrutura primaria e compartilham muitas características bioquímicas e estruturais como regiões conservadas que caracterizam esse grupo. Os resíduos de aminoácidos que estão envolvidos no sítio de reconhecimento á carboidrato (Tyr12, Asn14, Leu99, Tyr100, Asp208 e Arg228), sítio de ligação de metais (Glu8, Asp10, Tyr12, Asn14, Asp19, His24, Val32, Ser34, Asp208 e Arg228) e cavidade hidrofóbica (Tyr54, Leu81, Leu85, Val89, Val91, Phe111, Ser113, Val179, Ile181, Phe191, Phe212 e Ile214) são completamente conservadas em estrutura primária de outras lectinas de *Diocleinae* (CAVADA *et al.*, 2001).

A alta conservação do DRC em lectinas de leguminosas não determina a interação por carboidrato. ConM e ConA possuem diferentes padrões de interação com dimanosídeos (BEZERRA *et al.*, 2007). Lectinas do tipo Concanavalina A usadas na indução da produção de óxido nítrico (GADELHA, 2005; ANDRADE, 1999), mostram discrepâncias nos seus níveis de produção, onde ConM é a melhor indutora. Estabelecendo dois patamares na intensidade da atividade, tendo como a menor indutora ConA, e maior indutora ConM. O fato que essas lectinas tenham um DRC conservado, sugere que arranjos espaciais modificados de seus DRC justificam as diferentes intensidades de suas atividades biológicas.

As melhores indutoras de óxido nítrico, onde temos como exemplo ConM, apresentam um arranjo relacionado a DRC, os resíduos que compõe a cavidade mostram uma disposição em particular entre os resíduos Gly227-Tyr12, Leu99-Tyr12 e Leu99-Asn14 que apresentam distâncias mais estreitas, enquanto Leu99-Arg228, Tyr100-Tyr12, Tyr100-Asn14,

e Tyr100-Arg228 se mostra mais distanciado (Tabela 5). Isso faz com que o DRC dessas lectinas se torne mais estreito e profundo.

Tabela 5- Distância (Å) entre os resíduos de aminoácidos envolvidos na interação com carboidratos.

		ConBr 3JU9	ConM 2CWM	ConA 1JBC
Tyr12 CZ	Gly227 CA	8,67	8,97	9,61
Leu99 CG	Tyr12 CZ	6,85	7,64	9,6
Leu99 CG	Asn14 ND2	9,11	9,08	10,29
Leu99 CG	Arg228 CZ	11,86	11,16	10,53
Tyr100 CZ	Tyr12 CZ	5,45	5,26	4,37
Tyr100 CZ	Asn14 ND2	9,9	9,48	8,62
Tyr100 CZ	Arg228 CZ	14,25	13,7	10,87

*Essas distâncias correspondem para os átomos dos resíduos que participam nas interações com carboidratos.

ConBr é uma lectina que apresenta distâncias com o mesmo padrão de ConM (Figura 14) e as mesmas características são observadas na geometria do DRC, entretanto ConBr não possui uma substituição na PRO202, mas um arranjo modificado no *loop* 202-205 (Figura 14) pode justificar o movimento da Leu99 e Tyr100 como descrito na ConM (GADELHA, 2005; DELATORRE, 2006). A disposição desse *loop* promove uma interação próxima entre a cadeia lateral do Asp203 com a cadeia principal da Tyr100, aliviando o impedimento estérico em um contato próximo com Tyr12, permitindo uma aproximação entre Gly227 e Tyr12 (Figura 15). Resultando em um sítio mais estreito para to ConBr e ConM, ao contrario do que acontece em ConA que possui um sítio mais aberto e de um cavidade mais rasa, apresentando assim, menores atividade para a indução de óxido nítrico por células do endotélio.

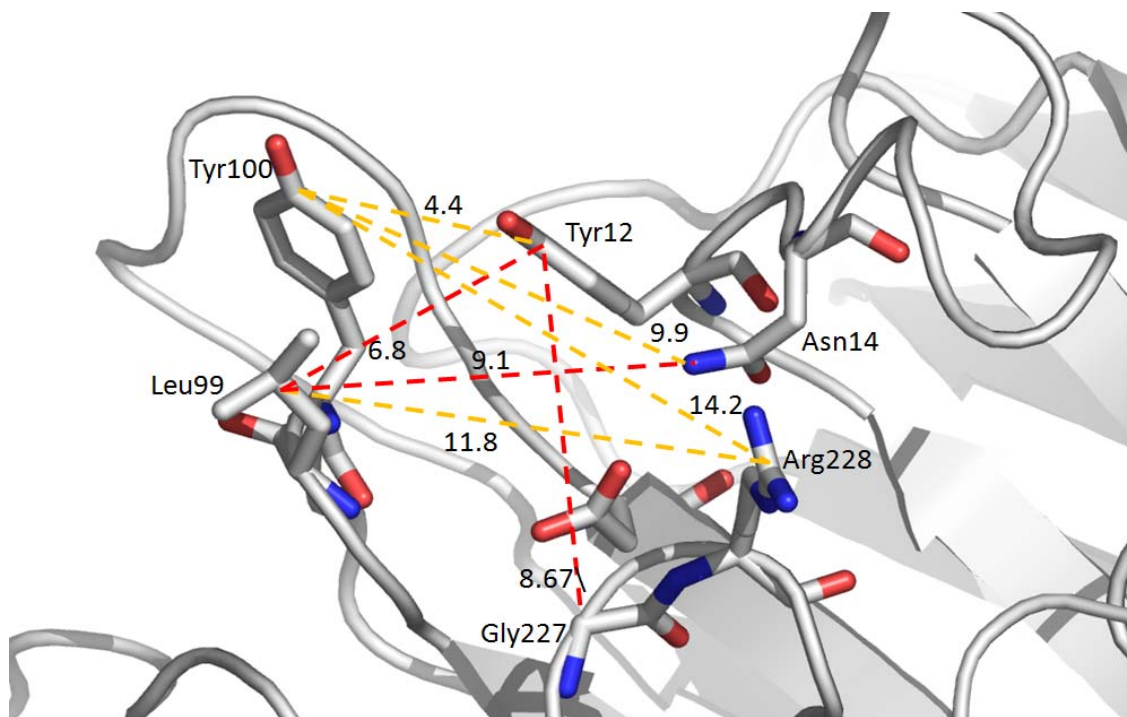


Figura 14- As linhas pontilhadas mostram as distâncias entre os resíduos envolvidos nas mudanças da geometria do DRC, onde em ConBr apresenta uma distância menor entre Gly227-Tyr12, Leu99-Tyr12 e Leu99-Asn14 (Linhas vermelhas) e um afastamento das outras distâncias, o que caracteriza os melhores indutores de óxido nítrico. As medidas estão mensuradas em angstroms.

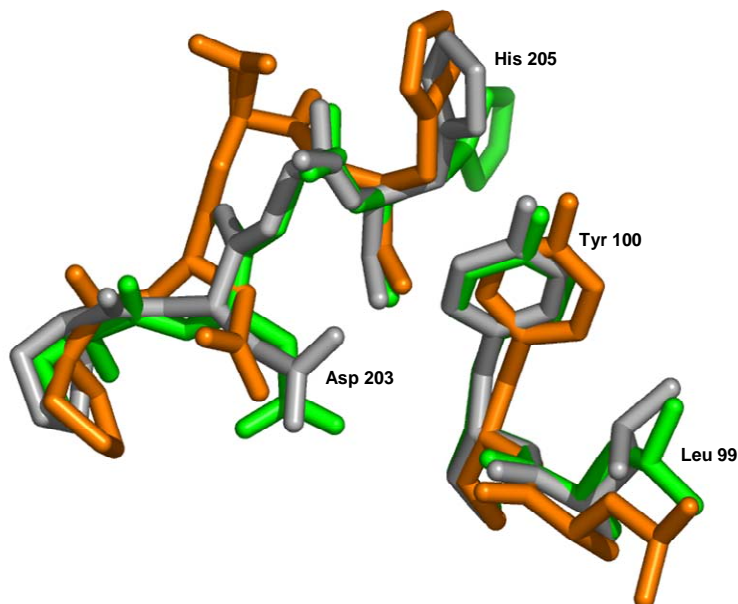


Figura 15- A sobreposição de ConBr(Cinza), ConM(verde) e ConA(laranja). ConBr apresenta uma conformação diferente de ConA sem mudanças na estrutura primária, o que favorece a interação entre Asp203 e Tyr100 igualmente como ConM, que mostra a substituição na Ser202, aproximando essa distância.

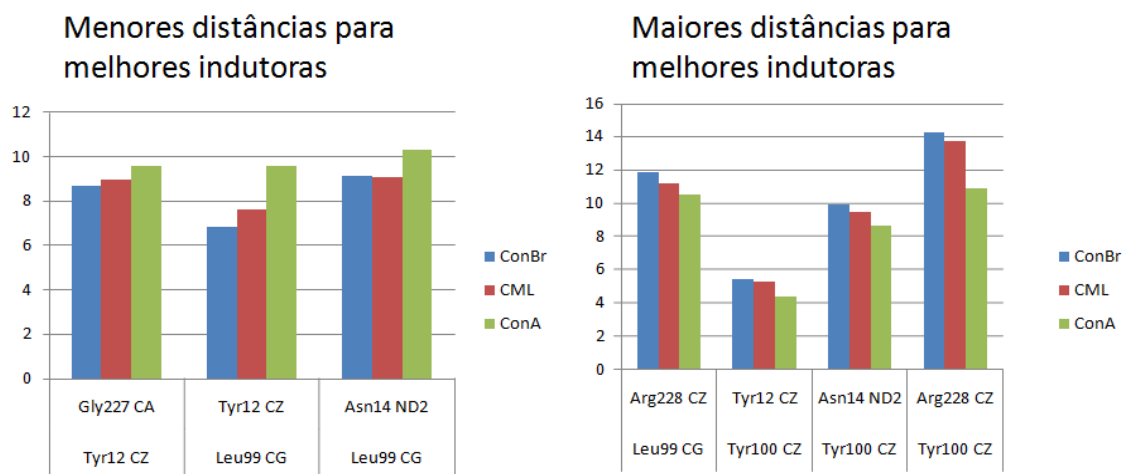


Figura 16- Avaliação das distâncias do domínio de reconhecimento á carboidrato relacionando maiores e menores distâncias para maiores e menores indutores. As medidas estão mensuradas em angstroms.

4.6 Avaliação do volume do sítio de ligação a carboidrato e sua relação com a atividade biológica.

A caracterização da coordenação dos resíduos no DRC da ConBr mostra que esta lectina seria uma indutora da produção de óxido nítrico mais potente que ConM, isso fica bem claro na avaliação das distâncias(Figura 16), contudo apresenta uma atividade inferior a de ConA(Figura 17).

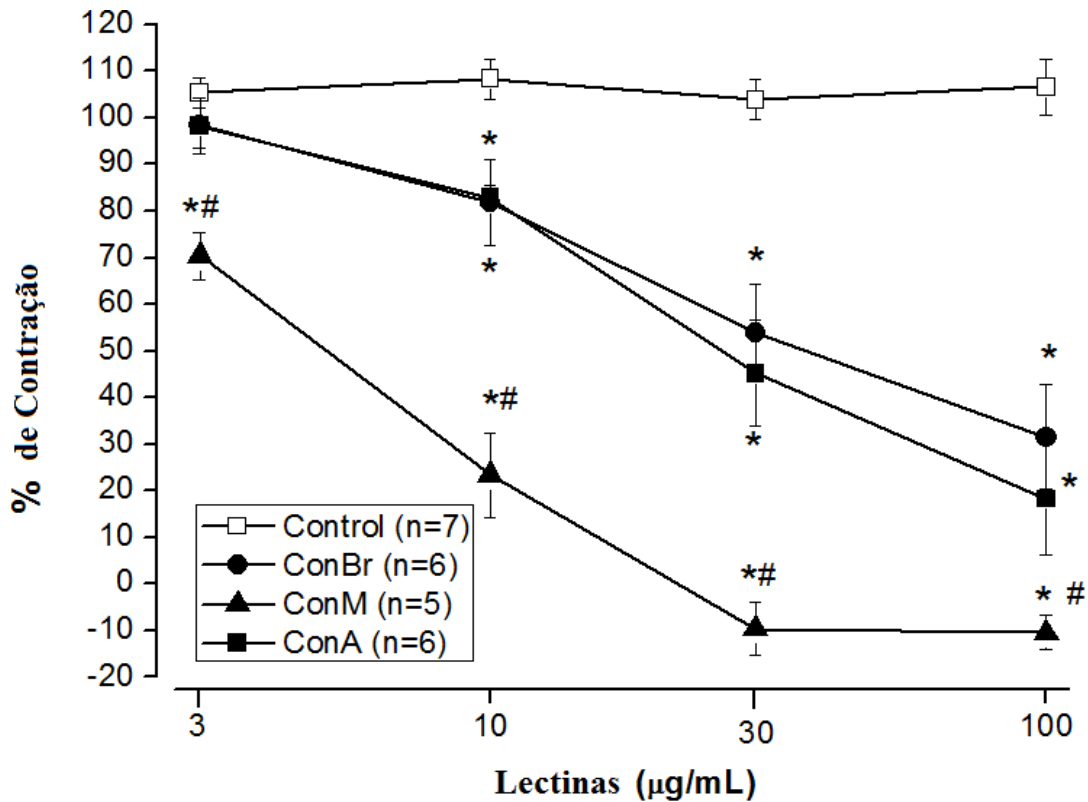


Figura 17- Lectinas do gênero *Canavalia* induzindo relaxamento em aorta endotelizada precontraída com fenilefrina. Dados comparando as respostas de ConBr, ConM e ConA com o controle (100% contração de Fenilefrina). Significância \pm S.E.M.; * $p < 0.05$ em relação ao controle, # $p < 0.05$ em relação à ConBr e ConA. (Adaptado de ASSREUY *et al.*, 2009 e GADELHA *et al.*, 2005).

Foram avaliados juntamente com os dados da geometria dos resíduos os dados de volume do sítio, onde foi observado um volumes de:

-135 angstroms³ para ConM (Código PDB: 2CWM)

-151 angstroms³ para ConA (Código PDB: 1JBC)

-105 angstroms³ para ConBr (Código PDB: 3JU9).

Apesar de a ConBr apresentar um padrão de distâncias do domínio de reconhecimento à carboidrato similar ao de ConM, a intensidade de sua atividade biológica reduzida pode ser explicada por uma avaliação do volume do DRC muito inferior ao de ConM e ConA.

Uma vez que o padrão de distâncias adequadas para indução da produção de óxido nítrico ideal possa ter um limite, o qual ao atingir extremos, possa modificar o sítio de forma que este apresente um volume muito reduzido, como o apresentando na ConBr que mostra sempre discrepâncias relacionadas á distancia (Fig. 16). Esse fator pode influenciar no número menor de interações formadas entre o DRC e o carboidrato da célula endotelial, assim acarretando uma diferença significativa na atividade biológica.

5. CONCLUSÕES

Algumas diferenças nas atividades biológicas podem ser decorrentes não só por diferenças na estrutura primária envolvidas diretamente no sítio específico, mas também por conformações diferentes no próprio sítio e *loops* adjacentes. Esta nova estrutura de ConBr, com uma resolução melhorada, mostram como os parâmetros geométricos no DRC podem determinar uma interação diferente com um carboidrato e induzir uma atividade diferente.

Comparando as atividades de ConA, ConBr e ConM, montamos níveis relativos de atividade na indução de óxido nítrico, estabelecendo um patamar negativo ou baixa indução (ConA) e um patamar positivo ou alta indução (ConM), esses dois grupos mostram discrepâncias na geometria do DRC que acabam por relacionar esses grupos à sua intensidade da atividade biológica. Quando, ConBr e ConM formam duas diferentes estratégias estruturais, uma translocação do *loop* 202-205 e uma substituição no SER202 respectivamente, para convergir em uma modificação similar do DRC. Esta, caracterizada principalmente por uma aproximação entre TYR12 e TYR100 e um distanciamento entre TYR100 e ARG228.

Mesmo apresentando uma geometria dos resíduos do DCR favorável à uma alta capacidade de induzir a produção de óxido nítrico, a baixa indução da ConBr acaba sendo justificada por extremos em suas distâncias, acarretando em seu menor volume do DRC, o que torna essa característica fundamental para a avaliação da atividade biológica.

Vale denotar que essas características foram analisadas para a indução da produção de óxido nítrico, outros modelos de atividade biológica merecem análises adicionais. Contudo os grupos formados pelas características similares da geometria do DRC e seu volume teriam uma enorme relevância para avaliação de atividades posteriores.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDROVA, R.; MILEVA, M.; ZVETKOVA, E. Nitric oxide and câncer. **Experimental Pathology and Parasitology**, v. 4, n. 7, p. 13-17, 2001.
- ANDRADE, J. L.; ARRUDA, S.; BARBOSA, T.; PAIM, L.; RAMOS, M. V.; CAVADA, B. S.; BARRAL-NETTO, M. Lectin-induced nitric oxide production. **Cellular Immunology**, v. 194, p. 98-102, 1999.
- AUB, J. C.; SANFORT, B. H.; COTE, M.N. Studies on reactivity of tumor and normal cells to a Wheat germ agglutinin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 54, p. 396-399, 1965.
- AUB, J. C.; TIESLAU, C.; LANKESTER, A. Reactions of normal and tumor cell to enzymes. I. Wheat-germ lipase and associated mucopolissaccharides. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 50, p. 613-619, 1963.
- AYMARD, G. C.; CUELLO, N. A. Catalogo y adiciones a las especies neotropicales Del genero *Canavalia* (*Leguminosae-Papilionoideae-Dioecleinae*). **Seminario-Taller de Trabajo sobre Canavalia (*Canavalia ensiformis* (L) DC)**, Maracay, Venezuela, 1991.
- BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; CAVADA, B. S.; GRANGEIRO, T. B.; FREITAS, L. A. R.; BARRAL-NETTO, M. In vivo lymphocyte activation and apoptosis by lectins of the *Dioecleinae* subtribe. **Mem. Inst.Oswaldo Cruz**, v 96, p. 673-678, 2001.
- 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. Human lymphocyte stimulation by legume lectins from the Dioecleae tribe. **Immunol. Invest.** v. 21, p. 297-303, 1992.
- BARRETO, R. L.; CORREIA, D. R. C.; MUSCARÁ, M. N. Óxido nítrico: propriedades e potenciais usos terapêuticos. **Quím. Nova**, v. 28, n. 6, p.1046-1054, 2005.
- BECKER, J. W.; REEKE, G. N.; WANG, J. L.; CUNNINGHAM, B. A.; EDELMAN, G. M. J. The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. **Biol. Chem.** v. 250, p. 1513-1524, 1975.
- BENTO, C. A. M.; CAVADA, B. S.; OLIVEIRA, J. T. A.; MOREIRA, R. A.; BARJA-FILGADO, C. Rat paw edema and leukocyte immigration induced by plant lectins **Agent actions**, v. 38, p. 48-54, 1992.

BEZERRA, G. A.; OLIVEIRA, T. M.; MORENO, F. B. M. B.; SOUZA, E. P.; ROCHA, B. A. M.; BENEVIDES, R. G.; DELATORRE, P.; AZEVEDO JR., W. F.; CAVADA, B. S. 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**, 160 (2), p. 168-176 2007.

BEZOUSKA, K. ; TABOURSKY, O.; DUBRYCHT, J.; POSPUSIL, M.; KOCOUREK, J. Identification of porcine lymphocyte membrane lectins as possible NK cell receptors using new derivatives of N-linked glycoproteins. In: KOCOUREK, **Journal of Structural Biology**, v. 160, p. 168–176, 1990.

BHAT, T.N., COHEN, G.H. OMITMAP: An electronic density map suitable for the examination of errors in a macromolecular model. **Journal of Applied Crystallography** 17 (pt 4), pp. 244-248, 1984.

BLUNDELL, T. L.; JOHNSON, L. N. **Protein Crystallography**. Academic Press. USA. 1976.

BOEGE, K., AND MARQUIS, R.J. Facing herbivory as you grow up: the ontogeny of resistance in plants. **Trends Ecol. Evol.** 20,441-48, 2005.

BOUCKAERT, J.; HAMELRYCK, T. W.; WYNS, L.; LORIS, R. The crystal structures of Man (α 1–3)Man(α 1–0)Me and Man(α 1–6)Man(α 1–0) Me in complex with Concanavalin. **A. J Biol Chem.** v. 274, p. 29188-29195, 1999.

BOYD, W.C.; SHAPLEIGH, Specific precipitation activity of plant agglutinins (lectins). **Science**, v. 119, p. 419, 1954.

BRINDA, K.V.; SUROLIA, A.; VISHVESHWARA, S. Insights into the quaternary association of proteins through structure graphs: a case study of lectins. **Biochem J.** v. 1 n. 391, p. 1-15, 2005.

CALVETE, J. J.; THOLE, H. H.; RAIDA, M.; URBANKE, C.; ROMERO, A.; GRANJEIRO, T. B.; RAMOS, M. V.; ROCHA, I. M. A.; GUIMARÃES, F. N.; CAVADA, B. S. Molecular Characterization and crystallization of Diocleinae Lectins. **Biochimica et Biophysica Acta.** v. 1430, p. 367-375, 1999.

CARRINGTON, D. M.; AUFFRET, A.; HANKE, D. E. Polypeptide ligation occurs during post-translational modification of concanavalin A. **Nature**, v. 313, p. 64–67, 1985.

CARTER JR., C. W.; CARTER, C. W. Protein crystallization using incomplete factorial experiments. **J. Biol. Chem.** v. 254, p. 12219-12223, 1979.

CAVADA B. S.; SANTOS, C. F.; GRANGEIRO, T. B.; NUNES, E. P.; SALES, P. V. P.; RAMOS, R. L.; SOUSA, F. A. M.; CRISOSTOMO, C. V.; CALVETE, J. J. Purification and characterization of a lectin from seeds of *Vatairea macrocarpa* duke. **Phytochemistry**, v. 49, n. 3, p. 675-680, 1998.

CAVADA, B. S.; BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; GRANGEIRO, T. B.; BARRAL-NETTO, M. Revisiting proteus: Do Minor Changes in Lectin Structure Matter in Biological Activity? Lessons from and Potential Biotechnological Uses of the Diocleinae Subtribe Lectins. **Current Protein and Peptide Science**, v. 2, p. 123-135, 2001.

CAVADA, B. S.; VIEIRA, C. C.; SILVA, L. M. A.; OLIVEIRA, J. T. A.; MOREIRA, R. A. Comportamento da lectina de sementes de *Canavalia brasiliensis*, Mart. durante a germinação em presença da luz. **Acta Botânica Brasilica**, v. 4, n. 2, p. 13-20, 1990.

CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDAM, W. B. Óxido nítrico. Revisão. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 17, n. 6, p. 417-423, 2002.

COLLABORATIVE COMPUTACIONAL PROJECT, Number 4. The CCP4 Suite: Programs for Crystallography. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 50, p. 760-763, 1994.

CUNNINGHAM, B. A.; WANG, J. L.; WAXDAL, M. J.; EDELMAN, G. M. **J. Biol. Chem.** v. 250, p. 1503-1512, 1975.

DAUTER, Z., DAUTER, M., DODSON, E. Jolly SAD. **Acta Crystallogr D.** 58: 494-506, 2002.

DELANO, W.L. The Pymol Molecular Graphics System. **DeLano Scientific**, San Carlos, CA, 2002.

DELATORRE, P. **Lectinas de leguminosas: novos enfoques estruturais para velhas moléculas.** 2006. 71f. Tese (Doutorado em Bioquímica), Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

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.; SAMPAIO, A. H.; AZEVEDO JR., W. F.; CAVADA, B.S. 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.** v. 154, p. 280–286, 2006.

DELATORRE, P.; ROCHA, B. A. M.; SOUZA, E. P.; OLIVEIRA, T. M.; BEZERRA, G. A.; MORENO, F. B. M. B.; FREITAS, B. T.; SANTI-GADELHA, T.; SAMPAIO, A. H.; AZEVEDO JR., W. F.; CAVADA, B. S. Structure of a lectin from *Canavalia gladiata* seeds: New structural insights for old molecules. **BMC Structural Biology.** v. 7, 2007.

DESAI, P.R.; SPRINGER, G.F. Eal serum anti-human blood group H(O) protein. **Meth. Enzimoi.**, v. 28, p. 383-388, 1972.

DRENTH, J. **Principles of Proteins X-Ray Crystallography.** Springer-Verlag. New York. USA. 1994.

EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: model-building tools for molecular Graphics. **Acta Crystallogr.** Sect. D Biol. Crystallogr. D60, p. 2126–2132, 2004.

EVANS, P. R. Scaling and assessment of data quality. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 62, p. 72-82, 2006.

FELDSTED, R.; EGORIN, M.; LEAVITT, R.; BAUCHUR, N. Recombination of subunits of Phaseolus vulgaris isolectins. **J. Biol. Chem.** v. 252, p. 2967–2971, 1977.

FLEMING, I., BUSSE, R. Signal transduction of eNOS activation. **Cardiovasc. Res.** 43, 532–541, 1999.

FURCHGOTT, R. T.; ZAWADZKI, Z. V. The obligatory role of the endothelial cells in relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, p. 373-376, 1980.

GABIUS, H. J. Biological information transfer beyond the genetic code: the sugar code. **Naturwissenschaften**, 87, 108–121, (2000).

GADELHA C. A.; MORENO, F. B.; SANTI-GADELHA, T.; CAJAZEIRAS, J. B.; ROCHA, B. A.; ASSREUY, A. M.; MOTA, M. R. L.; PINTO, N.V.; PASSOS MEIRELES, A.V.; BORGES, J. C.; FREITAS, B. T.; CANDURI, F.; SOUZA, E. P.; DELATORRE, P.;

- CRIDDLE, D.N.; AZEVEDO JR., W. F.; CAVADA, B.S. Native crystal structure of a nitric oxide-releasing lectin from the seeds of *Canavalia maritima*. **J Struct Biol**, v. 152, n. 3, p.185-94, 2005.
- GARTNER, T. K.; OGILVIE, M. L. Isolation and characterization of three Ca²⁺ dependent beta-galactose-specific lectins from snake venoms. **Biochem. J.**, v. 224, p. 301-307, 1984.
- GLICK, G. D.; TOOGOOD, P. L.; WILEY, D. C.; SKEHEL, J. J.; KNOWLES, J. R. Ligand recognition by Influenza virus. The binding of bivalents sialosides. **The J. Biochem. Chem.**, v. 266, n. 35, p. 23660-23669, 1991.
- GORELIK, E., GALILI, U., RAZ, A. On the role of cell surface carbohydrates and their binding proteins (lectins) in tumor metastasis. **Cancer Metastasis Rev** 20, 245–77, 2001.
- GRUBHOFFER, L.; MATHA, V. Characteristics of a new L-fucose and N-Acetyl-D-galactosamine specific lectin from the integument of *Galleria mellonella* larval. **Comp. Biochem Physiol.**, v. 100, n. 1, p. 73-76, 1991.
- HAMMARSTROM, S. Snail (*Helix pomatia*) agglutinin. **Meth. Enzymol.**, v. 28, p.368-383, 1972.
- HARDMAN, K. D.; AINSWORTH, C. F. Salt-induced inhibition of the precipitin reaction of concanavalin A with polysaccharides and glycoprotein. **Biochemistry**, v. 11, p. 1120-1128, 1972.
- HUI, R.; EDWARDS, J. High-throughput protein crystallization. **J. Struct. Biol.** v. 142, p. 154-161, 2003.
- JANCARIK, J.; KIM, S. H. Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. **J. Appl. Crystallogr.** v. 24, p. 409-411, 1991.
- JASKOLSKI, M. Personal remarks on the future of protein crystallography and structural biology. **Acta Biochimica Polonica**, 57 (3), pp. 261-264, 2010.
- KAWAGISHI, H.; ABE, Y.; NAGATA, T.; KIMURA, A.; CHIBA, S. A lectin from mushroom *Pholiota aurivella*. **Agric. Biol. Chem.**, v. 55, n. 10, p. 2485-2489, 1991.

KELLENS, L. T. C.; PEUMANS, W. J. Biochemical and Serology Comparison of lectins from different anastomosis groups of *Rhizontonia solani*. **Mycol. Res.** v. 95, n. 10, p. 1235-1241, 1991.

KLEHA, J. F.; DEVESLY, P.; JOHNS, A. The effects of lectins on the release of EDRF from rabbit aorta. **Br J Pharmacol**, v. 104, n. 2, p. 287-288, 1991.

KLEHA, J.F., DEVESLY, P., JOHNS, A. Endothelium derived relaxing factor release from canine coronary artery by leukocytes. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, 73 (3), pp. 404-408. 1995

KOGELBERG H., FEIZI T. New structural insights into lectin-type proteins of the immune system Review Article Current Opinion in, **Structural Biology**, Volume 11, Issue 5, 1 September 2001, Pages 635-643

LANDSTEINER, K.; RAUBITSCHKE, H. Beobachtungen über Hämolyse und Hämagglutination. **Zbl. Bakt. I. Abt. Orig.**, n. 45, p. 600–607, 1907.

LESLIE, A. G. W. **Newsletter on Protein Crystallography**, 26, 1992.

LESLIE, A.G.W. The integration of macromolecular diffraction data. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 62, n. 1, p. 48-57, 2006.

LIENER, I. E.; SHARON, N.; GOLDSTEIN, I. J. The lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine, **Academic Press**, New York, 1986, 600 p.

LIENER, I. E.; SHARON, N.; GOLDSTEIN, I. J. The Lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine, **Academic Press**, New York, 1986

LIENER, I. E.; SHARON, N.; GOLDSTEIN, I. J. The lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine, **Academic Press**, New York, 1986, 600 p.

LIMA, R. F.; CRIDDLE, D. N.; SOUZA, E. P.; SAMPAIO, A. H.; NASCIMENTO, K. S.; CAVADA, B. S.; ASSREUY, A. M. Red marine alga *Bryothamnion triquetrum* lectin induces endothelium-dependent relaxation of the rat aorta via release of nitric oxide. **Pharm Pharmacol**, v. 56, n. 11, p. 1415-21, 2004.

LAURIE A.T., JACKSON R.M. Q-SiteFinder: an energy-based method for the prediction of protein-ligand binding sites. **Bioinformatics**. 21(9), 1908-1916.2005

LORIS, R.; HAMELRYCK, T.; BOUKAERT, J.; WYNS, L. Legume lectin structure. **Biochim. Biophys. Acta**. v. 1383, n. 9–36, 1998.

MANN, B. J.; TORIAN, B. E.; VEDVICK, T.S.; PETRI, W. A. J. Sequence of cystein-rich galactose-specific lectin of *Entamoeba histolytica*. **Prov. Natl. Acad. Sci.**, v. 88, n. 8, p. 3248-3252, 1991.

MATTHEWS, B. W. The Solvent Content of Protein Crystals. **J. Mol Biol**. v. 33, p. 491–487, 1968.

MAXWELL, R. H. **The Genus Dioclea (Fabaceae) in the NewWorld**. Ph. 1969. 430p. D. Thesis, Dept. Botany, Southern Illinois University, 1969.

MCPHERSON, A. **Introduction to protein crystallization**. *Methods* 34, p. 254-265, 2004.

MILLS, A.N., HAWORTH, S.G. Changes in lectin binding patterns in the developing pulmonary vasculature of the pig lung. **J. Pathol**. 149, 191–199, 1986

MIN, W.; JONES, D. H. Stability and expression of recombinant prepro-concanavalin A after cytoplasmatic expression in *Escherichia coli*, **FEBS Lett**. v.301, p. 315-8, 1992.

MITCHELL, S. W.; REICHERT, E. T. Researches upon the venoms of poisonous serpents, **Smithson. Contrib. Knowl**. XXVI, 155p, 1886.

MITCHELL, S.W. Researches upon the venom of the rattlesnake, **Smithson. Contrib. Knowl**. XII, p. 89–90, 1860.

MODY .R., JOSHI, S., CHANEY, W. Use of lectins as diagnostic and therapeutic tools for cancer. **J Pharmacol Toxicol Methods**. 33:1–10, 1995.

MOREIRA, R.A.; CAVADA, B.S., Lectin from *Canavalia brasiliensis* (MART.). isolation, characterization and behavior during germination. **Biologia Plantarum**, 26 (2), pp. 113-120, 1984.

MOURA, R.M., QUEIROZ, A.F.S., FOOK, J.M.S.L.L., DIAS, A.S.F., MONTEIRO, N.K.V., RIBEIRO, J.K.C., MOURA, G.E.D.D., MACEDO, L.L.P., SANTOS, E.A., SALES, M.P.. CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*: Isolation, characterization and its effects on pathogenic bacteria and *Leishmania* promastigotes. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, 145 (4), pp. 517-523, 2006.

NAGANO, C. S.; MORENO, F. B.; BLOCH, C. J. R.; PRATES, M. V.; CALVETE, J. J.; SAKER-SAMPAIO, S.; FARIAS, W. R.; TAVARES, T. D.; NASCIMENTO, K. S.; GRANGEIRO, T. B.; CAVADA, B. S.; SAMPAIO, A. H. Purification and characterization of a new lectin from the red marine alga *Hypnea musciformis*. **Protein Pept. Lett.**, v. 9, n. 2, p. 159-166, 2002.

NOMI, M., ATALA, A., DE COPPI, P., SOKER, S. Principals of neovascularization for tissue engineering. **Molecular Aspects of Medicine**, 23 (6), pp. 463-483. 2002

OFEK, I., HASTY, D.L., DOYLE, R.J. Bacterial adhesion to animal cells and tissues. Washington, **DC: ASM Press**; 2003.

PRESANT, C.A.; KORNFIELD, S. J. Purification and partial characterization of two lectins from the cactus *Machaerocereus eruca*. **J. Biol. Biochem.**, v. 247, p. 6937-6945. 1972.

PEUMANS, W. J.; ALLEN, A. K.; CAMMUE, B. P. A. A new lectin from meadow saffron (*Colchicum autumnale*). **Plant. Physiol.** v. 82, p. 1036-1039, 1986.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiol.**, v. 109, p.347-352, 1995.

PEUMANS WJ, ZHANG W, BARRE A, HOULES ASTOUL C, BALINT-KURTI PJ, ROVIRA P, ROUGE P, MAY GD, VAN LEUVEN F, TRUFFABACHI P, VAN DAMME EJM. (2000) Fruit-specific lectins from banana and plantain. **Planta** 211, 546-554 2000

ROGERS, D. J.; BLUNDEN, G.; EVANS, P. R. *Ptilota plumosa*, a new source of a blood group B specific lectin. **Medic Laboratory Sciences**, v. 34, p. 193-200, 1977.

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

RUDIGER, H.; GABIUS HANS-J. Plant Lectins: Occurrence, biochemistry, functions and applications. **Glycoconjugate Journal**, v. 15, n. 3, p. 589-613, 2001.

RUPP, B.; WANG, J. **Predictive models for protein crystallization**. *Methods* 34, p. 390-407, 2004.

SAFFER, L. D.; PETRY, W. A. J. Role of the galactose lectin *Entamoeba histolytica* in adherence-dependent killing of mammalian cells. **Infect. Immun.**, v. 59, n. 12, p. 4681-4683, 1991.

SAMPAIO, A. H. **Hemaglutininas de algas do nordeste brasileiro e isolamento de hemaglutinina de *Hypnea musciformis* (WULFEN) LAMOUREUX**. 1992. 74f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica), Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, 1992.

SAMPAIO, A. H. **Lectin from *Ptilota* and *Ulva* species**. Portsmouth, Inglaterra. 1997. 198pp. Originalmente apresentada como tese de doutorado, Universidade de Portsmouth, Inglaterra, 1997.

SAMPAIO, A. H.; ROGERS, D. J.; BARWELL, C. J. A galactose-specific lectin from the red marine alga *Ptilota ficilina*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 5, p. 765-769, 1998.

SANTOS E.A.; SALES M.P. CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians* : Isolation, characterization and its effects on pathogenic bacteria and *Leishmania* promastigotes; Comparative biochemistry and physiology. Part A, **Molecular & integrative**, vol. 145, no4, p. 517-523

SANZ-APARICIO, J.; HERMOSO, J.; GRANGEIRO, T. B.; CALVETE, J. J.; CAVADA, B. S. The crystal structure of *Canavalia brasiliensis* lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct biological properties from Concanavalin A. **FEBS Letters**, v. 405, n. 1, p. 114-118, 1997.

SCHUETTELKOPF, A. W.; VAN AALTEN, D. M. F. PRODRG-a tool for highthroughput crystallography of protein-ligand complexes. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, v. 60, p. 1355-1363, 2004.

SCHWARZENBACHER, R., GODZIK, A., GRZECHNIK, S. K. & JAROSZEWSKI, L. The importance of alignment accuracy for molecular replacement. **Acta Cryst.** D60, 1229-1236, 2004.

SHARON, N. Bacterial lectins, Cell-Cell Recognition and Infections Disease. **FEBS Lett.** v. 217, n. 2, p. 145-157, 1987.

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

SHARON, N.; LIS, H. **Lectins, Chapman and Hall.** London. 126 p, 1989.

SHARON, N.; LIS, H. How proteins bind carbohydrates: Lessons from legume lectins. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, n. 22, p. 6586-6591, 2002.

SHARON, N., LIS, H. Lectins as cell recognition molecules. **Science** 246:227–34, 1989.

SHARON, N., LIS, H. Carbohydrates in cell recognition. **Science Am**, 268:82–9, 1993.

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

SHIBUYA, N.; GOLDSTEIN, I. J.; VAN DAMME, E. J.; PEUMANS, W. J. Binding properties of a mannose-specific lectin from snowdrop (*Galantus nivalis*) bulb. **J. Biol. Chem.**, v. 263, n. 2, p. 728-734, 1988.

SINHA S., GUPTA G., VIJAYAN M., SUROLIA, A. Subunit assembly of plant lectins Review Article Current Opinion in **Structural Biology**, Volume 17, Issue 5, October 2007, Pages 498-505

SUMMER, J. B.; HOWELL, S. F. The identification of the hemagglutinin of the jack bean with concanavalin A. **American Journal of Bacteriology**, v. 32, p. 227-237, 1936.

TARE, M., PARKINGTON, H.C., Coleman, H.A. EDHF, NO and a prostanoid: hyperpolarization-dependent and -independent relaxation in guinea-pig arteries. **Br. J. Pharmacol.** 130, 605–618, 2000.

TAYLOR, J.B. AND P.D. KENNEWELL. **Modern Medicinal Chemistry.** Ellis Horward publication, NY, London, Toronto, pp: 288 1993.

- TON, J., AND MAUCH-MANI, B. a-amino-butyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-dependent priming for callose. **Plant J.** 38, 119-130, 2004.
- UMETSU, K.; YAMASHITA, K.; SUZUKI, T. Purification and carbohydrate binding specificities of a blood type B binding lectin from hemolymph of a crab (*Charybdis japonica*). **J. Biochem.**, v. 109, n. 5, p. 718-721, 1991.
- VAN DAMME, E. J. M.; PEUMANS, W. J.; BARRE, A.; ROUGÉ, P. Plant Lectins: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 17, n. 6, p. 575-692, 1998.
- VAN HOLDE, K.E.; JOHNSON, W.C.; HO, P.S. **Principles of Physical Biochemistry**. New Jersey: Prentice Hall. 1998, 657p.
- VARGIN, A.; TAPLYAKOV, A. MOLREP: an Automated Program for Molecular Replacement. **J. Appl. Cryst.** v. 30, p. 1022-1025, 1997.
- VARKI, A.; CUMMINGS, R.; ESKO, J.; FREEZE, H., HART, G.; MARTH, J. Essentials in Glycobiology, **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, Cold Spring Harbor, NY, 2002.
- VIJAYAN, M.; CHANDRA, N. **Lectins. Curr. Opin. Struct. Biol.** v. 9, p. 707-714, 1999.
- VON HIPPEL, P.; SCHLEICH, T. The effects of neutral salts on the structure and conformational stability of macromolecules in solution. In Structure of biological macromolecules (Timasheff, S. N. & Fasman, G. D., eds). **Marcel Dekker Inc.**, New York, p. 417-575, 1969.
- WANG, J. L.; CUNNINGHAM, B. A.; WAXDAL, M. J.; EDELMAN, G. M. **J. Biol. Chem.**, v. 250, p. 1490-1502, 1975.
- WADE JR LG. **Organic chemistry**. Prentice-Hall Inc.; 1999.
- YAMADA, Y.; AKETA, K. Purification and partial characterization of hemagglutinins in seminal plasma of the sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*. **Biochemica et Biophysica Acta**, v. 709, p. 220-226, 1982.

YOUNG, N. M.; WATSON, D. C.; THIBAUT, P. Mass spectrometric analysis of genetic and post-translational heterogeneity in the lectins jacalin and *Maclura pomifera* agglutinin. **Glycoconjugate J**, v. 12, p. 135-141, 1995.

YU, X. Q.; KANOS, M. R. Immulectin-2, a lip polyssacharide-specific lectin from an insect, *Manduca sexta* is induced in response to a gram negative bacteria. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 48, p. 37373-37381, 2000.



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

EDUARDO HENRIQUE SALVIANO BEZERRA

**ANÁLISE ESTRUTURAL DO DOMÍNIO DE RECONHECIMENTO À
CARBOIDRATO DA LECTINA DE *Canavalia brasiliensis* E SUA
RELAÇÃO NA INDUÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO**

FORTALEZA - CE

2011