

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DA
LECTINA RECOMBINANTE DE CANAVALLIA BRASILIENSIS
(rConBr) PRODUZIDA EM ESCHERICHIA COLI

Nádia Accioly Pinto Nogueira

Fortaleza - Ceará

1999

N.Cham T574.192 N713p T

Autor: Nogueira, Nadia Accioly Pinto.

Título: Purificacao e Caracterizacao Bio



1149504

Ac. 37899

BCT

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DA LECTINA
RECOMBINANTE DE *CANAVALIA BRASILIENSIS* (rConBr) PRODUZIDA EM
ESCHERICHIA COLI

Nádia Accioly Pinto Nogueira

Fortaleza, 1999

UFC/BU/BCT

08/09/1999



R1149504
C557501
T574.192

Purificacao e Caracterizacao
Biologica

N713p

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DA LECTINA
RECOMBINANTE DE *CANAVALIA BRASILIENSIS* (rConBr) PRODUZIDA EM
ESCHERICHIA COLI

NÁDIA ACCIOLY PINTO NOGUEIRA

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

FORTALEZA - 1999

N713p **Nogueira, Nádia Accioly Pinto**
1999 **Purificação e caracterização biológica da lectina recombinante de *Canavalia brasiliensis* (rConBr) produzida em *Escherichia coli* / Nádia Accioly Pinto Nogueira. - Fortaleza: Universidade Federal do Ceará / Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, 1999.**

139 f.: il.

1. Biologia molecular. 2. Proteína recombinante. 3. *Escherichia coli*. 4. *Canavalia brasiliensis*. I. Título.

CDD 574.87

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

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

Nádia Accioly Pinto Nogueira

Tese aprovada em 09/07/99

Dr. Thalles Barbosa Grangeiro

Orientador da Tese

Presidente

Depto. Biologia-UFC

Dr. Benildo Sousa Cavada

Conselheiro

Depto. Bioquímica e Biologia Molecular-UFC

Dra. Cláudia Ferreira Santos

Conselheiro

Depto. Ciências Fisiológicas-UECE

Dr. Marcos Antônio de Morais Junior

Conselheiro

Depto. Genética-UFPe

Dr. Joaquim Albenísio Gomes da Silveira

Conselheiro

Depto. Bioquímica e Biologia Molecular-UFC

**“Construa sabiamente. É a única vida que você construirá.
Mesmo que você tenha somente mais um dia de vida, esse
dia merece ser vivido graciosamente e com dignidade.**

A vida é um projeto de você mesmo”.

(Autor desconhecido)

Dedico esta tese aos que amo muito

*Daniel,
André,
Pedro,
Karlla*

AGRADECIMENTOS

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

De forma muito especial:

Ao professor Dr. Thalles Barbosa Grangeiro, pela orientação segura e incansável, pela amizade sincera, e principalmente pelo estímulo e confiança nas horas mais difíceis.

Ao professor Dr. Benildo de Sousa Cavada pelas inúmeras doses de otimismo, valiosas contribuições científicas, amizade e confiança.

Aos professores, Dr. Joaquim Albenísio Gomes da Silveira e Dra. Cláudia Ferreira Santos pela apoio científico durante todo o período de Doutorado, e valiosas sugestões na etapa final desse trabalho.

Ao professor Dr. Marcos Antônio de Moraes Junior, do Departamento de Genética da Universidade Federal de Pernambuco, pela excelente contribuição na fase final desse trabalho.

Ao Dr. Márcio Viana Ramos pelas contribuições científicas para a realização desse trabalho.

Aos professores José Tadeu Abreu de Oliveira, José Luciano Bezerra Moreira e Renato Azevedo Moreira, pelo período que estive em seus laboratórios

Aos colegas do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, pela imensa contribuição em permitirem o meu afastamento para a realização desse Doutorado

Aos professores Arnaldo Viana, Maria de Fátima Oliveira, Ana Maria Asseury e Nylane Alencar pela ajuda na parte prática desse trabalho

Ao Dr. Juan J. Calvete, do Laboratório de Biomedicina de Valência, Espanha, pelo sequenciamento N-terminal da rConbr.

Ao Dr. José Carlos Gomes, do Departamento de Farmacologia da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP/Botucatu), pela determinação da indução de liberação de histamina pela rConBr e ConBr.

Aos colegas do Biomol Lab, Mazé, João Batista, Fernanda, Lia, Vanesca, Kátia, Iza, Beatriz, Marcelo, Carlos, Celso, Yussef, Vicente, Flávia e Creuza, e especialmente à Silvana e Alexandre.

A todos que formam o grande grupo de estudos de lectinas e demais professores, alunos e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.

À professora Maria Aparecida Oliveira Alves, do Laboratório de Citogenética e Genética Molecular, pela maneira carinhosa e profissional que me recebeu em seu laboratório.

Aos colegas do laboratório de Citogenética e Genética Molecular, Hélio, Fabiano, Vânia, Juliana, Delano, Alex, Péricles, Rodrigo e João Paulo pelos muitos momentos de ajuda, e principalmente pela convivência amável

À grande amiga Nylane, pela ajuda carinhosa durante todo esse trabalho, e principalmente, em sua fase final.

À amiga Moema Barbosa Grangeiro, pelo excelente trabalho de monitoria.

À Isabel, Sandra Mara, Carlos Couto, Benedito e Dárlío pelo carinho, amizade e companheirismo.

Às amigas de todos os momentos Cláudia Castelo, Ana Maria e Fátima Montezuma, pelo carinho, alegria e companheirismo, mesmo nas horas de maior solidão

Ao bom amigo Pádua Filho, pelos inúmeros momentos de descontração e boa música

Aos meus pais e irmãos, pelo apoio, confiança e alegria de sempre.

Aos meus filhos, por terem suportado tanta ausência, de uma forma tão paciente e carinhosa. Ao Daniel e André por assumirem lindamente a grande responsabilidade de cuidar do Pedro e da Karlla, e a esses por aceitarem essa condição.

ESTE TRABALHO FOI REALIZADO GRAÇAS AO AUXÍLIO DAS SEGUINTE
INSTITUIÇÕES:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), através da Bolsa de Doutorado concedida, nos anos de 1994 e 1995.

Fundação Cearense de Amparo à Pesquisa (FUNCAP), através da Bolsa de Doutorado concedida, nos anos de 1996 à 1998.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Cearense de Amparo à Pesquisa (FUNCAP), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PADCT), Banco do Nordeste do Brasil (BNB), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Universidade Federal do Ceará (UFC) e Biotools Ecological Foudation, através de convênios com o Laboratório de Citogenética e Genética Molecular do Departamento de Biologia e o Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (Biomol Lab) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Federal do Ceará.

Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (Biomol Lab) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e Laboratório de Citogenética e Genética Molecular do Departamento de Biologia, onde esse trabalho foi realizado.

SUMÁRIO

	Páginas
<u>LISTA DE FIGURAS</u>	I
<u>LISTA DE TABELAS</u>	IV
<u>ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES</u>	V
<u>RESUMO</u>	IX
<u>ABSTRACT</u>	X
1- <u>INTRODUÇÃO</u>	1
1.1- <u>Definições e considerações gerais</u>	1
1.2- <u>Lectinas de origem vegetal</u>	4
1.3- <u>Lectinas de leguminosas: uma família de proteínas homólogas</u>	8
1.3.1- Estrutura molecular	9
1.3.2- Composição de aminoácidos e carboidratos	11
1.3.3- Interação com carboidratos	12
1.3.4- Estrutura primária	16
1.3.5- Estrutura tridimensional	18
1.3.6- Sítios funcionais	20
1.3.6.1- Sítios de ligação a metais	21
1.3.6.2- Sítio de ligação a carboidratos	22
1.3.6.3- Sítios para ligantes hidrofóbicos	23
1.3.7- Biossíntese e processamento	24
1.4- <u>Lectinas da subtribo Diocleinae: um grupo de proteínas com alta homologia estrutural mas com propriedades biológicas contrastantes</u>	34
1.5- <u>ConBr, um modelo experimental no estudo do papel do processamento pós-traducional das lectinas de Diocleinae na produção de lectinas biologicamente ativas</u>	38
1.6- <u>Produção de lectinas recombinantes de leguminosas em <i>Escherichia coli</i></u>	47
2- <u>JUSTIFICATIVAS</u>	49
3- <u>ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL</u>	52

4-	<u>OBJETIVOS</u>	55
4.1-	<u>Objetivo geral</u>	55
4.2-	<u>Objetivos específicos</u>	55
5-	<u>MATERIAIS</u>	56
5.1-	<u>Sementes</u>	56
5.2-	<u>Cepa bacteriana recombinante</u>	56
5.3-	<u>Animais</u>	56
6-	<u>MÉTODOS</u>	57
6.1-	<u>Produção e purificação da lectina recombinante (rConbr) de <i>Canavalia brasiliensis</i></u>	57
6.1.1-	Expressão do gene <i>conbr</i> em células de <i>Escherichia coli</i>	57
6.1.2-	Purificação dos corpos de inclusão	58
6.1.3-	Purificação da rConBr por cromatografia de afinidade em Níquel imobilizado	58
6.2-	<u>Isolamento da lectina nativa de <i>Canavalia brasiliensis</i> (ConBr)</u>	59
6.3-	<u>Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e 2-mercaptoetanol (PAGE-SDS)</u>	59
6.4-	<u>Eletrotransferência para membrana de PVDF e seqüenciamento N-terminal</u>	61
6.5-	<u>Experimentos de imun química</u>	62
6.5.1-	Produção e purificação de IgG de coelho contra a lectina nativa de <i>Canavalia brasiliensis</i>	62
6.5.2-	Imunodifusão dupla de Ouchterlony	63
6.5.3-	Imunodeteção de proteínas imobilizadas em membranas (“ Western blotting “)	64
6.6-	<u>Cromatografia de fase reversa em coluna C 18 acoplada a sistema HPLC</u>	66
6.7-	<u>Cromatografias de afinidade</u>	66
6.7.1-	Cromatografia de afinidade em coluna de anticorpos policlonais de coelho contra a lectina nativa de <i>Canavalia brasiliensis</i> (ConBr) imobilizados em Sepharose	66
6.7.2-	Cromatografias de afinidade com açúcares imobilizados e polissacarídeos	67

6.7.2.1-	Cromatografia de afinidade em colunas de Sephadex G-50 e Sephadex G-75	67
6.7.2.2-	Cromatografia de afinidade em coluna de Maniose-Agarose	68
6.8-	<u>Atividades biológicas</u>	68
6.8.1-	Determinação da atividade hemaglutinante da rConBr e ConBr ...	68
6.8.2-	Efeito da injeção intraperitoneal da rConBr e ConBr em induzir a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos	69
6.8.3-	Efeito de açúcares sobre a migração de neutrófilos induzida pela injeção intraperitoneal de rConBr e ConBr em ratos	70
6.8.4-	Efeito edematogênico induzido pela injeção intraplantar subcutânea de rConBr e ConBr em ratos	70
6.8.5-	Efeito de açúcares sobre o desenvolvimento de edema de pata induzido pela injeção intraplantar subcutânea de rConBr e ConBr em ratos	71
6.8.6-	Efeito da liberação de histamina por mastócitos peritoneais de ratos induzida pela rConBr e ConBr	71
6.8.7-	Análise estatística	72
7-	<u>RESULTADOS</u>	73
7.1-	<u>Expressão da lectina recombinante (rConBr) de <i>Canavalia brasiliensis</i> em células de <i>Escherichia coli</i></u>	73
7.2-	<u>Purificação da rConBr produzida em células de <i>Escherichia coli</i></u>	79
7.3-	<u>Sequenciamento N-terminal</u>	84
7.4-	<u>Interação da rConBr com carboidratos</u>	87
7.5-	<u>Atividades biológicas da lectina recombinante (rConBr) de <i>Canavalia brasiliensis</i></u>	87
7.5.1-	Atividade hemaglutinante	87
7.5.2-	Atividade pro-inflamatória	91
7.5.3-	Envolvimento de resíduos de açúcar na indução da inflamação induzida por rConBr	94
7.5.4-	Indução da liberação de histamina por mastócitos de ratos pela rConBr	94
8-	<u>DISCUSSÃO</u>	98
9-	<u>CONCLUSÕES</u>	115

10-	<u>BIBLIOGRAFIAS</u>	116
11-	<u>APÊNDICE</u>	138
11.1-	<u>Preparação de meios de cultura</u>	138
11.1.1-	<u>Ágar Luria-Bertani (ÁgarLB)</u>	138
11.1.2-	<u>Caldo Luria-Bertani (Caldo LB)</u>	139
11.2-	<u>Preparação de culturas estoque em glicerol</u>	139

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Representação esquemática de lectinas.	3
2	Representação esquemática dos diversos tipos de processamento pós-traducionais observados durante a biossíntese das lectinas de leguminosas.....	27
3	Representação esquemática dos eventos co- e pós-traducionais que ocorrem durante a biossíntese da ConA e demais lectinas de Diocleinae.....	29
4	Representação esquemática do processamento da pro-ConA, com destaque para os sítios das clivagens proteolíticas catalisadas <i>in vivo</i> por uma asparaginil endopeptidase.....	31
5	Estrutura hipotética do precursor da ConA (33 kDa).....	33
6	Alinhamento múltiplo das seqüências de aminoácidos das lectinas de Diocleinae.....	36
7	Seqüência de aminoácidos da pre-pro-ConBr deduzida a partir da seqüência de DNA	42
8	Modelo tridimensional em fita da estrutura monomérica da ConBr, determinada por cristalografia de raios X.....	43
9	Modelo tridimensional em fita da estrutura quaternária da ConBr, determinada por cristalografia de raios X.....	44
10	Superposição das estruturas tridimensionais dos tetrâmeros da ConBr e ConA.....	46
11	Diagrama do vetor de expressão procariótico pET15b e detalhe da seqüência do sítio múltiplo de clonagem.....	54
12	Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (PAGE-SDS, 12,5 %) do extrato total e do meio de cultura de células de <i>E. coli</i> BL21 (λ DE3) transformadas com o vetor de expressão pETconbr, crescidas na presença e ausência de IPTG 1 mM.....	74

13	Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (PAGE-SDS, 12,5%) do extrato total e de frações subcelulares de células de <i>E. coli</i> BL21 (λ DE3) transformadas com o vetor de expressão pETconbr, crescidas na ausência e na presença de IPTG 1 mM.....	75
14	Imunodeteção ("western blotting") da rConBr expressa em células <i>E. coli</i> BL21 (λ DE3) contendo o vetor pET conbr e induzidas com IPTG 1 mM.....	77
15	Imunodeteção ("western blotting") da rConBr em diferentes frações subcelulares de células de <i>E.coli</i> BL21(λ DE3) contendo o vetor pETconbr e induzidas com IPTG 1 mM.....	78
16	Purificação da lectina recombinante (rConBr) de <i>Canavalia brasiliensis</i> por cromatografia de afinidade em níquel imobilizado (IMAC).....	80
17	Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (PAGE-SDS, 12,5%) das frações cromatográficas obtidas durante a purificação da rConBr por cromatografia de afinidade em níquel imobilizado em Sepharose.....	81
18	Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (PAGE-SDS, 12,5%) da rConBr produzida em <i>E. coli</i> e purificada por cromatografia de afinidade em níquel imobilizado.....	82
19	Imunodeteção ("western blotting") da rConBr nas frações cromatográficas obtidas durante a sua purificação por cromatografia de afinidade em níquel imobilizado em Sepharose.....	83
20	Cromatografia de afinidade das lectinas recombinante (rConBr) e nativa (ConBr) em coluna de anti-ConBr imobilizado em Sepharose.....	85
21	Cromatografia de fase reversa em coluna C ₁₈ acoplada a sistema HPLC das lectinas recombinante (rConBr) e nativa (ConBr) de <i>Canavalia brasiliensis</i>	86
22	Cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50 das lectinas recombinante (rConBr) e nativa (ConBr) de <i>Canavalia brasiliensis</i>	88

23	Cromatografia de afinidade em coluna de Agarose-Manose das lectinas recombinante (rConBr) e nativa (ConBr) de <i>Canavalia brasiliensis</i>	89
24	Cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-75 das lectinas recombinante (rConBr) e nativa (ConBr) de <i>Canavalia brasiliensis</i>	90
25	Efeito da injeção intraperitoneal das lectinas recombinante (rConBr) e nativa (ConBr) de <i>Canavalia brasiliensis</i> sobre a migração de neutrófilos em ratos.....	92
26	Efeito da injeção intraplantar subcutânea das lectinas recombinante (rConBr) e nativa (ConBr) de <i>Canavalia brasiliensis</i> em induzir edema de pata em ratos.....	93
27	α -metil manosídeo não inibe o edema de pata induzido pela lectina recombinante (rConBr) de <i>Canavalia brasiliensis</i> em ratos.....	95
28	α -metil manosídeo inibe o edema de pata induzido pela lectina nativa (ConBr) de <i>Canavalia brasiliensis</i> em ratos.....	96
29	Indução da liberação de histamina por mastócitos peritoneais em ratos pelas lectinas recombinante (rConBr) e nativa (ConBr) de <i>Canavalia brasiliensis</i>	97

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Rendimentos obtidos para a expressão de proteínas recombinantes em células de <i>E. coli</i>	114

A	ACT	Actina
B	BAL	Bacteraemia
C	CYS	Cisteína
D	ANT	Anticópsis
E	ELC	Endocitose
F	PH	Fenótipo
G	GLY	Glicose
H	HL	Hemólise
I	IF	Inflamação
K	KL	Keratina
L	LY	Lactose
M	MP	Mutação
N	NA	Nutrição
P	PA	Painel
Q	QA	Qualidade
R	RA	Reação
S	SA	Síntese
T	TA	Taxonomia
V	VA	Vitamina
W	WA	Wet weight
X	XA	Xenotransplante
Y	YA	Yeast

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

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

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

A ₂₁₆	Absorbância a 216 nm
A ₂₈₀	Absorbância a 280 nm
α	Alfa
A	Adenina
α-D-gal	Alfa-D-galactose
α-MM	Alfa-metilmanosídeo
Å	Âmstrong
Anti-ConBr	Anticorpo contra ConBr
β	Beta
C	Citosina
Ca ⁺⁺	Íon cálcio
CAPS	Ácido 3-ciclohexalamino-1-propanosulfônico
cDNA	DNA complementar
ConA ou Concanavalina A	Lectina de semente de <i>Canavalia ensiformis</i>
ConBr	Lectina de semente de <i>Canavalia brasiliensis</i>
C-terminal	Carboxi-terminal
DAB	Diaminobenzidina
DBA	Aglutinina de semente de <i>Dolichos biflorus</i>
DBL	Lectina de semente de <i>Dolichos biflorus</i>
DB58	Lectina de tecido vegetativo de <i>Dolichos biflorus</i>
DEAE	Dietilaminoetil
Δ	Delta
DGL	Lectina de semente de <i>Dioclea grandiflora</i>
DMPTU	N-dimetil-N'-feniltiouréia
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNase	Nuclease do Ácido Desoxirribonucléico
ECL;EcorL	Lectina de <i>Erythrina corallodendron</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
E.P.M.	Erro padrão da média
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Favina	Lectina de <i>Vicia fava</i>
γ	Gama

G	Guanina
GS4	Lectina 4 de <i>Giinffonia simplicifolia</i>
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IMAC	Cromatografia de afinidade em metal imobilizado
i.p.	Intraperitoneal
IPTG	Isopropiltiogalactopiranosídeo
kcal	Quilocaloria
kDa	Quilodalton
LB	Luria-Bertani
Líquido de Turkey	Ácido acético 2%; violeta de genciana 0,2%
LoLI	Isolectina 1 de <i>Lathyrus ochrus</i>
LTA	Lectina de <i>Lotus tetragonolobus</i>
Man	Manose
Mac-Grunwald -Giensa	Mac-Grunwald 0,15%; Giensa 0,1%; metanol
Mn ⁺⁺	Ion manganês
mA	Miliamper
mRNA	RNA mensageiro
n	Número de eventos
N-terminal	Amino-terminal
OD ₆₀₀	Densidade ótica a 600 nm
PAGE-SDS	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da DNA polimerase
PHA	Aglutinina de <i>Phaseolus vulgaris</i>
PTH	Feniltiohidantoina
PVDF	Difluoreto de polivilideno
rConBr	ConBr recombinante
RER	Retículo endoplasmático rugoso
RIPs	Proteínas Inativadoras de Ribossomos
RNA	Ácido ribonucléico

SBA	Aglutinina de soja
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Taq DNA polimerase	Polimerase do DNA de <i>Thermus aquaticus</i>
TCA	Ácido tricloroacético
THF	Tetrahidrofurano
TEMED	N, N, N', N'- tetrametiletilenodiamina
Tween	Polioxyetilenosorbitana monolaurato
T	Timina
TFA	Ácido trifluoracético
TRIS	Tris-hidróxiaminometano
UEA-I	Lectina 1 de <i>Ulex europaeus</i>
UEA-II	Lectina 2 de <i>Ulex europaeus</i>
UI	Unidades internacionais
UH	Unidade de hemaglutinação
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indoil- β -D-galactosídeo

RESUMO

O gene *conbr* codificando a pre-pro-ConBr foi expresso em células de *Escherichia coli* BL21(λ DE3) transformadas com o plasmídeo pET*conbr* e induzidas pelo IPTG 1 mM. A expressão da lectina foi indicada pelo aparecimento de uma banda protéica com massa molecular aparente de 37 kDa após a indução da expressão com IPTG 1 mM, por ensaios de PAGE-SDS. A rConBr foi sintetizada como uma proteína de fusão contendo uma cauda adicional de seis resíduos de Histidina em sua porção N-terminal, o que tornou possível sua purificação por cromatografia de afinidade em níquel imobilizado. A lectina recombinante foi mantida exclusivamente em corpos de inclusão insolúveis no citoplasma bacteriano, atingindo uma produção de 15-30 mg/litro de meio de cultivo. A rConBr foi reconhecida imunologicamente por anticorpos policlonais anti-ConBr, e apresentou uma seqüência N-terminal homóloga a do precursor da ConBr, indicando que a bactéria não é capaz de realizar nenhum processamento co- e pós-traducional, que ocorre nas células do vegetal. Entretanto mostrou ser potencialmente ativa ao ligar resíduos de carboidratos quando submetida à cromatografias de afinidade em colunas de Sephadex G-50, Sephadex G-75 e Manose-Agarose, aglutinar eritrócitos de coelho tratados com proteinases (bromelaína, papaína e tripsina), e induzir respostas inflamatórias em ratos. Assim como a ConBr nativa, a rConBr induziu a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos, induziu o desenvolvimento de edema de pata em rato e causou a degranulação de mastócitos peritoneais murinos, com conseqüente liberação de histamina. Entretanto, a rConBr foi menos potente na indução de todas as atividades biológicas testadas, quando comparada com a ConBr nativa. De acordo com os resultados obtidos podemos sugerir que a ocorrência de processamentos co- e pós-traducionais é necessária para produzir uma lectina com atividade biológica plena. Dessa maneira, a remoção do peptídeo sinal, do peptídeo ligante e da extensão C-terminal é imprescindível para produzir uma lectina com uma conformação espacial biologicamente ativa.

ABSTRACT

ConBr is a D-glucose/D-mannose binding lectin isolated from *Canavalia brasiliensis* seeds. Like ConA, ConBr is synthesized during seed development as a pre-pro-lectin which undergoes a complex series of post-translational events to produce the mature lectin. The pre-pro-ConBr was expressed in *E. coli* using the pET15b expression vector. The recombinant lectin (rConBr) was expressed by growing the bacteria in the presence of isopropyl β -D-thiogalactopyranoside. All the recombinant lectin was found in an insoluble aggregated form as inclusion bodies. After solubilization of the inclusion bodies with 6M guanidine hydrochloride, rConBr was purified to homogeneity under denaturing conditions using Ni^{2+} affinity chromatography. The recombinant lectin, obtained at a yield of 15 - 30 mg/l culture, had a higher molecular mass (37 kDa) than the native lectin (30 kDa) as estimated by SDS-PAGE and Western blot analyses, showing that the pre-pro-ConBr is not processed in *E. coli* cells. The identity of the expressed protein as the unprocessed pre-pro-ConBr was confirmed by N-terminal protein sequencing. The recombinant lectin was able to bind carbohydrates, to agglutinate rabbit erythrocytes and to induce pro-inflammatory effects in rats and histamine release from rat mast cells. However, rConBr was far less potent than the native lectin regarding its biological activities. Therefore, the complex post-translational events that takes place in the plant during ConBr biosynthesis seem to be necessary to produce a thoroughly active lectin.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Definições e considerações gerais

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas, de origem não imune, que apresentam a propriedade comum de reconhecimento específico e ligação reversível a resíduos de carboidratos, sem alterar a estrutura química dos mesmos. Interagem com glicoconjugados de superfície celular, podendo ou não determinar a formação de ligações cruzadas entre células adjacentes, levando-as a aglutinação.

A primeira descrição de lectinas ocorreu a mais de um século, quando Hermann Stillmark, em 1888, demonstrou a aglutinação de eritrócitos de animais pelo extrato de sementes de mamona (*Ricinus communis*). Ele denominou a substância responsável pela atividade hemaglutinante de ricina (SHARON & LIS, 1989). Landsteiner, em 1908, reconheceu ser esta atividade espécie-específica (PUSZTAI & BARDOCZ, 1995), e devido ao alto grau de especificidade por eritrócitos humanos de diferentes grupos sanguíneos, BOYD & SHAPLEIGH (1954), sugeriram a denominação lectinas (do latim *legere*, escolher), para estas proteínas.

Desde a descoberta do fator hemaglutinante em *Ricinus communis*, centenas de lectinas têm sido isoladas e caracterizadas em relação à sua especificidade por carboidratos, estrutura molecular e propriedades biológicas e físico-químicas. Estas proteínas encontram-se amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em animais, vegetais, bactérias, bolores, leveduras, algas, protozoários e vírus (PUSZTAI, 1991).

GOLDSTEIN *et al.* (1980) e LIENER *et al.* (1986), ao definirem a classe das lectinas, consideraram como pré-requisito a existência de mais de um sítio de ligação a açúcar, excluindo assim várias classes de proteínas monovalentes e enzimas. A definição mais recente conferida às lectinas tem como única exigência a presença de pelo menos um domínio sem atividade catalítica, que se ligue reversível e especificamente a mono ou oligossacarídeos (PEUMANS & VAN DAMME, 1995a). Desta forma, são consideradas como lectinas muitas proteínas com diferentes propriedades de aglutinação e precipitação. Com base em suas estruturas moleculares, as lectinas são divididas em três grandes grupos: merolectinas, hololectinas e quimerolectinas (FIGURA 1).

Merolectinas são proteínas de pequeno tamanho, formadas por uma única cadeia polipeptídica, possuindo apenas um sítio de ligação a carboidratos. Desta forma, são incapazes de precipitar glicoconjugados ou aglutinar células. A heveína e as proteínas monoméricas de orquídeas que ligam manose são exemplos de lectinas pertencentes a este grupo.

O grupo das hololectinas compreende proteínas que apresentam dois ou mais sítios de ligação a carboidratos, os quais são idênticos ou muito homólogos. São capazes de precipitar glicoconjugados e de aglutinar células, e compreende todas as lectinas de plantas já conhecidas.

As proteínas que apresentam, além do sítio de ligação a carboidratos, um sítio não relacionado, com atividade catalítica bem definida (ou outra atividade biológica), o qual tem atuação independente daquele, são classificadas como quimerolectinas. Dependendo do número de sítios de ligação a carboidratos, estas proteínas podem atuar como hololectinas ou merolectinas. Como exemplo temos: RIP's (proteínas inativadoras de ribossomos) do tipo 2, com dois sítios de ligação a carboidratos e capacidade de aglutinar células; e, quitinases de plantas da classe I, com apenas um sítio de ligação à quitina,

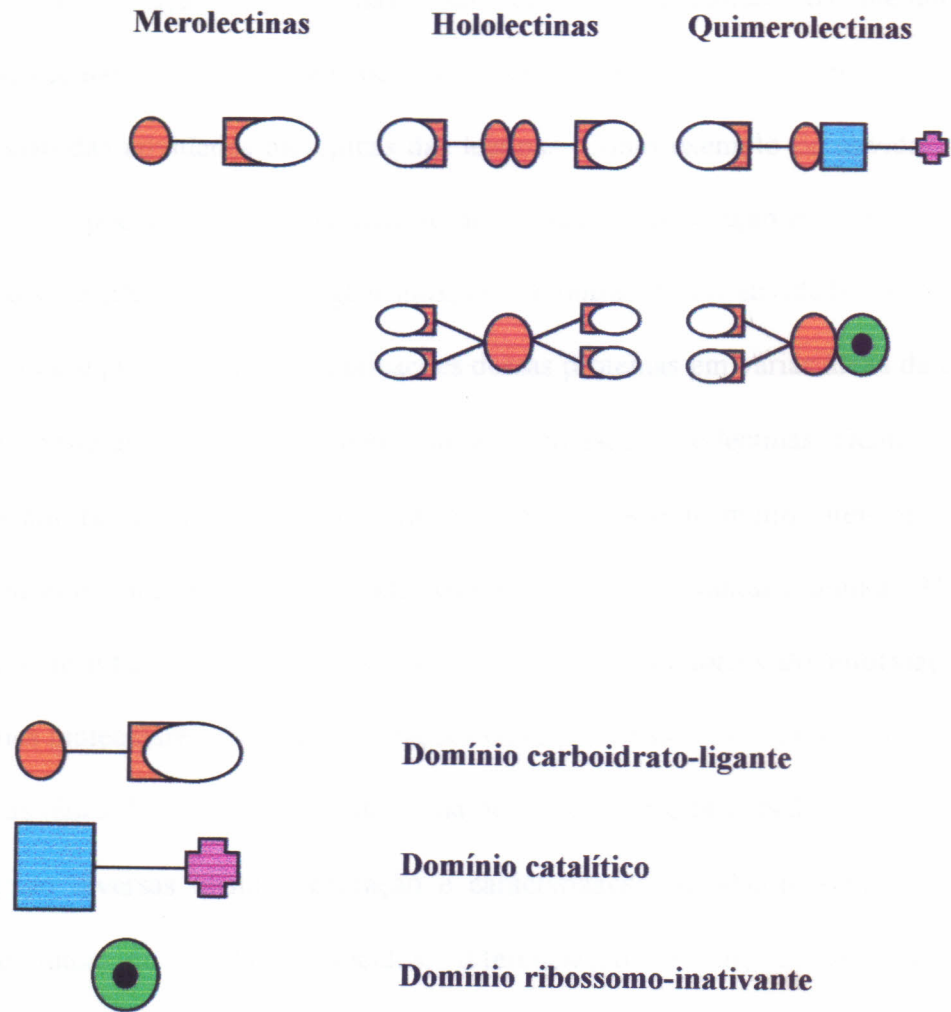


FIGURA 1 - Representação esquemática de lectinas: Merolectinas, Hololectinas e Quimerolectinas. Segundo PEUMANS & VAN DAMME, 1995a.

consequentemente, incapazes de provocar aglutinação.

A interação das lectinas com receptores glicídicos da membrana celular (glicoproteínas e glicolipídios) induz uma variedade de mudanças na célula, que são a expressão das atividades biológicas das lectinas. Como exemplo de atividades biológicas de lectinas, podemos citar a aglutinação de células, a estimulação mitogênica de linfócitos, a toxicidade sobre células e organismos, dentre outras. Essas atividades biológicas servem como a base para as múltiplas aplicações dessas proteínas em várias áreas da ciência. Com efeito, existe atualmente um grande interesse no estudo de lectinas. Dentre as razões que justificam tal interesse está o fato das lectinas serem muito úteis nos estudos de carboidratos, tanto em solução como componentes da membrana celular. Além disso, os estudos de interação das lectinas com carboidratos têm fornecido informações sobre os detalhes moleculares precisos das reações entre proteínas e carboidratos. Desta maneira, as lectinas têm sido ferramentas valiosas na pesquisa biológica e médica, sendo aplicadas em áreas tão diversas quanto separação e caracterização de glicoproteínas e glicolipídios, histoquímica de células e tecidos, diferenciação celular, tipagem de bactérias e fracionamento de linfócitos e células da medula óssea para transplante. Lectinas também são usadas na estimulação de linfócitos para se determinar o estado imunológico de pacientes, na análise cromossômica em genética humana e para a produção de linfocinas (SHARON & LIS, 1989; PUSZTAI, 1991; PEUMANS & VAN DAMME, 1995a e b).

1.2 Lectinas de origem vegetal

Mesmo com o crescente interesse em lectinas animais, estas proteínas têm sido mais estudadas em plantas (CAVADA *et al.*, 1993). Hoje, centenas de lectinas de origem vegetal já estão purificadas e bem caracterizadas, e este número vem aumentando

rapidamente (SHARON, 1993). Os grupos mais estudados são as algas marinhas e as plantas superiores, notadamente as espécies pertencentes a divisão Angiospermae (Classes Monocotiledoneae e Dicotiledoneae).

Apesar de mais de um século de estudos, nenhuma resposta conclusiva tem sido dada a questão da função das lectinas nos vegetais (PEUMANS & VAN DAMME, 1995b). Entre muitos papéis sugeridos (ETZLER, 1986), o mais aceito é que estas proteínas estão envolvidas com os processos de defesa da planta, principalmente no que se refere à proteção dos tecidos vegetais contra o ataque de insetos fitófagos e animais herbívoros (PEUMANS & VAN DAMME, 1995a), e possivelmente contra microrganismos patogênicos (CHRISPEELS & RAIKHEL, 1991). O fato de muitas lectinas vegetais possuírem propriedades inseticidas, além de ser uma evidência da sua provável função na planta como proteína de defesa, tem possibilitado o uso dos genes dessas proteínas no desenvolvimento de variedades transgênicas com uma maior resistência a pragas (SCHULER *et al.*, 1998). Nas leguminosas em particular, evidências experimentais têm demonstrado que as lectinas expressas na raiz atuam como mediadores da simbiose entre bactérias fixadoras de nitrogênio do gênero *Rhizobium* e as raízes da planta.

Em muitas plantas, as sementes maduras representam a maior fonte de lectinas (ETZLER, 1986). Nas sementes de Leguminosas, por exemplo, as lectinas chegam a constituir até 10 % do total das proteínas (ETZLER, 1985; SHARON & LIS, 1990), estando localizadas principalmente nos corpos protéicos das células do parênquima cotiledonar (BOISSEAU *et al.*, 1984). Já as lectinas de gramíneas estão presentes nas sementes em pequenas concentrações, constituindo cerca de 0,1 a 0,2 % do total das proteínas (STINISSEN & PEUMANS, 1985).

Apesar da sua abundância nas sementes de muitas plantas, muitas lectinas têm sido descritas em vários tecidos vegetativos, tais como raízes (*Pisum sativum*, DIAZ *et al.*,

1984), tubérculos (*Helianthus tuberosus*, GUILLOT *et al.*, 1991), cascas (*Sambucus nigra*, BROEKAERT *et al.*, 1984), folhas (*Listera ovata*, VAN DAMME *et al.*, 1987a), frutos (*Musa paradisiaca*, KOSHTE *et al.*, 1990), bulbos (*Galanthus nivalis*, VAN DAMME *et al.*, 1987b) e rizomas (*Urtica dioica*, PEUMANS *et al.*, 1984).

Algumas plantas possuem lectinas distintas no mesmo tecido ou em tecidos diferentes, ou ainda uma única lectina distribuída em várias partes da mesma planta. As sementes de *Ulex europaeus* possuem duas lectinas, UEAI, específica para L-fucose e UEAI, específica para N-acetilgalactosamina (OSAWA & MATSUMOTO, 1972). Já em *Sophora japonica*, as sementes, as folhas e a casca possuem lectinas similares, porém não idênticas (HANKINS *et al.*, 1988). No caso de *Galanthus nivalis*, a mesma lectina é encontrada nas raízes, bulbos, caules, folhas e várias partes das flores (VAN DAMME & PEUMANS, 1990).

As lectinas vegetais representam uma classe de proteínas com uma grande heterogeneidade estrutural, não havendo propriedades estruturais comuns a todas elas, exceto o fato de serem proteínas, de possuírem pelo menos um domínio de ligação a carboidratos e consistirem de subunidades ou protômeros (SHARON & LIS, 1989).

A massa molecular varia de 3,5 - 4,0 kDa para a Crotalarina, uma das lectinas das sementes de *Crotalaria striata* (SIKDAR *et al.*, 1990) até 480 kDa para a lectina de rizomas de *Aegopodium podagraria* (PEUMANS *et al.*, 1985).

O número de subunidades varia de 1, no caso da lectina de rizomas de *Urtica dioica* (PEUMANS *et al.*, 1984), até 10, no caso da lectina I de sementes de *Araucaria angustifolia* (DATTA *et al.*, 1991). Contudo, a maioria das lectinas isoladas consistem de 2 ou 4 subunidades (SHARON & LIS, 1989) e mais raramente de 6, no caso da lectina II de *Araucaria angustifolia* (DATTA *et al.*, 1991) e de 8 subunidades, como nas lectinas de rizomas de *Aegopodium podagraria* (PEUMANS *et al.*, 1985) e de tubérculos de

Colchicum autumnale (PEUMANS *et al.*, 1986).

Nas lectinas oligoméricas, as subunidades podem ser iguais ou diferentes e cada uma delas possui um único sítio de ligação a carboidratos, com a mesma especificidade (SHARON & LIS, 1989). Tubérculos de *Colchicum autumnale* possuem uma lectina octamérica de 100 kDa, composta de 4 subunidades de 15 kDa e 4 subunidades de 10 kDa (PEUMANS *et al.*, 1986). Por outro lado, sementes de *Araucaria angustifolia* possuem 2 lectinas (I e II), ambas com 200 kDa. A lectina I é composta de 10 subunidades iguais, cada uma com massa molecular aparente de 20 kDa, enquanto que a lectina II é composta de 6 subunidades iguais, cada uma com massa molecular aparente de 34 kDa (DATTA *et al.*, 1991).

As subunidades são frequentemente compostas por uma única cadeia polipeptídica, porém algumas lectinas possuem subunidades formadas por 2 cadeias polipeptídicas. Como exemplo deste último caso temos as lectinas de leguminosas da tribo Viciae (Gêneros *Pisum*, *Vicia*, *Lathyrus* e *Lens*). As lectinas de Viciae são dímeros formados por duas subunidades iguais e cada subunidade é constituída por uma cadeia α e uma cadeia β mantidas por ligações não covalentes (SHARON & LIS, 1989; EINSPAHN *et al.*, 1986).

Muitas lectinas vegetais podem ser encontradas em diferentes formas moleculares ou isolectinas. A ocorrência destas isoformas pode ser determinada por pequenas diferenças em suas seqüências de aminoácidos, como também devido a modificações na cadeia polipeptídica. As sementes de *Datura stramonium* possuem uma lectina dimérica formada por duas subunidades diferentes, A (32 kDa) e B (28 kDa). Estas subunidades se associam originando 3 isolectinas com as seguintes estruturas: AA, AB e BB (BROEKAERT *et al.*, 1987).

Apesar da diversidade estrutural encontrada nas lectinas de plantas, é possível

agupá-las em famílias de acordo com o seu grau de homologia (SHARON, 1993; RINI, 1995). A análise da estrutura tridimensional tem confirmado que os membros de cada uma destas famílias apresentam fatores estruturais fundamentais (WEIS & DRICKAMER, 1996). No Reino Vegetal duas famílias principais têm sido demonstradas, a família das lectinas de gramíneas, também conhecidas como lectinas que se ligam a quitina, e a família das lectinas de leguminosas (CAVADA *et al.*, 1993).

Uma terceira grande família de lectinas homólogas foi reconhecida mais recentemente e é encontrada em várias monocotiledôneas, principalmente em espécies das famílias Amarylidaceae, Alliaceae, Araceae e Orchidaceae. As lectinas dessa família apresentam como característica comum uma especificidade exclusiva para resíduos de D-manose e, diferentemente das lectinas encontradas em leguminosas, não reconhecem D-glicose, assim estas lectinas são conhecidas como manose específicas. Tem sido demonstrado que este grupo de proteínas constituem na realidade uma mistura complexa de isoformas, com a mesma especificidade por carboidratos. Devido as suas propriedades características, as lectinas de amarilidáceas têm sido bastante utilizadas na pesquisa de glicoconjugados, no isolamento de anticorpos monoclonais do tipo IgM e na inibição da infecção de células por retrovírus e citomegalovírus (VAN DAMME & PEUMANS, 1991).

1.3 Lectinas de leguminosas: uma família de proteínas homólogas

As lectinas de leguminosas constituem uma das maiores e melhor caracterizadas famílias de lectinas de plantas. Geralmente são formadas por duas ou quatro subunidades de 25-30 kDa, cada uma delas contendo um único sítio de ligação a carboidratos com a mesma especificidade. Para se ligarem a carboidratos, geralmente requerem a presença de

íons cálcio e manganês.

As principais fontes de lectinas nas leguminosas são as sementes quiescentes onde constituem até 10 % do total das proteínas. Estão localizadas nos cotilédones, em organelas conhecidas como corpos protéicos, juntamente com as proteínas de reserva da semente (ETZLER, 1986). Entretanto, lectinas têm sido encontradas também em outras partes da planta, tais como folhas, flores, raízes e casca (ETZLER, 1986; PEUMANS & VAN DAMME, 1995a).

As lectinas de leguminosas compartilham muitas características estruturais, tais como seqüência de aminoácidos, estrutura secundária e conformação tridimensional (CAVADA *et al.*, 1993), embora apresentem diferenças em suas especificidades por carboidratos, modificações co- e pós-traducionais e estrutura quaternária. A homologia observada entre as estruturas primárias das lectinas de leguminosas sugere que esta família de proteínas divergiu a partir de uma seqüência ancestral comum.

1.3.1 Estrutura molecular

A maioria das lectinas de leguminosas são constituídas de 2 ou 4 subunidades (SHARON & LIS, 1989), iguais ou diferentes, com massa molecular variando de 25 a 30 kDa. Cada uma das subunidades possui um único sítio de ligação a carboidratos, com a mesma especificidade (SHARON & LIS, 1989). As subunidades, freqüentemente mantidas por forças não covalentes, são em geral compostas por uma única cadeia polipeptídica, porém algumas lectinas possuem subunidades formadas por 2 cadeias polipeptídicas. Um exemplo deste último grupo são as lectinas da tribo Viciae (gêneros *Pisum*, *Vicia*, *Lathyrus* e *Lens*), as quais possuem cadeias polipeptídicas leves denominadas de α (5 a 7 kDa) e cadeias pesadas denominadas de β (15 a 19 kDa). Estas lectinas são dímeros

formados por duas subunidades iguais e cada subunidade é constituída por uma cadeia α e uma cadeia β mantidas por ligações não covalentes (SHARON & LIS, 1989; EINSPAHR *et al.*, 1986).

Um caso singular é o da ConA, tetrâmero composto por uma mistura de subunidades intactas formadas por uma única cadeia polipeptídica com 237 aminoácidos e de subunidades fragmentadas, nas quais a mesma cadeia polipeptídica está dividida em dois fragmentos, por não ter havido a formação de uma ligação peptídica entre os resíduos 118 e 119 (CHRISPEELS *et al.*, 1986). Apesar de não estarem ligados covalentemente, os dois fragmentos, denominados beta e gama, são mantidos juntos por ligações não covalentes e formam um protômero cuja estrutura tridimensional é essencialmente a mesma da subunidade formada pela cadeia polipeptídica íntegra, sem descontinuidade na sua estrutura primária (BECKER *et al.*, 1975 ; SHARON & LIS, 1989). Os fragmentos beta e gama são característicos das lectinas de leguminosas da subtribo Diocleinae, como *Dioclea grandiflora* (MOREIRA *et al.*, 1983), *Canavalia brasiliensis* (MOREIRA & CAVADA, 1984), *Cratylia floribunda* (OLIVEIRA *et al.*, 1991) e *D. guianensis* (VASCONCELOS *et al.*, 1991).

Muitas lectinas de leguminosas podem ser encontradas em diferentes formas moleculares ou isolectinas. A lectina de *Phaseolus vulgaris* (PHA) é formada por dois tipos de subunidades denominadas E (31,7 kDa) e L (29,9 kDa), produtos de genes distintos. Estas duas subunidades se associam em várias proporções dando origem a uma família de 5 isolectinas tetraméricas: E₄, E₃L, E₂L₂, EL₃ e L₄ (FELSTED *et al.*, 1981; SHARON & LIS, 1989).

1.3.2 Composição de aminoácidos e carboidratos

As lectinas de leguminosas são, caracteristicamente, ricas em aminoácidos ácidos e hidroxilados, os quais podem perfazer até mais de 30% do conteúdo de aminoácidos e são pobres ou destituídas de aminoácidos sulfurados (LIS & SHARON, 1981).

Com poucas exceções, como por exemplo a Con A e a lectina de amendoim (*Arachis hypogaea*) que são destituídas de açúcares ligados covalentemente, a maior parte das lectinas de leguminosas são glicoproteínas apresentando cerca de 10 % de carboidratos ligados através de ligação N-glicosídica a um resíduo de asparagina. Há dois tipos de glicosilação nas lectinas de leguminosas: uma contendo N-acetilglicosamina e manose, encontrada tanto em vegetais como em animais, e outra consistindo de um pentassacarídeo que possui xilose com ligação do tipo β 1 \rightarrow 2 podendo ou não apresentar L-fucose ligada através de ligação do tipo α 1 \rightarrow 3, na sua região central. Esta estrutura só é encontrada em vegetais (SHARON & LIS, 1990). A PHA apresenta os dois tipos de oligossacarídeos na mesma molécula (STURM & CHRISPELLS, 1986). A porção glicídica parece não ser requerida para a ligação a carboidratos ou para atividade biológica da lectina. Como exemplo temos que a PHA-L recombinante não glicosilada tem a mesma atividade leucoaglutinante e mitogênica da lectina nativa glicosilada (HOFFMAN & DONALDSON, 1985). A posição de glicosilação entre as lectinas homologas não é muito conservada. A favina (lectina de *Vicia faba*) é glicosilada na posição Asn-169, a SBA (lectina de soja) na posição Asn-75, a DBA (aglutinina de sementes de *Dolichos biflorus*) na Asn-114, a LTA (lectina de *Lotus tetragonolobus*) na Asn-4, a UEA-I (lectina 1 de *Ulex europeus*) na Asn-10 e 116 e a UEA-II (lectina 2 de *Ulex europeus*) nas posições Asn-118 e 245 (KONAMI *et al.*, 1991a).

1.3.3 Interação com carboidratos

As lectinas de plantas variam amplamente em sua especificidade por carboidratos, de forma que todos os açúcares da superfície celular já descritos, podem ser reconhecidos por alguma destas proteínas (PEUMANS & VAN DAMME, 1995b). Dessa maneira, o conhecimento de suas especificidades por açúcares tem facilitado a purificação de um número cada vez maior de lectinas, através da utilização de matrizes cromatográficas com açúcares imobilizados.

A maneira mais simples e mais utilizada para a detecção de lectinas é a verificação de sua habilidade em aglutinar hemácias e/ou precipitar glicoconjugados. Nestes ensaios, os eritrócitos podem ser utilizados em sua forma nativa, ou tratados com diferentes enzimas proteolíticas, como papaína, bromelaína, e tripsina, ou neuraminidase, que em alguns casos determina um aumento na sensibilidade de detecção. Essas duas propriedades das lectinas são exploradas no estudo da sua interação com carboidratos. De fato, a determinação da especificidade por carboidratos das lectinas é comumente realizada através de um ensaio de inibição por haptenos. Nestes experimentos, diferentes monossacarídeos, oligossacarídeos e/ou glicopeptídeos são avaliados com relação à sua habilidade em inibir a atividade hemaglutinante ou a precipitação de polissacarídeos (ou glicoconjugados) pela lectina (SHARON & LIS, 1989).

A ligação das lectinas a carboidratos pode ser também examinada por métodos físico-químicos, como microcalorimetria, equilíbrio de diálise, espectrofotometria, fluorimetria e ressonância nuclear magnética. Por estes métodos, a constante de associação e outros parâmetros termodinâmicos e cinéticos da reação podem ser medidos. As constantes de associação entre lectinas e monossacarídeos variam de 10^3 a $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, enquanto que entre lectinas e oligossacarídeos estão na faixa de 10^4 a 10^7 M^{-1} (SHARON

& LIS, 1989). A reação entre lectinas e carboidratos é essencialmente exergônica (POOLA & KELLA, 1986). LOONTIENS *et al.* (1977) determinaram um valor de - 6,18 Kcal/mol para a variação de energia livre padrão da reação de associação entre Con A e 4-metilumbeliferil α -D-manopiranosídeo.

Segundo MAKELA (1957), as lectinas podem ser classificadas de acordo com sua especificidade por monossacarídeos, embora seja conhecido sua inibição por oligossacarídeos complexos. Assim, Makela classificou os monossacarídeos inibidores da atividade hemaglutinante das lectinas em quatro grupos, de acordo com a configuração relativa dos carbonos C3 e C4 do anel piranosídico ou furanosídico: L-fucose (grupo I), galactose/N-acetilgalactosamina (grupo II), glicose/manose (grupo III) e idose/gulose/L-glicose/L-xilose (grupo IV). Posteriormente dois novos grupos de monossacarídeos foram estabelecidos: N-acetil-glicosamina e ácido siálico. Até agora não foram encontradas lectinas que sejam capazes de reconhecer os açúcares do grupo IV de Makela.

As classes encontradas em leguminosas são: glicose/manose (ConA, lectina de *Canavalia ensiformis*), galactose/N-acetilgalactosamina (lectina de *Lonchocarpus capassa* e de amendoim), N-acetilglicosamina (lectina de *Cytisus sessilifolius*), L-fucose (lectinas de *Lotus tetragonolobus* e *Ulex europeus*) e oligossacarídeos complexos. A lectina de *Robinia pseudoacacia*, por exemplo, não interage com monossacarídeos, somente com oligossacarídeos. As lectinas que possuem uma maior afinidade por oligosacarídeos reagem frequentemente com o monossacarídeo da extremidade não-redutora, apesar de algumas também reconhecerem monossacarídeos que ocupam posições internas (SHARON & LIS, 1989). Muitas lectinas toleram variações no carbono 2 do monossacarídeo ao qual elas se ligam. Por exemplo, as lectinas específicas para manose usualmente também reagem com glicose e, em menor extensão, com N-acetil-glicosamina, como é o caso de algumas lectinas do Grupo III (GOLDSTEIN & PORETZ, 1986;

SHARON & LIS, 1989; SHARON & LIS, 1990). As lectinas isoladas de bulbos de *Amaryllidaceae* e *Alliaceae*, por outro lado, possuem uma especificidade exclusiva por manose (VAN DAMME & PEUMAN, 1991). Variações no carbono 3 são também toleradas por algumas lectinas. Entretanto, a configuração do carbono 4 é crucial, desde que lectinas específicas para glicose/manose não reagem com galactose e vice-versa (SHARON & LIS, 1990). Estas proteínas podem também apresentar especificidade anomérica, reconhecendo preferencialmente um anômero α ou β de um respectivo monossacarídeo (SHARON & LIS, 1990). A Con A e as lectinas de *Griffonia simplicifolia* (GS4) e *Lotus tetragonolobus* (LTA) exibem uma pronunciada especificidade para os anômeros alfa de manose (ou glicose), de galactose e de L-fucose, respectivamente. Por outro lado, a lectina de *Glycine max* é completamente destituída de especificidade anomérica (SHARON & LIS, 1989).

As bases estruturais para o reconhecimento seletivo de açúcares por lectinas de leguminosas têm sido investigadas por cristalografia de raios-X, utilizando-se cristais crescidos na presença do açúcar inibidor.

Sabe-se que os mecanismos de reconhecimento a carboidratos envolvem diversos fatores estruturais. Entretanto, a formação de pontes de hidrogênio entre o açúcar e a proteína é uma característica essencial da interação lectina-carboidrato. Em cada caso de lectina de leguminosa estudado observou-se que são formados sete pontes de hidrogênio entre o açúcar e a proteína e que, algumas destas pontes são mediadas por moléculas de água (SHARON, 1993).

Apesar de altamente polares e solvatados, os açúcares apresentam significativa região apolar, formada por prótons e carbonos alifáticos. As interações hidrofóbicas e de van der Waals entre esta região do açúcar e aminoácidos aromáticos, fornecem uma significativa energia à interação lectina-açúcar (DRICKAMER, 1995).

Certas lectinas interagem melhor com oligossacarídeos. Este fato tem uma grande importância biológica e explica os efeitos destas proteínas em diversos sistemas, como por exemplo na indução da proliferação celular através do reconhecimento da porção glicídica de glicoproteínas de membrana. Um bom exemplo do caráter seletivo da ligação lectina-oligossacarídeo é o fato de lectinas do gênero *Dioclea*, que apresentam a mesma especificidade por monossacarídeos (glicose/manose), apresentarem atividades mitogênicas tão diferentes, ou seja, especificidade fina por carboidratos diferentes (BARRAL-NETTO *et al.*, 1992). Existem atualmente duas explicações para este fato. A primeira é a evidência, obtida através da análise de cristais formados em presença de açúcares, que as lectinas apresentam os chamados "sítios estendidos". Estes sítios são pontos de contato na superfície da lectina com outros resíduos de açúcar além do terminal. Estas interações são feitas através de pontes de hidrogênio diretas ou intermediadas por água, forças de van der Waals e interações hidrofóbicas entre o açúcar e resíduos de aminoácidos da proteína (DRICKAMER, 1995). Recentemente foi demonstrado, através de dados cristalográficos, que a especificidade da ConA para um trimanosídeo biantenário ($\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6(\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3)\text{Man}$) componente de muitas glicoproteínas se dá através destes sítios estendidos. Como resultado, temos a interação da lectina com as três manoses da molécula, tanto através do sítio de ligação a carboidratos convencional, como também através de outros pontos de contato na superfície protéica (NAISMITH & FIELD, 1996). A presença destes sítios secundários também foi detectada em cristais da lectina de *Lathyrus ochrus* (BOURNE *et al.*, 1994).

A multivalência também pode explicar a elevada e seletiva afinidade de lectinas para oligossacarídeos, e constitui uma nova dimensão da especificidade na interação com moléculas em sistemas biológicos. Sabe-se que complexos bi-, tri- e tetra-antenários agindo como ligantes multivalentes, oligomerizam lectinas e, em solução, podem precipitá-

las. A oligomerização de lectinas resulta portanto no aparecimento de múltiplos complexos entrelaçados homogêneos desta proteína com glicoproteínas ou carboidratos (BREWER, 1996; SHARON & LIS, 1990; WEIS & DRICKAMER, 1996; BHATTACHARYYA *et al.*, 1989).

1.3.4 Estrutura primária

A determinação da seqüência de aminoácidos de várias lectinas de leguminosas tem sido realizada por técnicas convencionais de seqüenciamento de proteínas, baseadas na degradação de Edman, ou por técnicas de biologia molecular, através da dedução da seqüência de aminoácidos a partir da seqüência de nucleotídeos do DNA complementar (cDNA) ao mRNA da lectina.

A família Leguminosae é formada de três sub-famílias: Papilionoideae, Caesalpinoideae e Mimosoideae. Entretanto, somente as sub-famílias Papilionoideae e Caesalpinoideae apresentam lectinas com estruturas primárias determinadas. A sub-família Caesalpinoideae é a menos estudada, com apenas três lectinas seqüenciadas, uma de *Bauhinia purpurea* e duas de *Griffonia simplicifolia*. Todas as demais estruturas primárias disponíveis são de lectinas isoladas de espécies da sub-família Papilionoideae. Como exemplo das lectinas já seqüenciadas completamente, podemos citar as de amendoim, *Arachis hypogaea* (RODRIGUEZ-ARANGO *et al.*, 1992), *Bauhinia purpurea* (KUSUI *et al.*, 1991), *Canavalia ensiformis* (CUNNINGHAM *et al.*, 1975), *Cytisus scoparius* (KONAMI *et al.*, 1992), *Dioclea grandiflora* (RICHARDSON *et al.*, 1984a; AINOUZ *et al.*, 1987), *Dolichos biflorus* (SCHNELL & ETZLER, 1987), *Erythrina corallodendron* (ADAR *et al.*, 1989), *Lathyrus ochrus* (RICHARDSON *et al.*, 1984b; YARWOOD *et al.*, 1985), *Laburnum alpinum* (KONAMI *et al.*, 1991b), *Lens culinaris* (FORIERS *et al.*,

1981), *Onobrychis viciifolia* (KOUCHALAKOS *et al.*, 1984), *Pisum sativum* (HIGGINS *et al.*, 1983), *Phaseolus lunatus* (IMBRIE-MILLIGAN *et al.*, 1989), *Ulex europeus* (lectinas I e II, KONAMI *et al.*, 1991a) e *Vicia faba* (HOPP *et al.*, 1982). Estas lectinas exibem uma alta homologia quando suas seqüências de aminoácidos são apropriadamente alinhadas e deleções em determinadas posições são introduzidas. As cadeias beta das lectinas da tribo Vicieae (gêneros *Lathyrus*, *Lens*, *Pisum* e *Vicia*) são alinhadas ao longo da seqüência da extremidade N-terminal das lectinas que possuem uma só cadeia polipeptídica, seguindo-se então a cadeia alfa, que desta maneira é alinhada com a extremidade C-terminal. Por outro lado, a homologia das lectinas da subtribo Diocleinae, como *C. ensiformis* (CUNNINGHAM *et al.*, 1975), *C. gladiata* (YAMAUCHI *et al.*, 1989; YAMAUCHI & MINAMIKAWA, 1990), *C. maritima* (PEREZ *et al.*, 1991), *D. grandiflora* (RICHARDSON *et al.*, 1984a; AINOUZ *et al.*, 1987) e *D. lehmanni* (PEREZ *et al.*, 1990) com as outras lectinas de Leguminosas é obtida quando essas lectinas são dispostas circularmente. Assim, o resíduo 123 das lectinas de Diocleinae é alinhado com os aminoácidos da extremidade N-terminal das outras lectinas com uma só cadeia polipeptídica. No caso das lectinas com duas cadeias polipeptídicas (tribo Vicieae), o resíduo 123 é alinhado com a extremidade N-terminal da cadeia beta, seguida da cadeia alfa (SHARON & LIS, 1990). Este tipo de homologia é denominada de homologia circular (CUNNINGHAM *et al.*, 1979) e, atualmente, é explicada pelos eventos pós-traducionais que ocorrem na Con A durante sua biossíntese (SHARON & LIS, 1990). A determinação da seqüência do cDNA da Con A revelou que a seqüência de aminoácidos do precursor da lectina não apresenta tal homologia circular com as outras lectinas, mas sim uma homologia linear (CARRINGTON *et al.*, 1985). A clivagem pós-traducional da forma precursora em dois fragmentos e a transposição e religação destes fragmentos, produzindo a lectina madura, explica a homologia circular (CARRINGTON *et al.*, 1985). Esta hipótese

foi posteriormente confirmada pelos estudos de biossíntese da Con A (CHRISPEELS *et al.*, 1986; HERMAN *et al.*, 1985)

O alto grau de homologia apresentado pelas lectinas de leguminosas é tido como indício de que estas proteínas evoluíram por divergência a partir de um ancestral comum (ROUGÉ *et al.*, 1987).

1.3.5 Estrutura tridimensional

A ConA foi a primeira lectina a ter a sua estrutura tridimensional determinada por difração de raios-X no ano de 1972 por HARDMAN e AINSWORTH a uma resolução de 2,4 Å, e posteriormente a 2,0 Å por BECKER *et al.* (1975). Subsequentemente outras lectinas tiveram as suas estruturas tridimensionais determinadas, como as de cereais, de vírus e de animais (WILSON *et al.*, 1981; WEIS *et al.*, 1991). Entretanto as de leguminosas são as mais extensivamente estudadas.

A ConA é um tetrâmero constituído por subunidades ou protômeros de 25,5 kDa. A cadeia polipeptídica está dobrada de maneira bastante compacta, gerando uma estrutura de formato elipsoidal com dimensões de 42 x 40 x 39 Å. Cerca de 51 % dos resíduos na cadeia polipeptídica estão dispostos em estrutura secundária do tipo beta. Os outros 49 % não apresentam nenhuma estrutura secundária regular (REEKE *et al.*, 1975). Os seguimentos em conformação beta, dispostos de maneira antiparalela, formam duas grandes folhas pregueadas. A folha I envolve 64 resíduos arranjados em 6 segmentos e 9 resíduos fazendo parte de pequenas alças de conexão entre os segmentos. Esta folha constitui a face posterior ou dorso da molécula. A folha II forma a face anterior do protômero contendo cerca de 57 resíduos, dispostos em 7 segmentos antiparalelos. A única região da molécula que possui uma estrutura secundária que se aproxima de uma

conformação em alfa hélice é um pequeno segmento da cadeia polipeptídica que compreende os resíduos de 81 a 84 (HARDMAN & AINSWORTH, 1972; BECKER *et al.*, 1975).

Na formação do dímero, o segmento (resíduos 117 a 124) localizado na borda inferior da folha I é posicionado ao lado do segmento correspondente da outra subunidade, de modo que as duas folhas são mantidas lado a lado, formando uma folha única com 12 segmentos e que constitui a face posterior do dímero. A interação entre as duas subunidades é mantida por pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e forças de van der Waals (HARDMAN & AINSWORTH, 1972; BECKER *et al.*, 1975; REEKE *et al.*, 1975).

Dois dímeros interagem, através de suas faces posteriores, para formar o tetrâmero com o surgimento de uma cavidade de 10 Å de diâmetro no centro da molécula. Esta cavidade é acessível a solvente e à difusão de pequenas moléculas. As forças que mantêm o tetrâmero são similares àquelas descritas para a formação do dímero (HARDMAN & AINSWORTH, 1972; BECKER *et al.*, 1975; REEKE *et al.*, 1975).

Além da ConA, várias outras lectinas de leguminosas já tiveram suas estruturas tridimensionais determinadas, como as de *Canavalia brasiliensis* (GRANGEIRO, 1996), *Pisum sativum* (EINSPAHR *et al.*, 1986), *Vicia faba* (favina; REEKE & BECKER, 1986), isolectina 4 de *Vicia villosa* (OSINAGA *et al.*, 1997), isolectinas 1 e 2 de *Lathyrus ochrus* (LOLI; BOURNE *et al.*, 1990), lectina 4 de *Griffonia simplicifolia* (GS4; DELBAERE *et al.*, 1993), lectina de *Erythrina corallodendron* (EcorL; SHAANAN *et al.*, 1991), de *Phaseolus vulgaris*, de *Phaseolus lunatus*, de *Dolichos biflorus*, da isolectina I *Ulex eropeus* (GOHIER *et al.*, 1996), *Lens culinares* (LORIS *et al.*, 1993), lectina de *Arachis hypogaea* (BANERJEE *et al.*, 1994) e lectina de soja (DESSEN *et al.*, 1995). Estas proteínas diferem na glicosilação e no número de cadeias polipeptídicas de cada

subunidade mas possuem essencialmente a mesma estrutura terciária, já bem conhecida para as lectinas de leguminosas, e como esperado pela alta homologia desta família (YOUNG & OOMEN, 1992).

À semelhança do que ocorre na ConA, o elemento estrutural predominante das subunidades das demais lectinas de leguminosas é o arranjo da cadeia polipeptídica em duas folhas β antiparalelas. A maior parte dos resíduos que não estão envolvidos nesta estrutura β estão em "loops" e em voltas que conectam as regiões de folha β . O restante dos aminoácidos não está envolvido em nenhuma estrutura secundária regular. Uma das folhas pregueadas (estrutura β) contém sete cadeias antiparalelas que segue na direção do centro do protômero enquanto a outra possui seis cadeias antiparalelas. Duas subunidades interagem através de pontes de hidrogênio e formam um dímero. Estas pontes são formadas entre a parte terminal da estrutura β de um monômero e a parte terminal da estrutura β de um segundo monômero, formando um dímero com doze cadeias de folhas pregueadas contíguas. Dois destes dímeros se combinam para formar o tetrâmero, que é estabilizado por pontes salinas, pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas. O sítio de ligação a metais e o de ligação a carboidratos ocupam a mesma posição em todas as lectinas estudadas, com pequenas variações em algumas espécies.

1.3.6 Sítios funcionais

O conhecimento das seqüências de aminoácidos das lectinas de leguminosas bem como das estruturas tridimensionais das proteínas livres e complexadas com carboidratos, metais e moléculas hidrofóbicas têm possibilitado a identificação precisa dos resíduos de aminoácidos que constituem os sítios para cada um desses ligantes. A ConA, a primeira lectina de leguminosa a ter sua estrutura primária e tridimensional determinada, tem sido a

lectina modelo nos estudos dos aspectos estruturais dos sítios funcionais.

1.3.6.1 Sítios de ligação a metais

A ligação de lectinas de leguminosas a carboidratos é dependente da presença de cátions divalentes. Estes íons participam da interação lectina-carboidrato de maneira indireta. Estas proteínas utilizam Ca^{+2} e Mn^{+2} para estabilizar o sítio de ligação e fixar a posição dos aminoácidos que interagem com o açúcar ligante. O Ca^{+2} liga-se, por coordenação, à cadeia lateral de um resíduo de asparagina bastante conservado, enquanto que sua cadeia lateral estabelece pontes de hidrogênio com o ligante. A coordenação de Ca^{+2} fixa as cadeias laterais proporcionando uma ligação ótima. Os cátions também estabilizam a arquitetura geral do sítio pela fixação do segundo elemento estrutural ou seja, naquelas que apresentam sítio estendido. O Mn^{+2} não está envolvido com nenhum resíduo que interage diretamente com o açúcar. Ao invés disto este íon fixa a posição correta do Ca^{+2} (WEIS & DRICKAMER, 1996). Portanto, para a conversão da lectina inativa na sua forma ativa a ligação dos cátions deve seguir uma ordem onde o Mn^{+2} (ou outro metal de transição) liga-se primeiro, formando-se então o sítio para Ca^{+2} , e só depois disto este segundo cátion é ligado. Estes detalhes sobre o papel dos íons na atividade de lectinas, foi investigado para a ConA, mas em outras leguminosas estes íons parecem funcionar de maneira semelhante (SHARON & LIS, 1990).

Na ConA os sítios de ligação a metais são denominados S1 e S2 e são ocupados, respectivamente, por Mn^{+2} e Ca^{+2} , estando distanciados de 4,6 Å (HARDMAN & AINSWORTH, 1976). O sítio S1 (sítio de ligação a Mn^{+2}) é formado pelos resíduos Glu8, Asp10, Asp19, His24 e duas moléculas de água. Os resíduos Val32 e Ser34 estabelecem pontes de hidrogênios com estas moléculas de água, estando assim envolvidos

indiretamente na ligação do íon Mn^{+2} . Os resíduos Asp10, Tyr12, Asn14, Asp19, e duas moléculas de água (diferentes daquelas do sítio S1) formam o sítio de ligação ao íon Ca^{+2} (sítio S2). Os resíduos Asp208 e Arg228 estabelecem pontes de hidrogênio com as duas moléculas de água do sítio S2, estando assim envolvidos indiretamente na ligação do íon Ca^{+2} . Os resíduos de asparagina 10 e 19 são ligantes comuns a ambos os sítios (HARDMAN & AINSWORTH, 1976; BECKER *et al.*, 1975)

A conformação do sítio de ligação a carboidratos somente é estabelecida quando ambos os sítios de ligação a metais encontram-se ocupados. A ocupação do sítio S1 por Mn^{+2} , na ConA desmetalizada (apo-ConA), determina uma mudança na conformação da lectina, resultando na conformação adequada do sítio S2, que poderá então ser ocupado pelo íon Ca^{+2} . O íon Ca^{+2} no sítio S2 induz uma mudança conformacional na proteína, determinando a formação do sítio de ligação a carboidratos (BROWN *et al.*, 1977).

1.3.6.2 Sítio de ligação a carboidratos

Nas lectinas de leguminosas, cada subunidade da molécula possui um sítio de ligação a carboidratos com a mesma especificidade. Na ConA, este sítio têm sido extensivamente estudado e constitui-se em uma depressão rasa localizada na superfície de cada monômero. As distâncias médias do centro do açúcar aos íons Ca^{+2} e Mn^{+2} são de 8,2 Å e 12,5 Å, respectivamente (ALTER & MAGNUSON, 1974; HARDMAN & AINSWORTH, 1972). A estrutura do sítio é formada por quatro alças (resíduos 12-14, 98-100, 207-208 e 227-228) que delimitam uma cavidade rasa, ocupada em sua base pelos dois sítios de ligação a metais. O Ca^{+2} está ligado a três das quatro alças que formam o sítio de ligação a carboidratos. Na ausência desse metal é muito provável que uma ou mais dessas alças saiam da sua posição, abolindo a ligação ao açúcar.

A estrutura do cristal do complexo entre ConA e metil α -D-manopiranosídeo, determinada por difração de raios-X, revelou que os resíduos que interagem diretamente com o sacarídeo são Tyr12, Asn14, Leu99, Tyr100, Asp208 e Arg228. Essas interações são de dois tipos: pontes de hidrogênio e contatos de van der Waals. Assim, a estrutura do cristal revelou a ocorrência de sete pontes de hidrogênio ligando os átomos O3, O4, O5 e O6 do monossacarídeo aos resíduos Asn14, Leu99, Tyr100, Asp208 e Arg228 da cadeia polipeptídica da ConA. Os resíduos Asn14 e Arg228 estão compartilhados na ligação ao íon cálcio. Além disso, ocorre ainda uma interação hidrofóbica adicional entre o monossacarídeo e o resíduo Tyr 12, também compartilhado com o íon cálcio. Não foi encontrada ponte de hidrogênio entre O1 e qualquer resíduo de aminoácido, e o grupo metil não apresenta posição fixa (DEREWENDA *et al.*, 1989; NAISMITH *et al.*, 1994).

1.3.6.3 Sítios para ligantes hidrofóbicos

Muitas lectinas possuem sítios com alta afinidade para ligar pequenas moléculas hidrofóbicas, diferentes daqueles que ligam carboidratos (ROBERTS & GOLDSTEIN, 1983).

SIPRA (1997) agrupou os sítios para ligantes hidrofóbicos em três grupos, de acordo com sua natureza. Na primeira classe estão aqueles localizados muito próximos aos sítios que ligam carboidrato, determinando que glicosídeos ou derivados de monossacarídeos hidrofóbicos ligem mais fortemente (10-50 vezes mais) à lectina, do que seus análogos não hidrofóbicos. Aqueles distantes cerca de 30 Å dos sítios para carboidratos e presentes em cada uma das subunidades, compõem a segunda classe, podendo ser exemplificados pelos que ocorrem na lectina de *Phaseolus lunatus* e na ConA. E na terceira classe estão os sítios com alta afinidade por adenina e seus derivados, sendo

encontrado apenas um sítio hidrofóbico em cada molécula de lectina.

Na Con A, o sítio presente em cada subunidade liga-se ao ácido indolacético (um hormônio vegetal do grupo das auxinas) com uma constante de associação de $7 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ (EDELMAN & WANG, 1978) e está localizado a 35 Å do sítio de ligação à carboidrato (HARDMAN & AINSWORTH, 1976). Na lectina III de *Phaseolus lunatus*, esta distância é cerca de 30 Å (KELLA *et al.*, 1984). Os resíduos de aminoácidos da Con A (BECKER *et al.*, 1975) envolvidos na formação deste sítio (Tyr54, Leu81, Leu85, Val89, Val91, Phe111, Ser113, Val179, Ile181, Phe191, Phe212 e Ile214) são altamente conservados nas demais lectinas de Leguminosas até então seqüenciadas (KONAMI *et al.*, 1991a,b,c).

Nas lectinas de *Phaseolus lunatus*, *Dolichos biflorus*, *P. vulgaris* (PHA E₄) e *Glycine max*, o sítio único por molécula possui uma alta afinidade de ligação à adenina, da ordem de 10^5 a 10^6 M^{-1} (ROBERTS & GOLDSTEIN, 1983). MALIARIK & GOLDSTEIN (1988) isolaram e seqüenciaram dois peptídeos das lectinas de *P. lunatus* (VLITYDSSTK) e de *P. vulgaris* (TTTWDFVGENAEVLITY) que ligam adenina. Estes peptídeos são alinhados em uma região da estrutura primária das lectinas de Leguminosas que é extremamente conservada, notadamente nas lectinas que reconhecidamente ligam adenina (as de *D. biflorus* e de *G. max* em adição às duas mencionadas anteriormente).

Embora o papel fisiológico dos sítios para ligantes hidrofóbicos permaneça indeterminado, sua alta afinidade por fitormônios da classe das citocininas sugere uma função protetora aos danos oxidativos e senescência da planta e de suas sementes.

1.3.7 Biossíntese e processamento

A síntese da lectina madura a partir da tradução do mRNA requer uma série de modificações pós-traducionais. A comparação das seqüências de amino ácidos codificadas

pelos produtos primários de tradução das diversas lectinas de leguminosas já clonadas, com as respectivas seqüências de aminoácidos das proteínas maduras, juntamente com estudos de marcação radioativa *in vitro* e *in vivo*, têm fornecido importantes informações sobre a biossíntese dessas proteínas. Estas investigações têm permitido a reconstituição dos eventos co- e pós-traducionais, sofridos pelo produto de tradução do mRNA, até que seja formada a proteína madura.

As lectinas de leguminosas são sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso (RER) como pre-pro-proteínas. A pre-pro-lectina possui na sua extremidade N-terminal uma seqüência de 20 a 30 resíduos de aminoácidos, denominada de peptídeo sinal, o qual é removido co-traducionalmente durante o transporte da cadeia polipeptídica nascente para o interior do RER. A forma resultante, chamada de pro-lectina ou precursor, pode ou não receber, neste momento, uma ou mais cadeias laterais de oligossacarídeos em seqüências específicas da sua estrutura (os sítios de glicosilação). A pro-lectina é então transportada para os corpos protéicos, organela onde a lectina madura (ou seja, completamente processada) irá ser estocada. Durante o transporte para os corpos protéicos, a porção glicídica dos precursores glicosilados é geralmente modificada, quando da sua passagem pelo complexo de Golgi, pela adição e/ou remoção de resíduos específicos do oligossacarídeo. Se depois de tais modificações o oligossacarídeo for removido quando da chegada da proteína aos corpos protéicos, a lectina madura será não-glicosilada, apesar de ter sido originada de um precursor glicosilado. A não remoção do oligossacarídeo resulta numa lectina madura glicosilada.

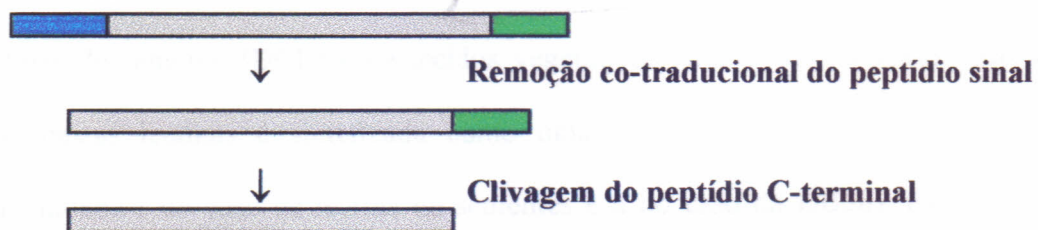
Tanto os precursores glicosilados como os não glicosilados sofrem concomitantemente, ao longo do transporte para o seu destino final, clivagens e/ou ligações proteolíticas, o que resulta numa lectina madura com uma cadeia polipeptídica menor em relação a pro-lectina. Assim, o processamento das lectinas de leguminosas é bastante

complexo. Não há exemplos de lectinas que não apresentem processamento após a remoção co-traducional do peptídeo sinal, ou que apresentem somente uma clivagem proteolítica. A conversão do produto traducional primário na lectina madura requer a remoção proteolítica de um ou mais peptídios, geralmente com 5 a 10 resíduos (VAN DAMME & PEUMANS, 1996). Vários tipos diferentes de processamento podem ser observados em lectinas de leguminosas, os mais comuns são: a) remoção de um peptídeo C-terminal; b) remoção de um peptídeo interno e na extremidade C-terminal; c) remoção de um peptídeo interno. Algumas vezes, o processo de deglicosilação do precursor se confunde com tais clivagens, no caso do peptídeo removido conter o resíduo de aminoácido ao qual o oligossacarídeo foi inicialmente ligado. Um modelo esquemático destes processamentos está representado na FIGURA 2.

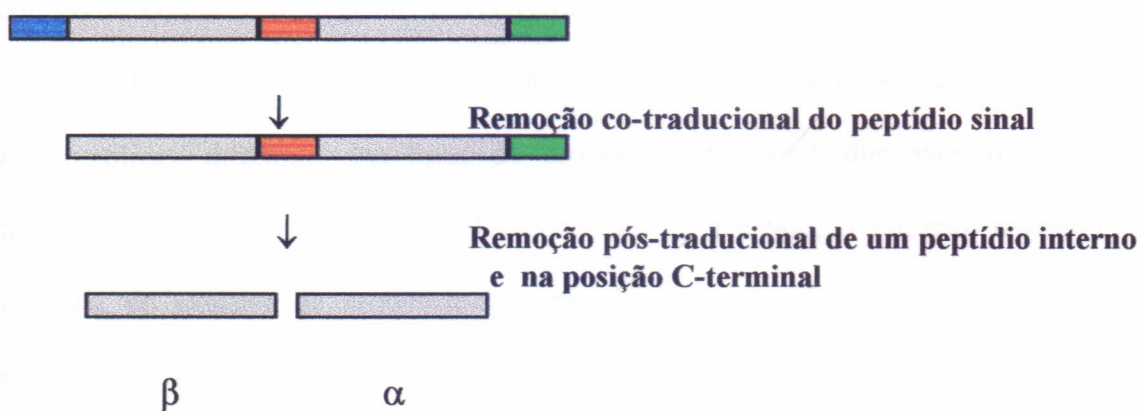
As lectinas de *Vicia faba* e *Pisum sativum*, representantes da subtribo Vicieae, são sintetizadas como pro-lectinas com massas moleculares aparentes de 29 e 25 kDa, respectivamente. A cadeia polipeptídica dos precursores sofre clivagem co- e pós-traducional, dando origem às cadeias polipeptídicas beta (21 e 17 kDa, respectivamente) e alfa (5,7 e 6 kDa, respectivamente), que constituem os dois tipos de cadeias polipeptídicas encontradas nas lectinas maduras. As cadeias beta e alfa estão ligadas covalentemente na pró-lectina, de modo que a cadeia beta ocupa a porção N-terminal seguida da cadeia alfa (HEMPERLY *et al.*, 1982; HIGGINS *et al.*, 1983).

Um tipo de processamento também encontrado nas lectinas de leguminosas compostas de uma cadeia, é observado na região C-terminal. A seqüência do cDNA de algumas lectinas indicam cadeias polipeptídicas maiores do que as encontradas pela seqüência direta da proteína. Este processamento é frequentemente impreciso, resultando em heterogeneidade que pode explicar a presença de isoformas ou mesmo múltiplas formas

a. Remoção de um peptídeo da porção C-terminal



b. Remoção de um peptídeo interno e na porção C-terminal



c. Remoção de um peptídeo interno

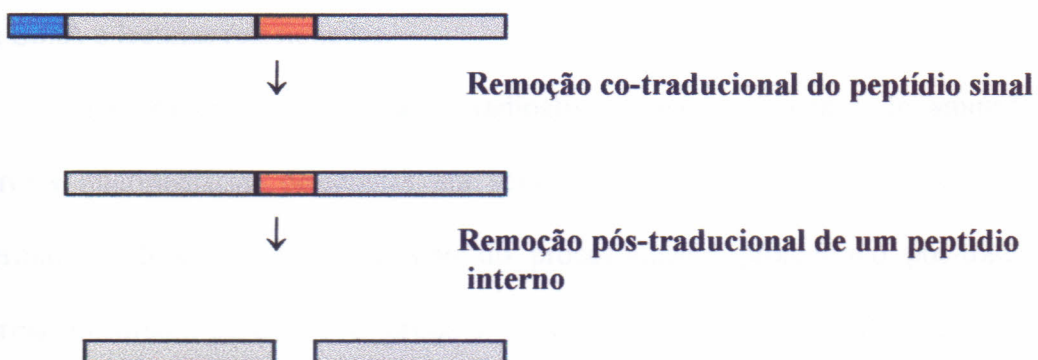


FIGURA 2 – Representação esquemática dos diferentes tipos de processamentos pós-traducionais observados durante a biossíntese das lectinas de leguminosas (VAN DAMME & PEUMANS, 1996; adaptado)

com extremidades C-terminal de tamanhos variados (YOUNG *et al.*, 1995). Um exemplo interessante de processamento pós-traducional na região C-terminal é observado nas lectinas de semente (DBL) e de tecidos vegetativos (DB58) de *Dolichos biflorus*. Cada uma destas lectinas é sintetizada como uma subunidade de massa molecular maior (subunidade I no caso da lectina de sementes e a no caso da DB58). Essas subunidades sofrem uma clivagem na porção C-terminal produzindo as cadeias II e b, respectivamente. Entretanto, essa clivagem ocorre somente em metade das subunidades, resultando na produção de lectinas heteroligoméricas (ETZLER, 1996).

Na família das lectinas de leguminosas o processamento observado na ConA é o mais complexo, diferindo dos tipos de processamento pós-traducionais relacionados anteriormente (VAN DAMME & PEUMANS, 1996). De fato, o primeiro exemplo da ocorrência de excisão de seqüências internas e religação dos fragmentos formados ("protein splicing") em proteínas foi encontrado durante o processamento pós-traducional da ConA (HERMAN *et al.*, 1985; CHRISPESLS *et al.*, 1986). A FIGURA 3 mostra de maneira esquemática os eventos co- e pós-traducionais que ocorrem durante a biossíntese da ConA e lectinas relacionadas.

Experimentos de marcação radioativa e seqüenciamento de aminoácidos das formas intermediárias detectadas em sementes em desenvolvimento de *C. ensiformis* permitiram desvendar o mecanismo do processamento proteolítico pós-traducional da forma precursora da ConA. O produto primário de tradução do mRNA da ConA é uma proteína com 290 resíduos de aminoácidos, a pre-pro-ConA. O peptídeo sinal com 30 resíduos de aminoácidos é removido co-traducionalmente durante o trânsito da cadeia polipeptídica nascente para o lúmen do RER. A forma resultante, denominada pro-ConA ou precursor, é então glicosilada pela ligação covalente de um oligossacarídeo rico em manose ao resíduo Asn153, localizado na região mediana da pro-ConA. Durante o

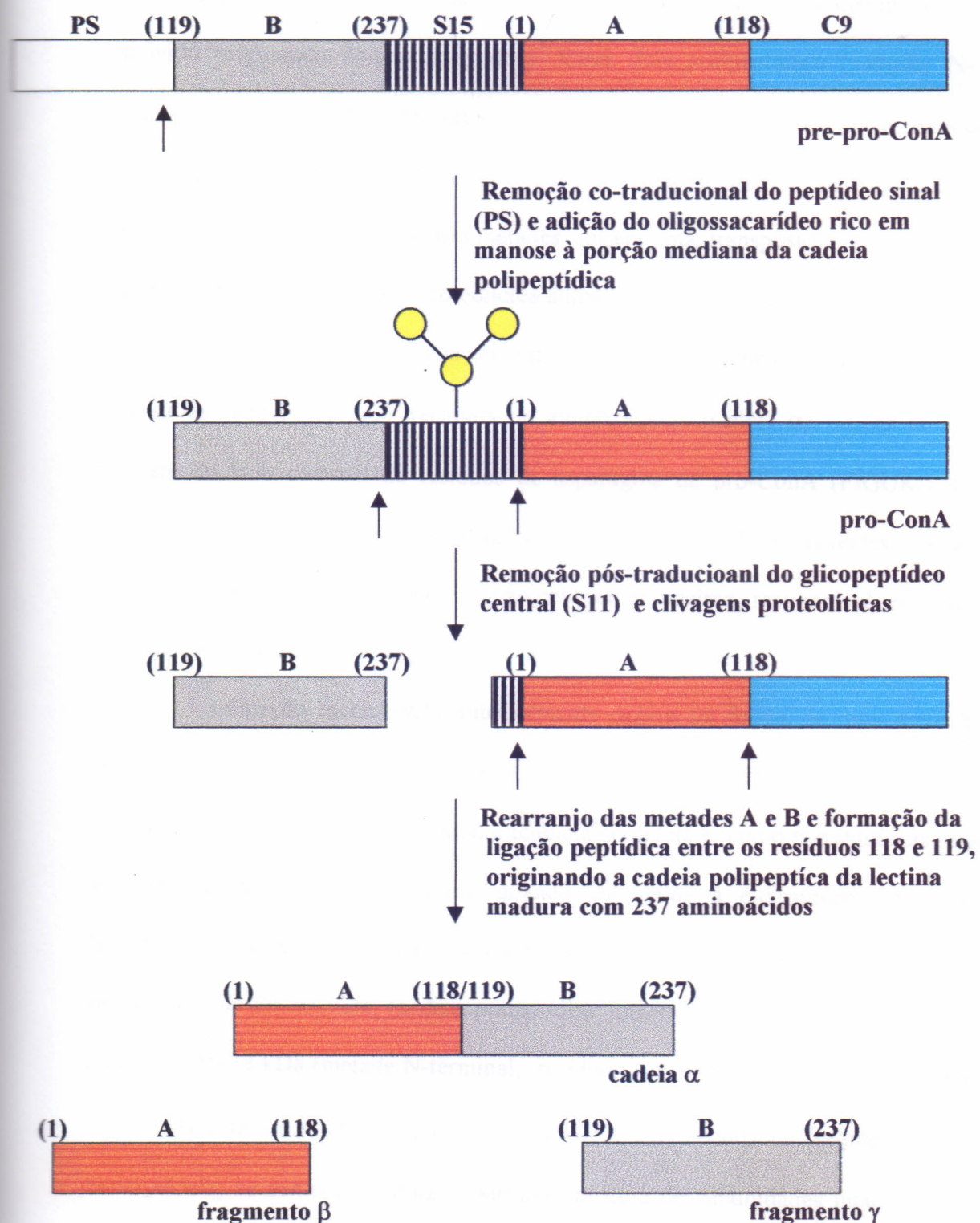


FIGURA 3 - Representação esquemática dos eventos co- e pos-traducionais que ocorrem durante a biossíntese da ConA e demais lectinas de Diocleinae (VAN DAMME & PEUMANS, 1996)

transporte para os corpos protéicos, via complexo de Golgi, o glicopeptídeo central é removido originando dois polipeptídeos. Esses dois polipeptídeos (metades N- e C-terminais da pro-ConA) são então processados proteoliticamente pela remoção de seqüências C-terminais com 11 e 9 resíduos de aminoácidos, respectivamente. Após o processamento C-terminal, as duas metades sofrem uma transposição e são religadas na ordem inversa. Uma clivagem proteolítica adicional remove 4 resíduos da extremidade N-terminal da cadeia polipeptídica já religada, originando a lectina madura não glicosilada, cuja subunidade possui 237 resíduos de amino ácidos (cadeia α). Todas as clivagens ocorrem do lado carboxil de resíduos de asparagina da pro-ConA (FIGURA 4). Uma asparaginil endopeptidase com tais características foi purificada de sementes de *Canavalia ensiformis* (ABE *et al.*, 1993), e parecer ser a enzima responsável *in vivo* pelo processamento proteolítico da pro-ConA (MIN & JONES, 1994).

A religação mencionada anteriormente ocorre na forma de uma nova ligação peptídica entre os resíduos 118 e 119 da lectina madura. Entretanto, a formação da nova ligação peptídica não ocorre com uma eficiência completa e, como consequência, algumas metades não são religadas. Assim, quando submetida a eletroforese em condições desnaturantes, a ConA madura apresenta um padrão de três bandas com massas moleculares de 29-30 kDa, (cadeia polipeptídica intacta com 237 resíduos, denominada cadeia α), 16-18 kDa (metade N-terminal, resíduos 1-118, denominada de fragmento β) e 12-13 kDa (metade C-terminal, resíduos 119-237, denominada de fragmento γ). Como consequência, na semente madura existe uma mistura de subunidades intactas, formadas pela cadeia α com 237 aminoácidos, e subunidades fragmentadas, formadas pelos fragmentos β (resíduos 1-118) e γ (resíduos 119-237). Apesar de não estarem ligados covalentemente, os fragmentos β e γ são mantidos juntos por ligações não covalentes,

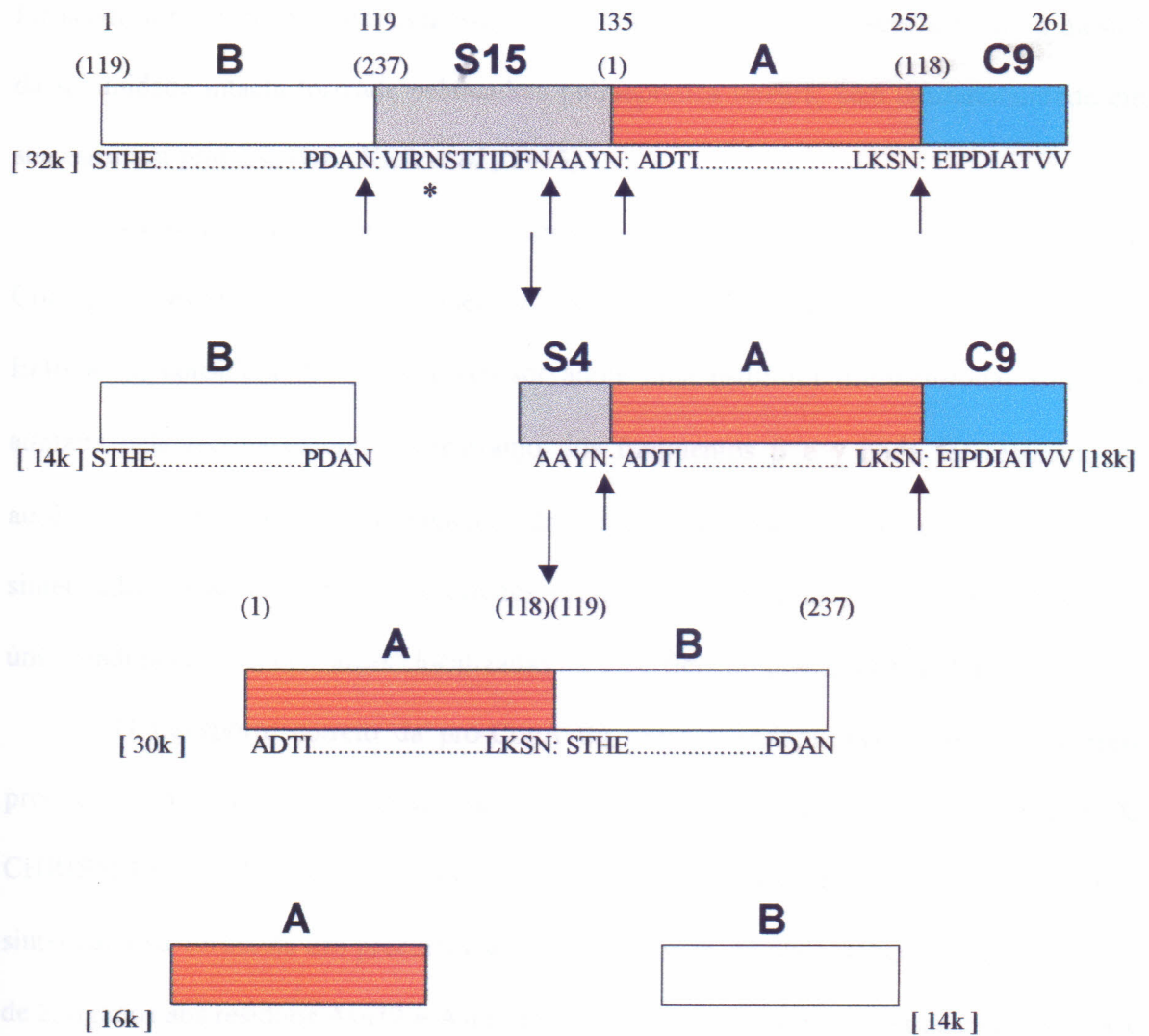


FIGURA 4 - Representação esquemática do processamento da pro-ConA, com destaque para os sítios das clivagens proteolíticas catalizadas *in vivo* por uma asparaginil endopeptidase, indicados pelas setas. O resíduo de asparagina glicosilado na pro-ConA está indicado com um * (MIN & JONES, 1994).

formando um protômero com uma estrutura tridimensional que é essencialmente a mesma da subunidade intacta formada pela cadeia polipeptídica íntegra, sem descontinuidade em sua estrutura primária (BECKER *et al.*, 1975).

Considerando o conjunto de eventos que ocorre durante o processamento da pro-ConA, não existe uma correspondência linear entre a seqüência do gene e da proteína. Entretanto, considerando que o precursor adote uma estrutura tridimensional similar à adotada pela lectina madura, o rearranjo dos fragmentos β e γ pode ser realizado na ausência de qualquer desdobramento da cadeia polipeptídica do precursor recém-sintetizado. Nesse caso, todos os eventos proteolíticos poderiam ser realizados por uma única endopeptidase, em "alças" localizadas na superfície do precursor (FIGURA 5).

O transporte correto da pro-ConA do retículo endoplasmático para os corpos protéicos, via complexo de Golgi, depende da presença do oligossacarídeo (FAYE & CHRISPELS, 1987). Por outro lado, a lectina de *Phaseolus vulgaris* (PHA) é também sintetizada na forma de um precursor glicosilado, porém os oligossacarídeos (em número de 2, ligados aos resíduos Asn12 e Asn60) não são removidos durante o transporte da PHA para os corpos protéicos, e a PHA madura é uma glicoproteína. Assim, ao contrário do que ocorre com a Con A, a glicosilação da pro-PHA não é necessária para o seu transporte para os corpos protéicos (BOLLINI *et al.*, 1985; FAYE *et al.*, 1986; VOELKER *et al.*, 1989).

A determinação da seqüência de aminoácidos dos precursores das lectinas de *Canavalia gladiata* (YAMAUCHI *et al.*, 1989) e *C. brasiliensis* (GRANGEIRO *et al.*, 1997a), por dedução a partir da seqüência de nucleotídeos dos respectivos cDNAs, e sua comparação com as seqüências de aminoácidos das lectinas maduras, também revelou que as metades N- e C-terminais estão ligadas numa ordem inversa no precursor, sugerindo que o mesmo processamento pós-traducional da ConA também ocorre nessas espécies.

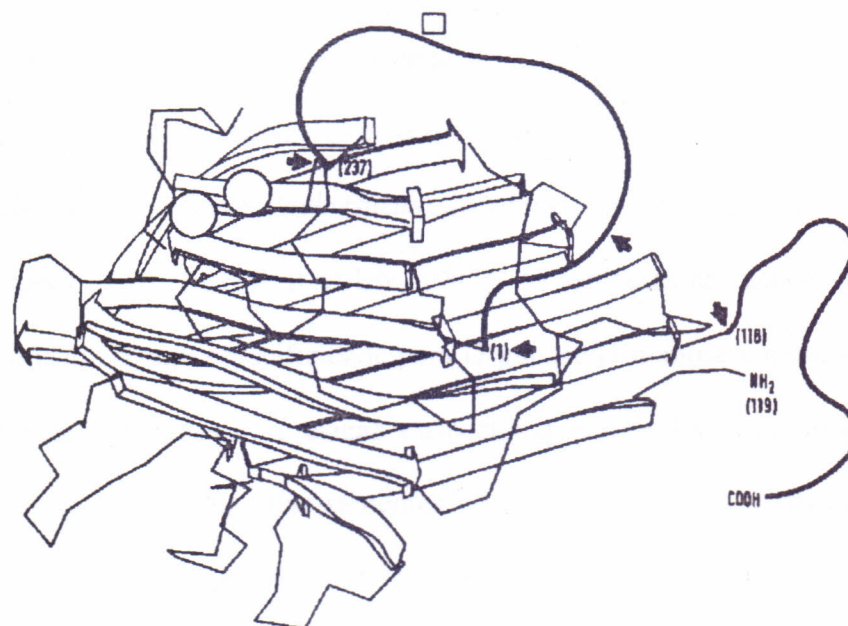


FIGURA 5 - Estrutura hipotética do precursor da ConA (33 kDa). Os números correspondem às posições dos resíduos no monômero da ConA madura. As setas indicam a posição aproximada dos sítios de clivagem para a asparaginil endopeptidase. □ indica a localização proposta para o N-glicano (BOWLES & PAPPIN, 1988).

R 1349504

1.4 Lectinas da subtribo Diocleinae: um grupo de proteínas com alta homologia estrutural, mas com propriedades biológicas contrastantes

A subtribo Diocleinae compreende 13 gêneros (*Calopogonium*, *Campiosema*, *Canavalia*, *Cleobulia*, *Collaea*, *Cratylia*, *Cymbosema*, *Dioclea*, *Galactia*, *Herpyza*, *Luzonia*, *Macropsychanthus* e *Pachyrhizus*) distribuídos nas regiões tropicais notadamente no Novo Mundo (POLHILL & RAVEN, 1981). As sementes das espécies de Diocleinae são ricas em lectinas com especificidade para D-glicose/D-manose e muitas delas têm sido purificadas e caracterizadas com relação a aspectos químicos, físico-químicos, estruturais e biológicos. A ConA, extraída das sementes do feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*) e isolada pela primeira vez por Sumner & Howell em 1936, é o protótipo das lectinas de Diocleinae e é, sem nenhuma dúvida, a mais estudada de todas as lectinas. A partir de então, várias lectinas homólogas a ConA têm sido purificadas de outras espécies de Diocleinae, tais como as de: *Canavalia brasiliensis* (MOREIRA & CAVADA, 1984), *Dioclea grandiflora* (MOREIRA *et al.*, 1983), *D. virgata* (CAVADA *et al.*, 1996a), *D. violacea* (MOREIRA *et al.*, 1996), *D. rostrata* (CAVADA *et al.*, 1996b), *D. guianensis* (VASCONCELOS *et al.*, 1991), *Cratylia floribunda* (OLIVEIRA *et al.*, 1991).

As lectinas de Diocleinae são proteínas oligoméricas compostas de 4 subunidades iguais com cerca de 25 kDa, e cada uma delas possui um único sítio de ligação a carboidratos, com a mesma especificidade para resíduos de glicose/manose. As lectinas de Diocleinae caracteristicamente necessitam da presença de cátions divalentes (Ca^{+2} e Mn^{+2}) para expressarem sua atividade de ligação a carboidratos.

Todas as lectinas específicas para glicose/manose de espécies do táxon Diocleinae já estudadas, purificadas de várias espécies dos gêneros *Canavalia*, *Dioclea* e *Cratylia*, apresentam o mesmo padrão quando analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida

em condições desnaturantes. Este padrão é caracterizado por três grupos de bandas protéicas com massas moleculares aparentes em torno de 29-30 kDa (cadeia α), 16-18 kDa (fragmento β) e 12-13 kDa (fragmento γ). A interrelação entre os polipeptídeos que compõem a subunidade das lectinas de Diocleinae foi inicialmente estabelecida para a ConA (ABE *et al.*, 1971). Através do seqüenciamento N-terminal da cadeia α e dos fragmentos β e γ isolados, demonstrou-se que tais fragmentos correspondem às metades N- e C-terminais da cadeia intacta α . Posteriormente, a mesma relação foi demonstrada para as lectinas de *Dioclea grandiflora* (RICHARDSON *et al.*, 1984a; AINOUZ *et al.*, 1987) e *Cratylia floribunda* (GRANGEIRO *et al.*, 1997b). Como revelado pelos estudos *in vitro* e *in vivo* da biossíntese da ConA, os fragmentos β e γ são oriundos do processamento pós-traducional das formas precursoras dessas lectinas (item 1.3.7).

A comparação das estruturas primárias disponíveis de algumas lectinas de Diocleinae (FIGURA 6) revela um alto grau de homologia entre as mesmas, sugerindo que essas proteínas divergiram a partir de uma seqüência ancestral comum. Além disso, os resíduos de aminoácidos da ConA que formam os sítios de ligação a metais, o sítio de ligação a carboidratos e os sítios para ligantes hidrofóbicos são completamente conservados nas estruturas das lectinas de Diocleinae já determinadas.

Apesar de possuírem uma alta similaridade em suas estruturas primárias e tridimensionais (SANZ-APARICIO *et al.*, 1997; GRANGEIRO *et al.*, 1997a), e de compartilharem a mesma especificidade por resíduos de glicose/manose, as lectinas de Diocleinae apresentam diferenças marcantes em várias atividades biológicas. Dentre as respostas que as lectinas de Diocleinae são capazes de induzir em uma série de sistemas biológicos, podemos citar: indução da proliferação de linfócitos e da produção de interferon- γ (BARRAL-NETTO *et al.*, 1992), estimulação de macrófagos (RODRIGUEZ

	1			40
ConM:	ADTIVAVELD	TYPNTDVGDP	SYPHXXXXXX	SVRXXXTAKW
ConBr:	ADTIVAVELD	TYPNTDIGDP	SYPHIGIDIK	SVRSKKTAKW
ConG:	ADTIVAVELD	TYPNTDIGDP	NYPHIGIDIK	SVRSKKTAKW
ConL:	ADTIVAVELD	TYPNTDIGDP	SYPHIGIDIK	SVRSKKTAKW
ConV:	ADTIVAVELD	TYPNTDIGDP	SYPHIGIDIK	SVRSKKTAKW
DLL:	ADTIVAVELD	SYPNTDIGDP	SYPHIGIDIK	DIRSKATARW
CFL:	ADTIVAVELD	TYPNTDIGDP	NYQHIGINIK	SIRSKATTRW
	41			80
ConM:	NMQNGKVGTA	HISYNSVGKR	LSAVVSYPNG	DSATVSYDVD
ConBr:	NMQNGKVGTA	HIIYNSVGKR	LSAVVSYPNG	DSATVSYDVD
ConG:	NMQNGKVGTA	HIIYNSVGKR	LSAVVSYPNG	DSATVSYDVD
ConL:	NMQNGKVGTA	HIIYNSVGKR	LSAVVSYPNG	DSATVSYDVD
ConV:	NMQNGKVGTA	HIIYNSVGKR	LSAVVSYPNG	DSATVSYDVD
DLL:	NMQTGKVGTA	HISYNSVAKR	LSAVVSYTGT	SSTTVSYDVD
CFL:	NVQDGKVGTA	HISYNSVAKR	LSAIVSYPGG	SSATVSYDVD
	81			120
ConM:	LDNVLPEWVR	VGLSASTGLY	KETNTILSWS	FTSKLKSNST
ConBr:	LDNVLPEWVR	VGLSASTGLY	KETNTILSWS	FTSKLKSNST
ConG:	LDNVLPEWVR	VGLSASTGLY	KETNTILSWS	FTSKLKSNST
ConL:	LDNVLPEWVR	VGLSASTGLY	KETNTILSWS	FTSKLKSNST
ConV:	LDNVLPEWVR	VGLSASTGLY	KETNTILSWS	FTSKLKSNST
DLL:	LNNVLPEWVR	VGLSATTGLY	KQTNTVCPRS	FTXXLKTNSI
CFL:	LNNILPEWVR	VGLSASTGLY	KETNTILSWS	FTSKLKSNST
	121			160
ConM:	HETNALHFMF	NQFTKDQKDL	ILQSDATTGT	DGNLXXTRVS
ConBr:	HETNALHFMF	NQFSKDQKDL	ILQGDATTGT	EGNLRLTRVS
ConG:	HETNALHFMF	NQFSKDQKDL	ILQGDATTGT	DGNLELTRVS
ConL:	HETNALHFVF	NQFSKDQKDL	ILQGDATTGT	DGNLELTRVS
ConV:	HETNALHFMF	NQFSKDQKDL	ILQGDATTGT	DGNLELTRVS
DLL:	ADANDLHFSF	SQFSQNPKDL	ILQGDATTDS	DGNLSLTRVS
CFL:	ADAQSLHFTF	NQFSQNPKDL	ILQGDASTDS	DGNLQLTRVS
	161			200
ConM:	SNGPSQGSTV	GRALFYAPVH	IWESSATVAG	FDATFXXLIK
ConBr:	SNGSPQGSSV	GRALFYAPVH	IWESSAVVAS	FEATFTFLIK
ConG:	SNGSPQGSSV	GRALFYAPVH	IWESSAVVAS	FDATFTFLIK
ConL:	SNGSPQGNV	GRALFYAPVH	IWESSAVVAS	FDATFTFLIK
ConV:	SNGSPQGNV	GRALFYAPVH	IWESSAVVAS	FDATFTFLIK
DLL:	SDGSPQGSSV	GRALFYAPVH	IWEKSAVVSS	FDATFIFLIK
CFL:	-NGSPQNSV	GRALYYAPVH	VWDKSAVVAS	FDATFTFLIK
	201			237
ConM:	SPDHPADGI	AFFISNIDSS	IPSGSTGRLL	GLFPDAN
ConBr:	SPDHPADGI	AFFISNIDSS	IPSGSTGRLL	GLFPDAN
ConG:	SPDHPADGI	AFFISNIDSS	IPSGSTGRLL	GLFPDAN
ConL:	SSDHPADGI	AFFISNIDSS	IPSGSTGRLL	GLFPDAN
ConV:	SPDHPACGI	AFFISNIDSS	IPSGSTGRLL	GLFPDAN
DLL:	SPDRPADGI	TFFIANTDTS	IPSGSGRLL	GLFPDAN
CFL:	STDSDIADGI	AWFIANTDSS	IPHGSGRLL	GLFPDAN

FIGURA 6 - Alinhamento múltiplo das seqüências de aminoácidos das lectinas de Diocleinae: ConM (*Canavalia maritima*, PEREZ *et al.*, 1991), ConBr (*Canavalia brasiliensis*, GRANGEIRO *et al.*, 1997), ConG (*Canavalia gladiata*, YAMAUCHI *et al.*, 1989), ConL (*Canavalia lineata*, FUJIMURA *et al.*, 1993), ConV (*Canavalia virosa*, FUJIMURA *et al.*, 1993), DLL (*Dioclea lehmanni*, PEREZ *et al.*, 1991) e CFL (*Cratylia floribunda*, CAVADA *et al.*, 1999).

et al., 1992), indução da migração de leucócitos (BENTO *et al.*, 1993), indução da liberação de histamina (GOMES *et al.*, 1994), efeitos antiinflamatórios e pro-inflamatórios (ASSREUY *et al.*, 1997), proteção parcial *in vivo* em animais infectados com *Leishmania amazonensis* (BARRAL-NETTO *et al.*, 1996), indução da produção *in vitro* e *in vivo* de óxido nítrico por células peritoneais murinas (ANDRADE *et al.*, 1999) e indução de apoptose (BARBOSA *et al.*, 1999). Embora esteja claro o envolvimento de seus sítios de ligação a açúcares com a ocorrência de fenômenos biológicos do sistema imune, os possíveis receptores de superfície para essas proteínas e as vias bioquímicas que determinam a estimulação celular, permanecem largamente desconhecidos. Entretanto, o fato das lectinas de Diocleinae se ligarem com grande afinidade ao trissacarídeo 3,6-di-O-(α -D-manopiranosil)-D-manose, que está presente na região central dos oligossacarídeos de todas as glicoproteínas N-ligadas, sugere que os receptores devem ser glicoconjugados, com o referido trissacarídeo como parte da sua estrutura (DAM *et al.*, 1998).

Evidências experimentais sugerem que as diferenças de intensidade observadas nas atividades biológicas produzidas pelas lectinas de Diocleinae residem, em parte, no fato dessas proteínas possuírem afinidades distintas para um mesmo ligante complexo, apesar de todas elas reconhecerem resíduos de glicose/manose (RAMOS, 1996).

No caso da indução da liberação de histamina por mastócitos da cavidade peritoneal de ratos, uma correlação positiva e significativa foi encontrada entre as propriedades indutoras da liberação de histamina das lectinas de Diocleinae e as características termodinâmicas da ligação dessas lectinas ao pentassacarídeo GlcNAc₂Man₃, constituído do núcleo trimanosídico com resíduos de N-acetil-glicosamina (GlcNAc) nas extremidades (DAM *et al.*, 1998). Ou seja, os valores das constantes de associação (K_a) das lectinas para o pentassacarídeo e a quantidade de histamina liberada pelos mastócitos são diretamente proporcionais. Vale ressaltar que o núcleo trimanosídico

faz parte da estrutura glicídica das glicoproteínas com carboidratos ligados a resíduos de asparagina. Dessa maneira, observou-se que as lectinas que induzem uma baixa liberação de histamina possuem uma baixa afinidade (K_a) pelo pentassacarídeo $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3$, enquanto que as lectinas mais potentes possuem uma maior afinidade. Esses resultados sugerem que a indução da liberação de histamina por mastócitos peritoneais de rato envolve a interação das lectinas com um carboidrato complexo biantenário e/ou com um epitopo estruturalmente homólogo presente na superfície das células. A princípio, propõe-se que as intensidades de indução dependem das afinidades relativas das lectinas e, conseqüentemente, da extensão das interações.

Dentre as lectinas de Diocleinae, a ConBr, isolada de sementes do feijão-de-boi (*Canavalia brasiliensis*), tem se destacado como uma lectina com propriedades peculiares e distintas das demais, especialmente em relação a ConA, apesar da alta homologia estrutural entre as duas.

1.5 ConBr, um modelo experimental no estudo do papel do processamento pós-traducional das lectinas de Diocleinae na produção de lectinas biologicamente ativas

Embora a ConA seja utilizada como um padrão de referência nos estudos de atividades biológicas determinadas por lectinas, em sistemas *in vitro*, diversos estudos têm demonstrado ser a ConBr capaz de induzir respostas biológicas com uma intensidade muitas vezes bem maior do que a ConA, apesar dessas duas lectinas possuírem uma alta homologia nas suas estruturas primárias e tridimensionais (GRANGEIRO *et al.*, 1997a; SANZ-APARICIO *et al.*, 1997).

A ConBr induziu a proliferação de linfócitos e a produção de interferon- γ por células mononucleares de sangue periférico de voluntários normais em níveis mais

elevados que a ConA (BARRAL-NETTO *et al.*, 1992), e foi capaz de proteger, mas não de curar, ratos BALB/C altamente susceptíveis à infecção por *Leishmania amazonensis* (BARRAL-NETTO *et al.*, 1996).

As lectinas de *C. brasiliensis* (ConBr) e de *D. grandiflora* (DGL) mostraram-se mais potentes do que a ConA em estimular macrófagos e induzir uma resposta inflamatória em camundongos C3H/HeJ (RODRIGUEZ *et al.*, 1992).

BENTO *et al.* (1993), compararam a capacidade da ConBr, ConA e DGL em induzir edema de pata e migração de células peritoneais em ratos. A ConBr induziu um acentuado e longo edema de pata, com máximo em 6-8 horas, e marcadamente inibido por D-glicose, mas não por α -metil-D-manosídeo, enquanto que a ConA causou um edema leve, que atingiu um pico máximo após 1 hora da indução, e foi inibido parcialmente por D-glicose e bloqueado por α -metil-D-manosídeo. Já o efeito da DGL, embora semelhante ao da ConBr, em intensidade e extensão, foi bloqueado por α -metil-D-manosídeo, mas não por D-glicose. Uma intensa acumulação de neutrófilos e células mononucleares foi promovida por doses muito menores que as necessárias para induzir o edema de pata. Assim como para a indução de edema de pata, a ConBr e a DGL foram bem mais potentes que a ConA na indução de migração de células. D-glicose foi capaz de inibir significativamente a acumulação de leucócitos por todas as lectinas testadas, enquanto α -metil-D-manosídeo teve efeito parcial sobre a indução causada pela ConBr. Desta forma, apesar de suas similaridades físico-químicas com a ConA, a ConBr e DGL apresentam maior efeito pro-inflamatório, o que parece estar relacionado com sua especificidade fina por açúcares.

GOMES *et al.* (1994), ao estudarem o efeito de diferentes lectinas isoladas de espécies da subtribo Diocleinae na indução da liberação de histamina por mastócitos peritoneais de ratos, demonstraram que as lectinas de *C. brasiliensis* (ConBr), *D. rostrata* e

D. violacea apresentaram efeitos similares ao conferido pela ConA, enquanto que as demais lectinas testadas foram menos potentes. Observaram também a inibição deste efeito por altas doses da lectina de *D. virgata*, assim como já conhecido para ConA, a qual é revertida pelo aumento da concentração de cálcio no meio de incubação, o que foi atribuído ao seqüestro de cálcio essencial para liberação de histamina. Nesse trabalho os autores sugerem que as diferenças em potência e eficácia na indução da liberação de histamina pelas lectinas testadas, provavelmente possam ser determinadas por diferenças em suas especificidades fina por açúcares.

FERREIRA *et al.* (1996) estudaram a capacidade das lectinas de *Canavalia brasiliensis* (ConBr), *Dioclea rostrata* e *D. virgata* em induzir a liberação de histamina por mastócitos de "cheek pouch" de hamister. O padrão de indução observado foi semelhante ao determinado pela ConA, mas diferente em potência e eficácia. Os efeitos observados foram dependentes do pH, temperatura e energia metabólica, sendo então de natureza não citotóxica.

A atividade antiinflamatória de lectinas da subtribo Diocleinae foi demonstrada através da inibição da indução de migração de neutrófilos peritoneais de ratos e da formação de edema de pata causados por carragenina. A maior inibição foi determinada pela lectina de *D. violacea*, e foi revertida em presença de α -metil-D-manosídeo, mas não por D-galactose. As lectinas de *C. brasiliensis* (ConBr) e de *D. grandiflora*, não foram capazes de inibir a migração de neutrófilos (ASSREUY *et al.*, 1997). Nenhuma das lectinas testadas inibiu o edema de pata induzido pela dextrana, um agente inflamatório neutrófilo independente. Com base nesses resultados os autores sugerem ser a atividade inflamatória de lectinas, melhor observada em reações inflamatórias mediadas por neutrófilos, e especulam que essas proteínas competem pelos ligantes de natureza glicídica do endotélio ou da membrana celular de leucócitos, inibindo a adesão de selectinas, por

mecanismos desconhecidos.

De acordo com os resultados obtidos nos diversos estudos das atividades biológicas induzidas por lectinas da subtribo Diocleinae, essas proteínas apresentam uma elevada capacidade de imunomodulação, e dessa maneira podem ser potencialmente úteis como adjuvantes, tanto para a aplicação em vacinas como na imunoterapia de doenças parasitárias e neoplásicas.

Além disso, a alta homologia estrutural encontrada entre as lectinas de Diocleinae e o fato delas apresentarem diferenças marcantes em suas atividades biológicas sugere que substituições de resíduos específicos na estrutura de lectinas homólogas são importantes na regulação de suas atividades biológicas (GRANGEIRO, 1993). Assim, a ConBr e a ConA, apesar de apresentarem uma homologia de 99 % em suas estruturas primárias, induzem repostas marcadamente diferentes, como revisto anteriormente.

As bases moleculares para as diferenças de atividade biológica entre ConBr e ConA foram recentemente elucidadas, pelo menos em parte, através da análise comparativa de suas estruturas primária, terciária e quaternária. A estrutura primária da ConBr (FIGURA 7) foi determinada através de seqüenciamento de aminoácidos da proteína madura (GRANGEIRO, 1993), espectrometria de massa e seqüenciamento de DNA do gene ConBr (GRANGEIRO, 1996; GRANGEIRO *et al.*, 1997a). As estruturas terciária (FIGURA 8) e quaternária (FIGURA 9) foram determinadas por cristalografia de raios-X a uma resolução de 2,8 Å (GRANGEIRO, 1996; SANZ-APARICIO *et al.*, 1997).

Com base nesse estudo comparativo, foi demonstrado que as diferenças de atividade biológica entre ConBr e ConA são o resultado de diferenças nas suas estruturas quaternárias, na oligomerização diferenciada em função do pH do meio (SANZ-APARICIO *et al.*, 1997; GRANGEIRO *et al.*, 1997a) e nas quantidades relativas de subunidades intactas e fragmentadas (RAMOS *et al.*, 1996).

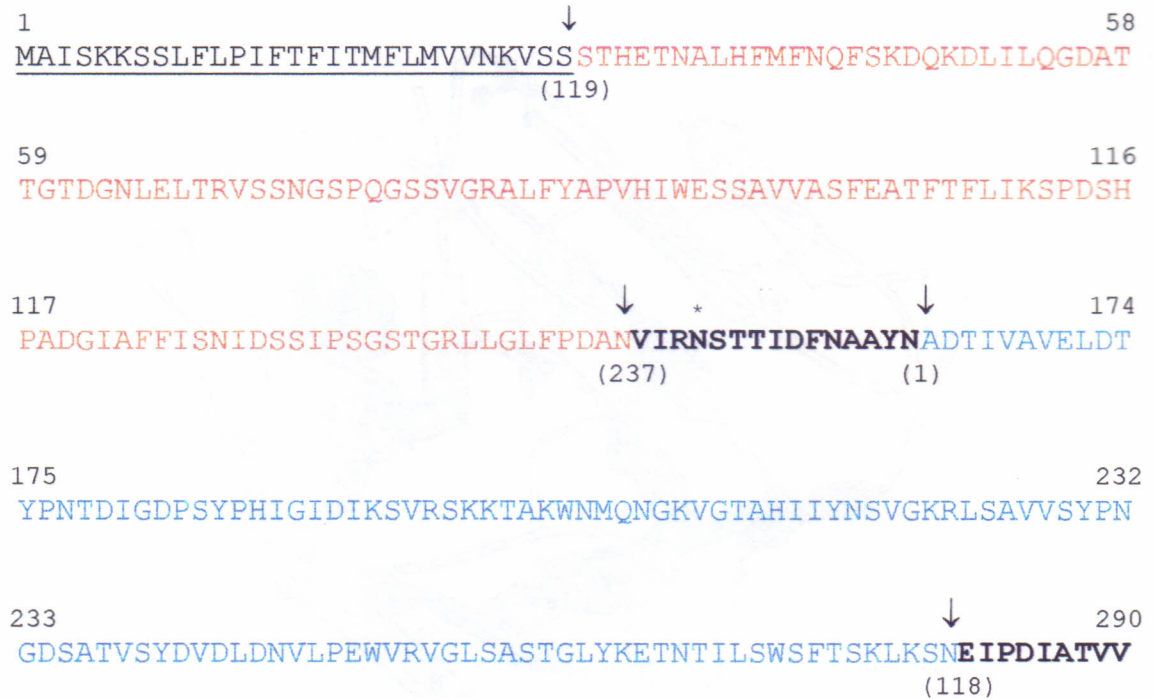


FIGURA 7 - Sequência de aminoácidos da pre-pro-ConBr deduzida a partir da sequência de DNA (GRANGEIRO *et al.*, 1997). O peptídeo sinal ocupa a extremidade N-terminal (sublinhado), seguido da metade C-terminal da lectina madura (em vermelho), do peptídeo central (em negrito), da metade N-terminal da lectina madura (em azul) e da extensão C-terminal (em negrito). A numeração em parênteses se refere aos resíduos na subunidade da lectina madura completamente processada. Os sítios prováveis de processamento proteolítico estão indicados por setas (↓), e o resíduo de asparagina do sítio de glicosilação está indicado com um asterisco (*).

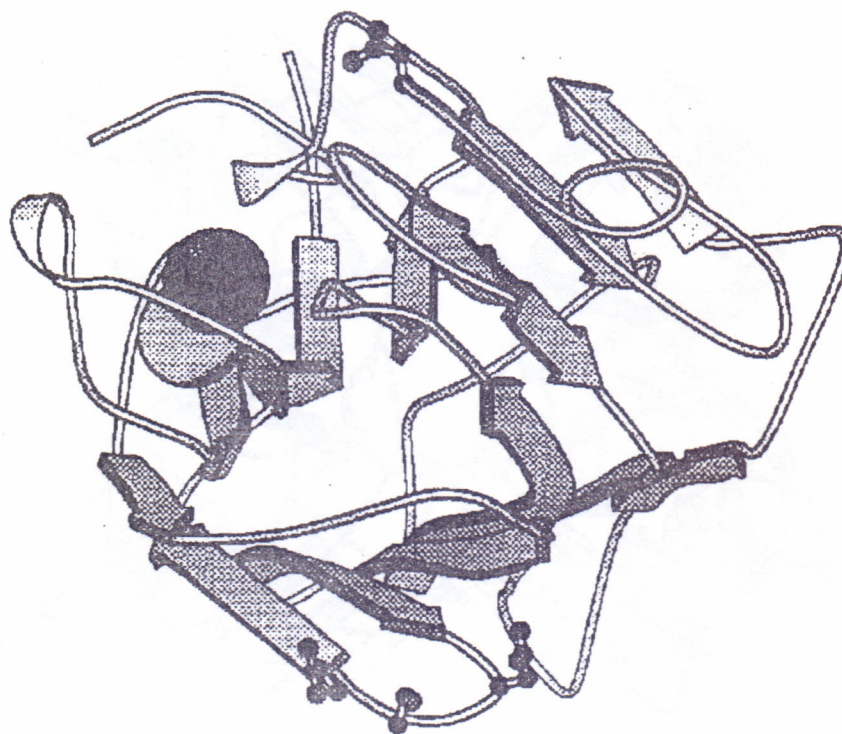


FIGURA 8 - Modelo tridimensional em fita da estrutura monomérica da ConBr, determinada por cristalografia de raios X. Íons Ca^{2+} (esfera escura) e Mn^{2+} (esfera clara), em destaque (GRANGEIRO, 1996).

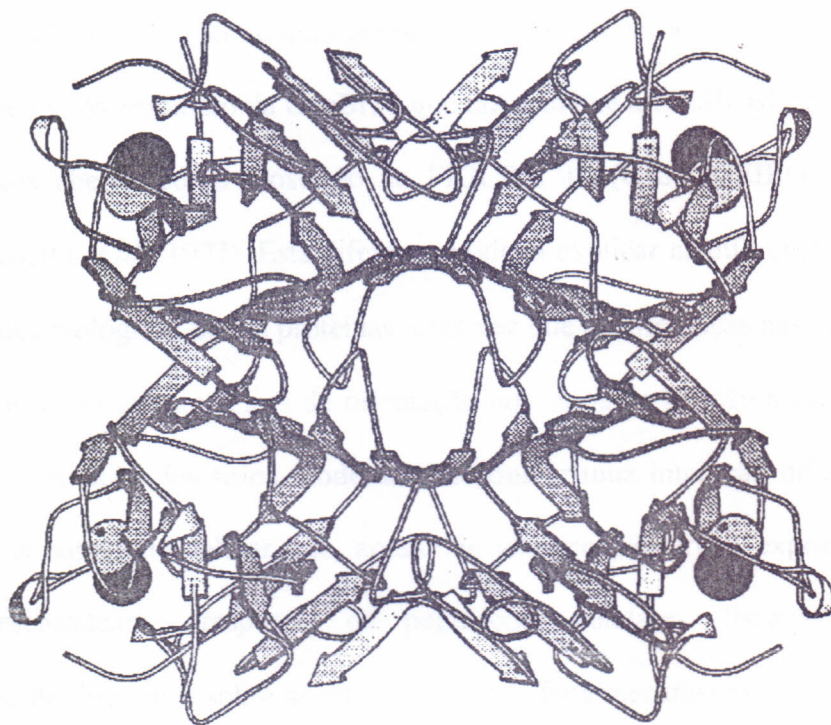


FIGURA 9 - Modelo tridimensional em fita da estrutura quaternária da ConBr, determinada por cristalografia de raios X. Íons Ca^{2+} (esfera escura) e Mn^{2+} (esfera clara), em destaque (GRANGEIRO, 1996).

As estruturas primárias dos monômeros da ConBr e ConA possuem cada uma 237 aminoácidos. Entretanto, elas diferem apenas nos resíduos de aminoácidos das posições 58, 70 e 96. A substituição do resíduo de aminoácido 58 (Asp na ConA por Gly na ConBr), impede a formação de uma ponte de hidrogênio entre Asp58 e Ser62 entre as subunidades A e C do tetrâmero da ConBr, o que faz com que a ConBr adote uma estrutura quaternária mais aberta, como mostrado na FIGURA 10 (GRANGEIRO *et al.*, 1997a; SANZ-APARICIO *et al.*, 1997). Esta diferença poderia explicar as diferenças encontradas em propriedades biológicas destas proteínas, uma vez que as diferenças nas suas estruturas quaternárias resultam em mudanças de orientação nos sítios de ligação a carboidratos. As mudanças na orientação dos sítios poderiam determinar uma interação diferenciada com carboidratos da superfície celular que, apesar de idênticos, estariam expostos de forma diferente, desencadeando respostas de populações celulares distintas, ou efeitos quantitativamente diferentes sobre as mesmas células. Este mecanismo seria, então, a base estrutural para explicar as diferenças nas atividades biológicas distintas produzidas por ConBr e ConA.

Apesar das bases moleculares das diferenças de atividade biológica entre ConBr e ConA estarem, em parte, estabelecidas, uma questão de grande relevância biológica precisa ser respondida. Assim, a comparação da seqüência de aminoácidos da ConBr madura (GRANGEIRO, 1993), determinada quimicamente, com a seqüência de aminoácidos do produto primário de tradução do mRNA, deduzida a partir da seqüência de DNA do gene *conbr* (GRANGEIRO, 1996), demonstrou que essa lectina é sintetizada na forma de uma pre-pro-proteína que sofre um processamento co- e pós-traducional semelhante ao relatado para a pre-pro-ConA (ver item 1.3.7). Dessa maneira, seria de grande interesse se determinar se os eventos complexos que ocorrem durante a biossíntese da ConBr na planta são imprescindíveis na produção de uma lectina biologicamente ativa.

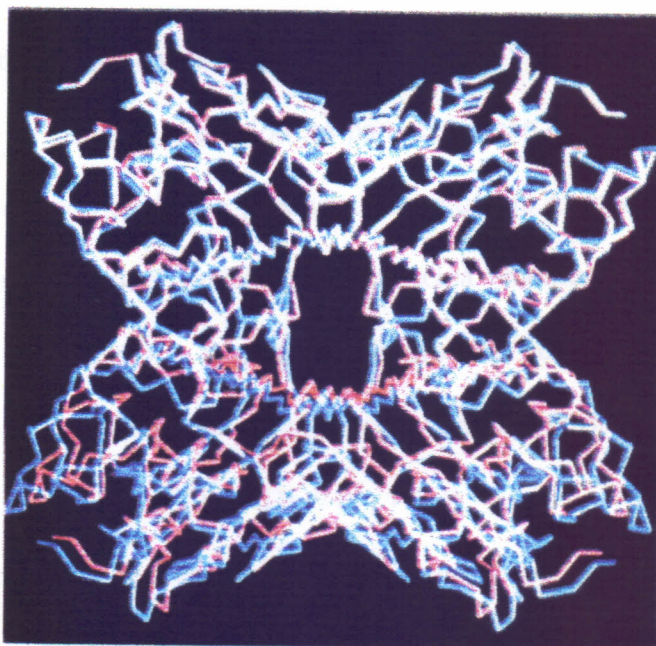


FIGURA 10 – Superposição das estruturas tridimensionais dos tetrâmeros da ConBr (róseo) e da ConA (azul), (GRANGEIRO, 1996).

1.6 Produção de lectinas recombinantes de leguminosas em *Escherichia coli*

A produção de proteínas recombinantes utiliza sistemas biológicos diversos, desde organismos procarióticos, como *E. coli* e *Bacillus*, até organismos eucarióticos, como fungos, insetos, e animais e plantas transgênicas.

A utilização de sistemas procarióticos para expressão de proteínas recombinantes apresenta limitações quando se deseja produzir uma proteína glicosilada e/ou processada pos-traducionalmente. A possível toxicidade da proteína recombinante para a bactéria, a formação de corpos de inclusão, a degradação da proteína por proteases bacterianas e a adição de resíduos de metionina N-terminal são também fatores limitantes a serem considerados (SHARMA, 1986; KUSNADI *et al.*, 1997).

Na produção de lectinas recombinantes de leguminosas, o sistema *E. coli* tem sido o mais empregado. Utilizando diferentes estratégias, as lectinas de *Pisum sativum* (STUBBS *et al.*, 1986; PRASTHOFER *et al.*, 1989), *Canavalia gladiata* (YAMAUCHI & MINAMIKAWA, 1990), *Bauhinia purpurea* (KUSUI *et al.*, 1991), *Erythrina corallodendron* (ARANGO *et al.*, 1992a), *Arachis hypogea* (ARANGO *et al.*, 1992b; SHARMA & SUROLIA, 1994), *Canavalia ensiformis* (MIN & JONES, 1992), *Dolichos biflorus* (CHAO *et al.*, 1994), *Phaseolus lunatus* (JORDAN & GOLDSTEIN, 1994) e *Griffonia simplicifolia* (ZHU *et al.*, 1996) têm sido expressas com sucesso. Além de células de *E.coli*, lectinas vegetais também têm sido expressas em outros sistemas heterólogos, tais como levedura, células de mamíferos, fumo e batata.

Apesar das lectinas recombinantes expressas em *E. coli* não sofrerem os processamentos que ocorrem quando da sua biossíntese nas células vegetais, elas apresentam, via de regra, atividades biológicas semelhantes e com a mesma intensidade das exibidas pelas lectinas nativas, como capacidade de aglutinar hemácias, interação com

carboidratos e atividade inseticida (ZHU *et al.*, 1996). O único caso de uma lectina expressa em *E. coli*, processada de maneira que a estrutura molecular da lectina recombinante foi semelhante a da proteína nativa foi relatado para a lectina de *Canavalia gladiata* (YAMAUCHI & MINAMIKAWA, 1990). Para a ConA recombinante produzida em *E. coli*, nenhum processamento foi observado, com a pre-pro-lectina se mostrando estável a qualquer modificação em sua estrutura primária (MIN & JONES, 1992). Entretanto, nenhuma informação experiencial foi até o momento publicada no sentido de se determinar se a proteína não processada produzida em *E. coli* possui uma atividade biológica semelhante à lectina madura completamente processada.

2 JUSTIFICATIVAS

O uso da tecnologia do DNA recombinante tem fornecido importantes contribuições no estudo da estrutura, biossíntese e função das proteínas. A bactéria *Escherichia coli* tem sido extensivamente utilizada na tecnologia do DNA recombinante, principalmente por ser um microrganismo bem caracterizado, de fácil e rápido crescimento, e de ser relativamente simples do ponto de vista genético. A *E. coli* é um bacilo gram negativo, cujo material genético se constitui de um único DNA circular encontrado na região nuclear da bactéria, e de pequenas moléculas circulares de DNA, os plasmídios, encontrados no citoplasma. Os plasmídios são elementos genéticos circulares existentes em muitas espécies de bactérias, e possuem a propriedade de replicação independente. Apresentam muitas propriedades importantes: pequeno tamanho, facilitando o isolamento e a manipulação de DNA; estrutura circular, tornando o DNA mais estável durante o isolamento químico; presença de origem de replicação própria; muitas cópias por célula; e presença de marcadores de seleção (genes para resistência a antibióticos), facilitando a detecção e seleção dos clones que os contem. Podem ser cortados em locais específicos pela ação de endonucleases de restrição, determinando um espaço adequado para que seja inserido o DNA exógeno, o qual pode ser originado de diferentes fontes. O DNA exógeno é anelado ao plasmídio por meio de ligações de hidrogênio com nucleotídios do sítio de clivagem, e por ação de DNA ligase, formando-se então um novo plasmídio, denominado vetor. O vetor é, então, introduzido numa cepa apropriada de *E. coli*, e o gene inserido, induzido a expressar a proteína recombinante (SHARMA, 1986).

As proteínas recombinantes de eucariotos produzidas em *E. coli* são

caracteristicamente destituídas de modificações co- e pós-traducionais, tais como glicosilação, remoção de sequências sinais e processamento proteolítico em sítios específicos na estrutura da proteína. Como consequência, os produtos recombinantes produzidos em *E. coli* contêm sequências de aminoácidos extras, ausentes nas proteínas maduras isoladas de suas fontes naturais. Desta maneira, este sistema de expressão se constitui numa ferramenta importante na elucidação do papel das modificações pós-traducionais na produção de proteínas biologicamente ativas.

A ConBr é uma lectina glicose/manose isolada de sementes maduras de *Canavalia brasiliensis* (MOREIRA & CAVADA, 1984). Essa lectina aglutina fortemente hemácias humanas e de vários animais, e produz vários efeitos biológicos como indução da proliferação de linfócitos e da produção de interferon- γ (BARRAL-NETTO *et al.*, 1992), estimulação de macrófagos (RODRIGUEZ *et al.*, 1992), indução da migração de leucócitos (BENTO *et al.*, 1993), indução da liberação de histamina por mastócitos (GOMES *et al.*, 1994), efeitos antiinflamatórios e pro-inflamatórios (ASSREUY *et al.*, 1997), proteção parcial *in vivo* em animais infectados com *Leishmania amazonensis* (BARRAL-NETTO *et al.*, 1996), indução da produção *in vitro* e *in vivo* de óxido nítrico por células peritoneais murinas (ANDRADE *et al.*, 1999) e indução de apoptose (BARBOSA *et al.*, 1999). Evidências experimentais mostram que as atividades biológicas da ConBr são o resultado da interação da proteína com receptores da superfície celular, de natureza glicídica, contendo resíduos de glicose/manose.

Na planta, a ConBr é sintetizada durante o desenvolvimento das sementes, sendo detectada a partir de 30 dias após a polinização das flores (MOREIRA *et al.*, 1993). O produto primário de tradução do mRNA do gene *conbr* é uma proteína com 290 resíduos de aminoácidos, a pre-pro-ConBr (GRANGEIRO *et al.*, 1997a). À semelhança do que ocorre durante a biossíntese da ConA, a pre-pro-ConBr sofre uma série de modificações

co- e pós-traducionais, que incluem N-glicosilação, clivagens proteolíticas e formação de uma ligação peptídica *de novo*, resultando na produção da lectina madura, com 237 resíduos de aminoácidos. A ConBr madura, completamente processada, possui a capacidade de se ligar a carboidratos, aglutinar eritrócitos e induzir várias atividades biológicas em diversos sistemas.

Os eventos pós-traducionais complexos que ocorrem durante a biossíntese da ConBr e da ConA parecem não possuir similaridades com os de qualquer outra proteína (COOPER & STEVENS, 1993).

Apesar da ConBr nativa ser uma proteína relativamente bem caracterizada com relação a aspectos químicos, físico-químicos, estruturais e biológicos, faltam ainda evidências experimentais com relação à função que os vários eventos pós-traducionais que ocorrem *in planta* exercem na conversão do precursor inativo numa proteína biologicamente ativa. Estes estudos, além da sua relevância para a compreensão dos mecanismos de regulação da expressão gênica a nível pós-traducional, também são importantes como modelo experimental de um outro problema biológico fundamental, a relação entre estrutura e função das proteínas.

Diante do exposto, a expressão e caracterização estrutural e biológica do produto primário de tradução do gene *conbr*, em células de *E. coli*, certamente irá fornecer valiosos subsídios para a compreensão de todas essas questões.

3 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

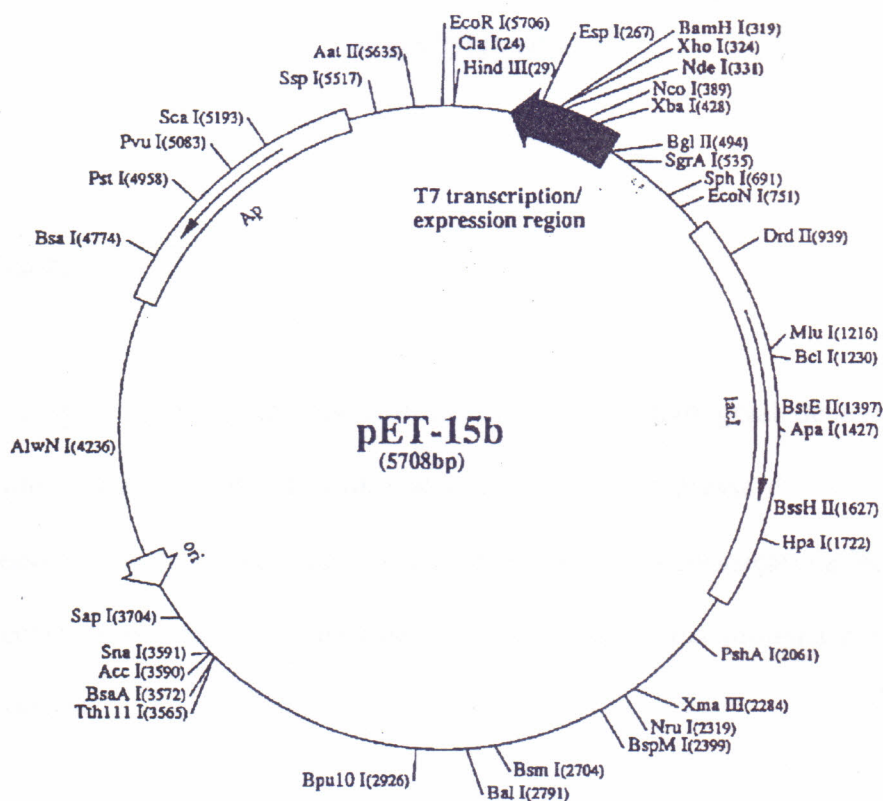
O gene que codifica a pre-pro-ConBr foi amplificado por PCR, utilizando-se oligonucleotídeos desenhados de acordo com seqüências já conhecidas dos genes da ConA e da ConG. Assim, no oligonucleotídeo complementar à fita senso da extremidade 5' (CAT ATG GCC ATC TCA AAG AAA TC), o codon ATG codifica o primeiro resíduo da pre-pro-lectina, a metionina, e naquele complementar à fita anti-senso da extremidade 3' (GGA TCC TCA AAC CAC GGT AGC AAT), o codon TCA codifica seu último resíduo (GRANGEIRO, 1996).

A polimerase do DNA utilizada, *Taq* DNA polimerase (extraída de *Thermus aquaticus*) tem a propriedade de adicionar um ou mais desoxinucleotídeos nas extremidades 3' de cada fita do DNA de fita dupla com extremidades rombudas do fragmento amplificado. Qualquer um dos quatro desoxinucleotídeos pode ser adicionado, no entanto por razões desconhecidas, ocorre a incorporação preferencial de dATP (SAMBROOK *et al.*, 1989). Desta forma, o produto amplificado por PCR pode ser clonado no plasmídeo pCRII (Invitrogen, Co), cuja forma linear possui timidinas extras em suas extremidades, complementares às extremidades do fragmento amplificado. O pCRII contém dois marcadores genéticos: o gene da β -lactamase e o gene da β -galactosidase. O gene da β -lactamase confere resistência à ampicilina e carbenicilina, possibilitando a seleção de colônias transformadas com o plasmídeo, através da resistência a esses antibióticos, e o gene da β -galactosidase determina a capacidade de metabolizar uma substância cromogênica, o X-Gal, produzindo um pigmento azul. Assim, as colônias transformadas, possuindo o gene para β -galactosidase em seus plasmídios são azuis,

enquanto aqueles contendo o gene não funcional são brancas. No entanto, como o sítio múltiplo de clonagem (local de inserção do fragmento de DNA a ser clonado) do plasmídeo pCRII ocupa a região do gene que codifica a porção N-terminal da β -galactosidase, e o fragmento de DNA clonado foi inserido no meio desta região, as bactérias com plasmídios recombinantes, incapazes de produzir a β -galactosidase funcional, formaram colônias brancas, permitindo assim uma seleção inicial dos clones recombinantes.

As extremidades 5' dos oligonucleotídeos usados para amplificação do gene *conbr* foram desenhados com sítios de restrição para NdeI e BamHI, permitindo sua subclonagem para o vetor de expressão pET-15b (FIGURA 11), por meio de dupla digestão com estas enzimas. Como esse vetor apresenta estes dois sítios em sua região de múltipla de clonagem, a digestão do vetor e do gene resultou no anelamento de suas extremidades coesivas. Os genes clonados nos vetores de expressão pET estavam sob o controle de sinais fortes de transcrição e tradução do bacteriófago T7, e a expressão foi induzida fornecendo-se uma fonte de RNA polimerase T7 na célula hospedeira.

A cepa *E. coli* BL21 (λ DE3), utilizada como hospedeiro de expressão, possui em seu genoma uma cópia do gene da RNA polimerase T7 sob o controle do promotor *lacUV5*, cuja expressão é induzida pelo IPTG. No vetor pET, a proteína recombinante é expressa como uma proteína de fusão, possuindo uma cauda adicional de 6 resíduos de histidina, na extremidade N-terminal, a qual é separada do N-terminal da proteína por uma sítio de clivagem para Trombina. Assim, como a rConBr não apresentou capacidade para ligar carboidratos, e desta maneira não pode ser purificada por cromatografia de afinidade em matrizes comumente utilizadas na purificação de lectinas nativas, foi purificada por cromatografia de afinidade em metal imobilizado, através de sua interação com níquel.



Unique sites are shown. Enzymes that do not cut pET-15b:

Afl III	Age I	Asc I	Avr I I	Bae I	Bsi W I	Bsu 36 I	Dra I I I
Fse I	Kpn I	Kfe I	Nhe I	Not I	Nsi I	Nsp V	Pac I
Pml I	Rle A I	Rsr I I	Sac I I	Sal I	Sfi I	Sma I	Sna B I
Spe I	Sse 8387 I	Sst I	Stu I	Swal			

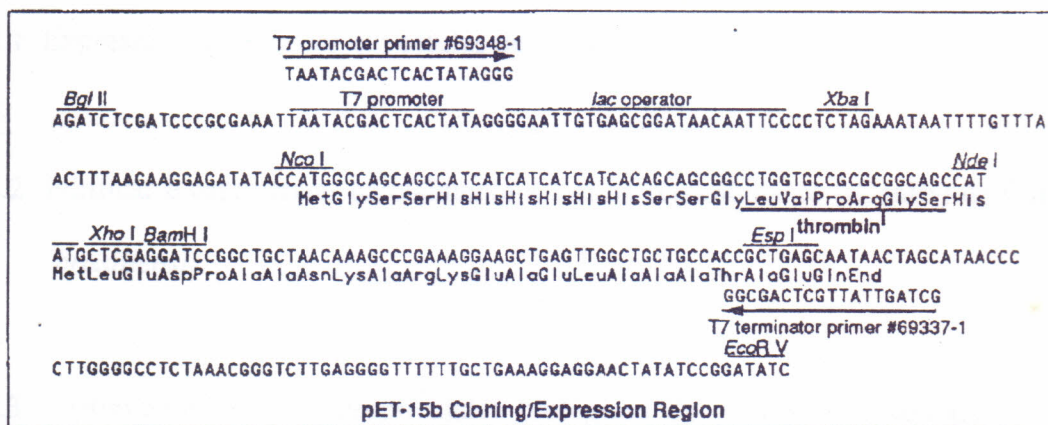


FIGURA 11 - Diagrama do vetor de expressão procariótico pET15b com indicação das posições dos sítios de restrição, e detalhe da sequência do sítio múltiplo de clonagem.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Esta tese de Doutorado foi realizada com o objetivo geral de esclarecer se a lectina recombinante (rConBr) de *Canavalia brasiliensis* expressa em *Escherichia coli*, sofre processamentos co- e pós-traducionais até assumir a conformação da lectina ativa, e se a ocorrência desses eventos é necessária para produzir uma proteína com atividades biológicas plenas.

4.2 Objetivos específicos

4.2.1 Expressar o gene *conbr* em células de *Escherichia coli*

4.2.2 Purificar e caracterizar parcialmente a lectina recombinante (rConBr) de *Canavalia brasiliensis*

4.2.3 Determinar algumas propriedades biológicas da rConBr comparando-as com as propriedades induzidas pela ConBr nativa

4.2.4 Investigar a importância dos processamentos co- e pós-traducionais *in vivo*, que ocorrem durante a biossíntese da ConBr na planta, na produção de uma lectina completamente funcional

5 MATERIAIS

5.1 Sementes

Sementes maduras de *Canavalia brasiliensis* foram coletadas no campo experimental do Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará (UFC).

5.2 Cepa bacteriana recombinante

A cepa recombinante de *Escherichia coli* BL21(λ DE3) pETconbr foi utilizada como hospedeiro de expressão da lectina recombinante (rConBr) de *Canavalia brasiliensis*.

5.3 Animais

Nos experimentos de atividades biológicas foram utilizados ratos Wistar com pesos entre 150 e 300 g, procedentes do Biotério Central do Campus do Pici da UFC. Os animais foram mantidos com água e alimentação *ad libitum* no Laboratório de Biomoléculas Ativas (BioMol Lab) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBBM) do Centro de Ciências (CC) da UFC.

6 MÉTODOS

6.1 Produção e purificação da lectina recombinante (rConbr) de *Canavalia brasiliensis*

6.1.1 Expressão do gene *conbr* em células de *Escherichia coli*

O gene *conbr*, codificando a pre-pro-lectina (GRANGEIRO, 1996) foi expresso em células de *E. coli* BL21 (λ DE3) contendo o vetor recombinante de expressão pET*conbr*. Para isto, uma colônia de *E. coli* crescida em ágar LB foi inoculada em 500 ml de caldo LB estéril, acrescido de ampicilina para uma concentração final de 100 μ g/ml. A cultura foi incubada à temperatura ambiente (28-30 °C), no escuro, sob agitação constante e orbital, até atingir uma OD₆₀₀ entre 0,6 e 1,0. Uma alíquota de 1 ml da cultura foi retirada para análise por PAGE-SDS. As células coletadas por centrifugação a 3.000 rpm por 20 minutos a 4 °C em centrífuga Sorvall RC5B Plus, rotor SS34, foram ressuspensas em igual volume de meio fresco contendo ampicilina 100 μ g/ml, e IPTG para uma concentração final de 1 mM. A indução foi conduzida por 5 horas à temperatura de ambiente (28-30 °C), no escuro, sob agitação constante e orbital. Uma alíquota de 1 ml da cultura induzida foi retirada para análise por PAGE-SDS, e o restante centrifugado a 3.000 rpm por 20 minutos a 4 °C. As células foram lavadas em tampão TES (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 2 mM, NaCl 0,15 M), por 2 vezes, coletadas por centrifugação a 3.000 rpm, por 20 minutos a 4 °C, e mantidas congeladas. Foram retiradas alíquotas de 1 ml, após cada lavagem com tampão TES, para análise por PAGE-SDS.

6.1.2 Purificação dos corpos de inclusão

As células bacterianas obtidas no item 6.1.1 foram ressuspensas em 50 ml de tampão TES contendo 5 ml de Triton X-100 1% e lisozima 100 $\mu\text{g/ml}$. A mistura foi incubada a 30 °C por 15-30 minutos até que ocorresse a lise das células, evidenciada pelo desenvolvimento de viscosidade.

A digestão de DNA genômico da bactéria foi realizada por ação de DNase I GIBCO BRL (136 U/ μl :19.000 U/mg) numa concentração final de 20 $\mu\text{g/g}$ de células. A mistura foi incubada a 30 °C por aproximadamente 1 hora, até perda total de viscosidade, e os corpos de inclusão coletados por centrifugação a 19.960 x g por 30 minutos a 4 °C, em centrífuga Sorvall RC5B Plus, rotor SS34, e lavados em 50 ml de tampão TES contendo Triton X-100 a 1 %, por duas vezes, permanecendo a mistura em repouso por 30 minutos antes de cada centrifugação. Aliquotas de 1 ml foram retiradas para análise por PAGE-SDS, e os corpos de inclusão mantidos congelados.

6.1.3 Purificação da rConBr por cromatografia de afinidade em Níquel imobilizado

Os corpos de inclusão obtidos como descrito no item 6.1.2 foram solubilizados em tampão de solubilização (Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 0,5 M, Imidazol 5 mM contendo cloridrato de guanidina 6M), incubados por 12 horas em refrigerador, e centrifugados a 7.800 x g por 30 minutos a 4 °C, em centrífuga Sorvall RC5B Plus, rotor SS34. O sobrenadante foi aplicado em uma coluna de Sepharose (Chelating Sepharose Fast Flow, de 7 x 1,5 cm; Pharmacia Biotech), previamente carregada com solução de NiSO₄ 100 mM, e equilibrada com tampão de solubilização. A amostra permaneceu em contato com a matriz cromatográfica por 30 minutos, sendo então realizada a eluição das proteínas

bacterianas por lavagem da coluna com tampão de solubilização e tampão de lavagem (Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 0,5 M, Imidazol 50 mM contendo cloridrato de guanidina 6M). A lectina recombinante (rConBr) foi eluída em tampão de eluição (Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 0,5 M, Imidazol 500 mM contendo cloridrato de guanidina 6M), dialisada exaustivamente contra água destilada, liofilizada e estocada em recipientes hermeticamente fechados, à temperatura ambiente.

6.2 Isolamento da lectina nativa de *Canavalia brasiliensis* (ConBr)

A farinha fina de sementes de *C. brasiliensis* foi extraída com solução de NaCl 0,15M (1:10, m/v) por 12 horas a temperatura ambiente sob agitação constante. A mistura foi então centrifugada a 19.960 x g por 20 minutos a 4 °C, em centrífuga Sorvall RC5B Plus, rotor SS34. O resíduo foi descartado, e o sobrenadante (extrato total) aplicado a uma coluna de Sephadex G-50 (50 x 3 cm) previamente equilibrada com NaCl 0,15M contendo CaCl₂ 5mM e MnCl₂ 5mM. A coluna foi lavada extensivamente com a solução de equilíbrio até que o material não retido fosse completamente eluído ($A_{280} = 0,05$), e em seguida lavada com 2 volumes de água Milli-Q. A lectina retida foi eluída em solução de ácido acético 0,01 N, dialisada exaustivamente contra água destilada, liofilizada e estocada em recipientes hermeticamente fechados, à temperatura ambiente.

6.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e 2-mercaptoetanol (PAGE-SDS)

Os experimentos de eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e 2-mercaptoetanol foram conduzidos de acordo com o protocolo descrito por LAEMMLI

(1970), adaptado para géis montados entre placas de vidro.

Os géis de separação e de aplicação com concentrações finais de poliacrilamida de 12,5 % e 3,5 %, respectivamente, foram montados de acordo com o seguinte protocolo (para volumes finais de 10 e 5 ml, respectivamente):

	Gel de aplicação	Gel de separação
Acrilamida:bisacrilamida (30:0,8 %)	5 ml	625 μ l
Tris-HCl 3 M pH 8,8	1,25 ml	-
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	-	125 ml
SDS 10 % (m/v)	100 μ l	50 μ l
Persulfato de amônio 1,5 % (m/v)	500 μ l	250 μ l
H ₂ O destilada	3,15 ml	2,82 ml
TEMED	5 μ l	5 μ l
Volume final	10 ml	5 ml

As amostras foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,0625 M pH 6,8 contendo SDS 2 % (m/v) e 2-mercaptoetanol 5 % (v/v) (tampão de amostra), e tratadas a 100 °C por 10 minutos. Após resfriadas foram acrescentadas de alguns microlitros de azul de bromofenol 0,1 % (m/v) e de cristais de sacarose.

As corridas eletroforéticas foram realizadas a amperagem constante de 20 mA em tampão Tris 0,025 M pH 8,3 contendo glicina 0,192 M e SDS 0,1 % (m/v).

Após terminada as corridas, as bandas protéicas foram fixadas por imersão do gel em TCA (ácido tricloroacético) 12,5 %, por 30 minutos e visualizadas por coloração com Coomassie Brilliant Blue R-250 0,2 %, em metanol 50 % e ácido acético 10 % (m/v/v), e

os géis descorados com solução de metanol 50 % e ácido acético 10 % (v/v).

6.4 Eletrotransferência para membrana de PVDF e seqüenciamento N-terminal

Os ensaios de eletrotransferência foram realizados conforme as instruções contidas no manual do fabricante da membrana de PVDF (difluoreto de polivilideno) (ProBlottTM, Applied Biosystems, U. S. A).

A membrana de PVDF foi cortada nas dimensões exatas do gel, imersa por alguns segundos em metanol a 100 %, lavada com água mili-Q, e então transferida para um recipiente contendo o tampão de transferência CAPS (ácido 3-[ciclohexilamino]-1-propanosulfônico) 10 mM, pH 11, acrescido de metanol a 10 %.

Logo após terminada a corrida eletroforética, o gel foi imerso no tampão de transferência. A membrana e o gel permaneceram imersos nesse tampão por 15 e 5 minutos, respectivamente, e em seguida, foi montado o “sandwich” com papel de filtro Whatman 3 MM, na seguinte ordem: papel de filtro/membrana/gel/papel de filtro. A eletrotransferência foi realizada aplicando-se ao sistema uma corrente de 1 mA/cm² de gel, durante 20 minutos. Após lavada com água, a membrana foi corada com Commassie Briilliant Blue G-250 a 0,1 % preparada em solução de metanol a 40 % e ácido acético a 1 %, e em seguida descorada com metanol a 50 %. A membrana foi seca e estocada em geladeira.

O seqüenciamento automático N-terminal da rConBr foi realizado em um Seqüenciador Automático de Proteínas e Peptídeos de Líquido Pulsátil modelo 477A/120A da Applied Biosystems (U. S. A.), de acordo com as instruções do fabricante e com o método de degradação de EDMAN (1950).

A amostra dissolvida em TFA (ácido trifluoroacético) a 0,1 % (v/v), foi aplicada

ao suporte previamente tratado com Biobreno e seco com nitrogênio ultra-puro. Após cada ciclo, o PTH-aminoácido (feniltiohidantoina-aminoácido) foi aplicado em uma coluna de fase reversa PTC-222, C₁₈ (5 µm, 220 x 2,1 mm), previamente equilibrada com THF (tetrahydrofurano) a 5 %, contendo 37 ml/l de tampão acetato de sódio 3 M, pH 3,8, 7,5 ml/l de tampão acetato de sódio 3 M, pH 4,6 e 0,5 ml de TMA (trimetilamina) 12,5 %, e eluída com acetonitrila contendo 500 nM de DMPTU (N-dimetil-N'-feniltiouréia). A identificação foi feita por comparação dos tempos de retenção de cada resíduo de PTH-aminoácido da amostra, com os tempos de retenção dos PTH-aminoácidos padrões previamente aplicados à coluna. As etapas foram previamente programadas, e realizadas de maneira automática.

6.5 Experimentos de imunquímica

6.5.1 Produção e purificação de IgG de coelho contra a lectina nativa de *Canavalia brasiliensis*

Para os ensaios de imunquímica foi produzido anticorpo de coelho contra a lectina nativa de *C. brasiliensis*, seguindo o protocolo descrito por CAVADA (1980) e MOREIRA & CAVADA (1984).

Um coelho albino adulto foi sensibilizado com a lectina nativa de *C. brasiliensis*. Inicialmente foram injetados por via intramuscular 10 mg de lectina liofilizada dissolvidos em 0,5 ml de NaCl 0,15 M, e 0,5 ml de adjuvante completo de Freund.

A primeira dose de reforço (1 mg de lectina dissolvido em 1 ml de NaCl 0,15 M) foi aplicada por via subcutânea após 7 dias. Decorridos 15 dias do primeiro reforço foi feita a primeira sangria na orelha do animal, e um reforço igual ao anterior, repetindo-se

este protocolo em intervalos de 7 dias, até a obtenção de quantidade suficiente de antissoro.

O sangue coletado em cada sangria permaneceu incubado a 37 °C por uma hora, sendo então centrifugado a 3.000 rpm por 15 minutos, em centrífuga de bancada, e os soros obtidos mantidos congelados até o isolamento de IgG.

Para o isolamento de IgG, as alíquotas de soro obtidas nas diversas sangrias foram reunidas e precipitadas com sulfato de amônio a 33 % de saturação, e após repouso de 24 horas sob refrigeração, foram centrifugadas a 17.600 x g por 20 minutos a 4 °C, em centrífuga Sorvall RC5B Plus, rotor SS34. O precipitado foi ressuspensão em água destilada e dialisado exaustiva e alternadamente contra ácido acético 0,05 M pH 5,0 e água destilada. Após uma última diálise contra tampão acetato foi realizada uma centrifugação a 19.960 x g, por 20 minutos a 4 °C, e o sobrenadante obtido aplicado em coluna de DEAE - Sepharose (30 x 5 cm) previamente equilibrada com tampão acetato. O pico não retido, eluído com o mesmo tampão foi coletado, dialisado contra água, liofilizado e acondicionado em frasco herméticamente fechado, a temperatura ambiente.

O anticorpo anti-ConBr produzido em coelho imunizado com a ConBr e purificado em coluna de DEAE-Sepharose, foi utilizado nos ensaios de imunodifusão dupla de Ouchterlony e "Western blotting", realizados para as lectinas nativa e recombinante de *C. brasiliensis*.

6.5.2 Imunodifusão dupla de Ouchterlony

A técnica utilizada foi a descrita por CLAUSEN (1969). Uma preparação de agarose a 1 % em NaCl 0,15 M contendo 0,02 % de azida sódica foi fundida e montada em lâminas de microscópio sobre superfície nivelada. Após a solidificação, foram feitos um orifício central e orifícios radiais equidistantes com auxílio de um furador de 2,5 mm

de diâmetro.

Nos orifícios radiais foram aplicados 5 μ l das diluições 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 da solução de lectina (1 mg/ml) ou do anticorpo (10 mg/ml) em NaCl 0,15 M contendo CaCl₂ 5mM e MnCl₂ 5 mM, e cloritrado de guanidina 1M. Um desses orifícios recebeu 5 μ l das soluções iniciais de lectina ou anticorpo. Estas soluções foram aplicadas também aos orifícios centrais.

Após incubação em câmara úmida à temperatura ambiente (25 °C) por 48 horas e formação dos arcos de precipitação, as lâminas foram lavadas em NaCl 0,15 M contendo azida sódica a 0,02 % por 48 horas, com diversas trocas. O NaCl 0,15 M foi eliminado pela imersão das lâminas em água destilada, trocada várias vezes durante 24 horas. O gel de agarose após seco em papel de filtro foi corado com Coomassie Brilliant Blue R-250 0,1% em metanol, ácido acético e água (4,0; 7,5; 3,0 v/v/v) por alguns segundos, e o excesso de corante removido com a solução descorante utilizada para geis de PAGE-SDS (item 6.3).

6.5.3 Imunodeteção de proteínas imobilizadas em membrana ("Western Blotting")

A técnica de transferência de proteínas de um gel de poliacrilamida para uma membrana de nitrocelulose, onde estas permanecem imobilizadas, é conhecida por "Western blotting". Foram utilizadas pinças e luvas na montagem do aparato de transferência, para evitar a marcação da membrana com proteínas das mãos, assim como a interferência de gordura na transferência das proteínas.

Após as corridas eletroforéticas, as proteínas dos geis (9 x 7 cm) foram transferidas para membranas de nitrocelulose (SIGMA), com poros de 20 μ m, em cuba de eletrotransferência vertical (Mini V8 Life Technologies Gibco BRL), utilizando-se como solução de transferência o tampão Tris-HCl 25 mM pH 8,3, Glicina 185 mM, Metanol 20

%, SDS 0,01 %, previamente resfriado, em um volume final de 1.000 ml. A voltagem foi mantida constante, a 150 V, por uma fonte Pharmacia LBK GPS 200/400, e o tempo de transferência foi de 1:30 horas, por gel. Todo o processo de transferência foi realizado sob agitação constante e orbital, mantendo-se a cuba em banho de gelo.

Para confirmar a eficiência da transferência, as membranas foram coradas por 5 minutos com solução de Ponceau 0,2 %, ácido acético 1 %, em água. Após lavadas com água destilada, para eliminar o excesso de corante, e visualizar a presença das proteínas imobilizadas na membrana, as posições dos marcadores de massa molecular foram marcadas com caneta esferográfica.

As membranas permaneceram incubadas por 17 horas, sob agitação orbital e constante, à temperatura de 25 °C, no tampão de lavagem (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 0,15 M, Tween-20 0,05 %, glicose 0,1 M) contendo 5 % de leite desnatado (Molico), para bloqueamento dos sítios ativos livres. Foram, então, imersas no mesmo tampão contendo 5 % de leite desnatado (Molico) e anticorpo primário (anti-ConBr) produzido em coelho (item 6.5.1) numa diluição de 1:300, por 2 horas, sob agitação constante e orbital, à temperatura de 25 °C. Em seguida, foram submetidas a 5 lavagens de 10 minutos cada, em tampão de lavagem acrescido de 5 % de leite desnatado (Molico), nas mesmas condições, para que fosse eliminado o excesso de anticorpo primário não ligado às proteínas retidas na membrana.

O anticorpo de cabra anti-coelho complexado à peroxidase (Calbiochem) foi utilizado como anticorpo secundário. As membranas foram lavadas em tampão de lavagem contendo 5 % de leite desnatado (Molico) e o anticorpo secundário em diluição 1:2.000, por 2 horas, sob agitação constante e orbital, à temperatura de 25 °C, e então submetidas a 5 lavagens de 10 minutos cada, no mesmo tampão, e iguais condições, para eliminar o excesso de anticorpo secundário não ligado ao anticorpo primário.

A revelação das membranas foi realizada por imersão em solução reveladora composta de Diaminobenzidina (DAB) 100 µg/ml, Cloreto de Níquel 400 µg/ml, 0,04 % de Peróxido de Hidrogênio 30 volumes, em tampão Tris-HCl 100 mM pH 7,2, preparada no momento da revelação, por 10 minutos, no escuro, à temperatura de 25 °C, e a reação foi interrompida pela lavagem das membranas com água destilada. Após secas, as membranas foram envolvidas em papel laminado, e posteriormente, fotografadas.

6.6 Cromatografia de fase reversa em coluna de C₁₈ acoplada a sistema HPLC

As lectinas recombinante e nativa de *C. brasiliensis* foram dissolvidas em 300 µl de ácido trifluoroacético (TFA) a 0,1 %, filtradas em membranas de 0,22 µm, e aplicadas individualmente a uma coluna C₁₈ Waters (4,5 x 150 mm), previamente equilibrada com TFA a 0,1 %, acoplada a um sistema de HPLC Waters. Após a aplicação da amostra, a coluna foi lavada por 5 minutos com solução de equilíbrio, e a seguir foi aplicado um gradiente linear de acetonitrila em TFA a 0,1 % (de 0 a 50 % em 60 minutos, de 50 a 100 % em 10 minutos e a 100 % durante outros 10 minutos). A eluição foi realizada a um fluxo constante de 1 ml/min, e os picos detectados a 216 nm.

6.7 Cromatografias de afinidade

6.7.1 Cromatografia de afinidade em coluna de anticorpos policlonais de coelho contra a lectina nativa de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) imobilizados em Sepharose

Foram preparadas soluções (1 mg/ml) das lectinas liofilizadas em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,6, NaCl 0,15 M, CaCl₂ 5mM, MnCl₂ 5 mM, glicose 0,1 M contendo

cloritrado de guanidina 1M, e aplicados à coluna (5 ml de gel), previamente equilibrada com o mesmo tampão, uma concentração final de 2,5 mg de proteína. As amostras permaneceram em contato com a matriz por 1 hora, sendo o material não retido eluído por lavagem exaustiva com tampão de equilíbrio. O material retido foi eluído em tampão glicina 0,1 M pH 2,6, e posteriormente em tampão trietanolamina 0,1 M pH 11.

6.7.2 Cromatografias de afinidade com açúcares imobilizados e polissacarídeos

Para verificar diferenças de afinidade entre as lectinas recombinante e nativa de *Canavalia brasiliensis* foram realizadas cromatografias de afinidade em diferentes matrizes. Foram preparadas soluções (1 mg/ml) da ConBr liofilizada em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,6, NaCl 0,15 M, CaCl₂ 5mM, MnCl₂ 5 mM, e da rConBr liofilizada no mesmo tampão acrescido de cloritrado de guanidina 1 M, e aplicados em cada coluna uma concentração final de 2,5 mg de proteína. As amostras permaneceram aproximadamente 17 horas em contato com as matrizes cromatográficas, sendo o material não retido eluído por lavagem exaustiva das matrizes com tampão de equilíbrio (Tris-HCl 0,1 M, pH 7,6, NaCl 0,15 M, CaCl₂ 5mM, MnCl₂ 5 mM).

6.7.2.1 Cromatografia de afinidade em colunas de Sephadex G-50 e Sephadex G-75

A eluição do material ligado às matrizes foi obtida em tampão de equilíbrio contendo glicose 0,1 M e em tampão glicina 0,1 M pH 2,6. Os volumes dos géis foram de 4 ml e 9 ml para as colunas de Sephadex G-50 e de Sephadex G-75, respectivamente.

6.7.2.2 Cromatografia de afinidade em coluna de Manose-Agarose

A coluna cromatográfica utiliza continha 2,3 ml de gel de agarose-manose e o material retido foi eluído inicialmente em tampão de equilíbrio contendo manose 0,1 M, e então em tampão glicina 0,1 M pH 2,6.

6.8 Atividades biológicas

6.8.1 Determinação da atividade hemaglutinante da rConBr e ConBr

A atividade hemaglutinante das lectinas recombinante e nativa de *C. brasiliensis* foi determinada por diluições seriadas em tubos de ensaio. Foram preparadas soluções das lectinas liofilizadas na concentração de 2 mg/ml em tampão Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,15 M, CaCl₂ 5 mM, MnCl₂ 5 mM, pH 7,6, contendo cloridrato de guanidina 0,4 M. A cada tubo de ensaio foram adicionados 200 µl de Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 7,6 contendo CaCl₂ 5 mM e MgCl₂ 5 mM. Ao primeiro tubo de ensaio foram adicionados 200 µl de solução de lectina (2 mg/ml), e uma série de diluições duplas foi feita (1/2, 1/4, 1/8, etc), homogeneizando-se completamente os tubos antes de cada transferência. A cada tubo de ensaio foram adicionados 200 µl de eritrócitos de coelho ou humano (dos grupos sanguíneos A, B e O) a 2 % (v/v), normais ou tratados com papaina, bromelaina ou tripsina, e a reação incubada a 37 °C por 30 minutos. Após repouso por 30 minutos à temperatura ambiente, a leitura dos ensaios foi realizada por inspeção macroscópica da ocorrência de aglutinação, e o título expresso em unidade de hemaglutinação (UH), que é o inverso da maior diluição da amostra que apresente uma nítida aglutinação.

6.8.2 Efeito da injeção intraperitoneal da rConBr e ConBr em induzir a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos.

Grupos de seis animais (ratos Wistar) foram injetados com 300 μ g de rConBr ou ConBr em 1 ml de NaCl 0,15 M contendo cloridrato de guanidina 2 M, por via intraperitoneal (i.p.), e sacrificados por deslocamento cervical após quatro horas. As cavidades peritoneais foram lavadas com 10 ml de salina contendo 5 UI/ml de heparina. Após leve massagem e exposição dos peritôneos foram coletados 6 ml de exudatos peritoneais com pipeta de Pasteur de plástico. As contagens total e diferencial de leucócitos foram realizadas de acordo com a técnica descrita por SOUZA & FERREIRA (1985).

O grupo de animais controle (seis ratos Wistar) foi injetado com 1 ml de NaCl 0,15 M contendo cloridrato de guanidina 2 M, e tratados de forma idêntica àqueles injetados com as soluções de lectinas.

Alíquotas de 20 μ l de exudato peritoneal de cada rato foram diluídas em 380 μ l de líquido de Turk (ácido acético 2 %, violeta de genciana 0,2 %, em água destilada, v/v/v) (diluição 1:20) e a contagem total de leucócitos foi realizada em câmara de Neubauer. Para a contagem diferencial de neutrófilos foram preparados esfregaços em lâminas com 25 μ l do exudato, em centrífuga à 2.800 rpm, por 10 minutos, e corados com May-Grunwald-Giensa (0,15 %, 0,1 %, metamol, m/m/v). A contagem de neutrófilos foi realizada em microscópio óptico, sendo contadas 100 células por lâmina. O número total de neutrófilos foi calculado através dos percentuais encontrados, e os resultados expressos como a média \pm E.P.M. (erro padrão da média) do número de neutrófilos/ μ l do lavado peritoneal.

6.8.3 Efeito de açúcares sobre a migração de neutrófilos induzida pela injeção intraperitoneal de rConBr e ConBr em ratos.

As lectinas rConBr e ConBr ((300 µg) foram administradas por via intraperitoneal (i.p.) juntamente com 0,1 M de α -metil-D-manosídeo ou 0,1 M de α -D-galactose, e as contagens total e diferencial foram realizadas como descrito no item 6.8.2.

6.8.4 Efeito edematogênico induzido pela injeção intraplantar subcutânea de rConBr e ConBr em ratos

As lectinas nativa e recombinantes (300 µg/pata dissolvidas em 1 ml de NaCl 0,15 M contendo cloridrato de guanidina 2 M) foram injetadas por via intraplantar subcutânea na pata direita de cada animal (grupos de 6 ratos Wistar). Antes da injeção dos estímulos inflamatórios, foi medido o volume da pata direita de cada animal, utilizando-se para isso um pletismômetro (Ugo Basili).

Os volumes das patas injetadas foram medidos após 30 minutos e 1, 2, 3 e 4 horas da administração dos estímulos. E o edema foi calculado como a variação de volume (Δ de volume), ou seja, a diferença entre o volume em um determinado tempo após o estímulo e o volume antes do estímulo inflamatório (tempo 0).

Os animais controle (6 ratos Wistar) foram injetados com o mesmo volume de NaCl 0,15 M contendo cloridrato de guanidina 2 M, e as medidas dos edemas de pata realizadas como descrito para os ratos injetados com soluções de lectinas.

6.8.5 Efeito de açúcares sobre o desenvolvimento de edema de pata induzido pela injeção intraplantar subcutânea de rConBr e ConBr em ratos.

As lectinas rConBr e ConBr (300 µg) foram administradas por via intraplantar subcutânea juntamente com 0,1 M de α -metil-D-manosídeo ou 0,1 M de α -D-galactose, e as medidas de volumes dos edemas realizadas como descrito no item 6.8.4.

6.8.6 Efeito da liberação de histamina por mastócitos peritoneais de ratos induzida pela rConBr e ConBr

Inicialmente os animais (ratos Wistar com 180-300 g) foram sensibilizados para ovalbumina, através da injeção subcutânea de 1 ml da solução de 1 mg de ovalbumina e 200 mg de hidróxido de albumina em Tyrode (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, CaCl₂ 1 mM, NaH₂O₄ 0,4 mM, NaHCO₃ 12 mM, glicose 5,5 mM, pH 7,4), e utilizados de 21 a 25 dias, após sensibilizados.

As suspensões celulares contendo mastócitos peritoneais foram preparadas por lavagem da cavidade peritoneal dos animais com solução Tyrode contendo heparina (5 UI/ml), centrifugação a 150 x g por 5 minutos, á temperatura ambiente, e lavagem por duas vezes em solução Tyrode.

Para avaliar a indução da liberação de histamina, as células (0,5 ml) foram aquecidas em banho de água a 37 °C por 5 minutos, adicionadas de diferentes concentrações das lectinas (20 µl), e incubadas por 10 minutos, sendo a reação interrompida pela adição de 1,5 ml de solução Tyrode resfriada a 4 °C. Foram então centrifugadas (150 x g, 4 °C, 5 minutos), e adicionadas de igual volume de solução Tyrode.

Os sobrenadantes foram coletados em tubos limpos. Todas as amostras continham ácido perclórico numa concentração final de 0,4 M.

A liberação de histamina nas células e nos sobrenadantes foi determinada fluorometricamente (SHORE *et al.*, 1959), utilizando-se um aparelho automático (Technicon Autoanalyser II) para extração e quantificação.

6.8.7 Análise estatística

Para todos os experimentos de atividade biológica foram calculadas as médias \pm E.P.M. de um certo número de eventos (n) em cada grupo. A diferença estatística entre os grupos foi determinada por análise de variância (ANOVA) e teste de Ducan para múltiplas comparações. O $p < 0,05$ foi fixado para indicar significância estatística.

7 RESULTADOS

7.1 Expressão da lectina recombinante (rConBr) de *Canavalia brasiliensis* em células de *Escherichia coli*

O vetor de expressão pETconbr contém um inserto de 870 pb que corresponde a região codificadora do produto primário de tradução do mRNA da lectina de *Canavalia brasiliensis*, a pre-pro-ConBr.

Quando analisado por PAGE-SDS, o lisado de células de *E. coli* BL21(λ DE3) contendo o vetor pETconbr, crescidas até uma OD₆₀₀ de 0,6-1,0 e induzidas por 5 h com IPTG 1 mM, contém uma proteína com massa molecular aparente de 37 kDa (FIGURA 12, linha 4), não encontrada no extrato total das células antes da adição de IPTG ao meio de cultivo (FIGURA 12, linha 2). Essa banda protéica de 37 kDa é a única induzida pelo IPTG nas células recombinantes.

O fracionamento das proteínas citoplasmáticas do lisado celular após indução com IPTG e análise por PAGE-SDS revelou que praticamente toda a proteína induzida permanece na fração insolúvel na forma de corpos de inclusão (FIGURA 13). Os corpos de inclusão foram purificados através de duas lavagens consecutivas com um tampão contendo Triton X-100 para a remoção de proteínas de membrana e fragmentos da parede celular bacteriana. Este procedimento produziu corpos de inclusão que consistiam, como visto através de análise por PAGE-SDS, quase que exclusivamente da proteína induzida e de uma segunda banda protéica de origem bacteriana com massa molecular aparente de 35 kDa. A banda protéica de 35 kDa presente nos corpos de inclusão é provavelmente a β -

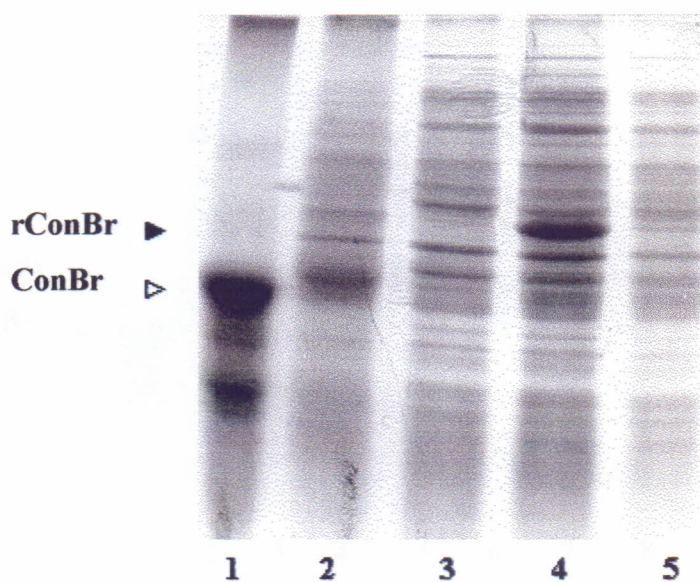


FIGURA 12 - Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (PAGE-SDS, 12,5%) do extrato total e do meio de cultura de células de *E. coli* BL21 (λ DE3) transformadas com o vetor de expressão pETconbr, crescidas na ausência ou na presença de IPTG 1 mM. Linha 1: ConBr nativa, utilizada como padrão; Linha 2: Extrato total de células não induzidas; Linha 3: Meio de cultura das células não induzidas; Linha 4: Extrato total de células induzidas; Linha 5: Meio de cultura das células induzidas.

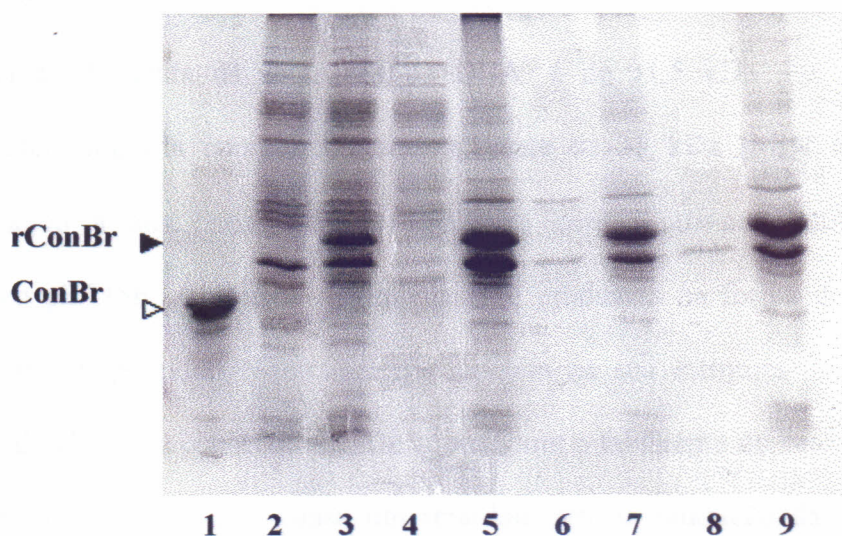


FIGURA 13 - Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (PAGE-SDS, 12,5%) do extrato total e de frações subcelulares de células de *E. coli* BL21 (λ DE3) transformadas com o vetor de expressão pETconbr, crescidas na ausência (linha 2) e na presença de IPTG 1 mM (linha 3). Linha 1: ConBr nativa, utilizada como padrão; Linha 4: fração solúvel do lisado de células induzidas com IPTG 1mM; Linha 5: fração insolúvel (corpos de inclusão) do lisado de células induzidas com IPTG 1mM; Linhas 6 e 8: sobrenadantes das lavagens dos corpos de inclusão; Linhas 7 e 9: Corpos de inclusão purificados.

Lactamase, enzima responsável pela resistência das células recombinantes a ampicilina, cujo gene está localizado no plasmídeo.

A massa molecular da pre-pro-ConBr, calculada a partir da seqüência de aminoácidos deduzida da seqüência de DNA, é de 31,5 kDa. Por PAGE-SDS, esse polipeptídeo migraria com uma massa aparente de 35 kDa (MIN & JONES, 1992), considerando a alta homologia de seqüência com a pre-pro-ConA. Entretanto, no plasmídeo pET15b, a proteína recombinante é produzida na forma de uma proteína de fusão com um peptídeo N-terminal que contém na sua estrutura uma seqüência de 6 resíduos de Histidina consecutivos. De acordo com o fabricante do vetor, a presença desse peptídeo rico em Histidina causa um retardamento na migração da proteína induzida, acarretando num aumento de cerca de 2 kDa em sua massa aparente. Levando em consideração todos esses fatos, o valor de 37 kDa da banda induzida é aproximadamente a massa molecular aparente esperada para a pre-pro-ConBr.

Em experimentos de "Western Blotting", a banda de 37 kDa induzida pelo IPTG nas células recombinantes de *E. coli* foi reconhecida especificamente por anticorpos policlonais de coelho contra a ConBr nativa (anti-ConBr) isolada de sementes maduras de *C. brasiliensis* (FIGURAS 14 e 15). Nenhuma banda protéica foi reconhecida no lisado das bactérias não induzidas bem como no meio de cultura das células induzidas (FIGURA 14). Esses resultados confirmam a identidade da proteína sintetizada em *E. coli* em resposta ao IPTG como sendo a pre-pro-ConBr. Além disso, esses resultados mostram que praticamente toda a lectina sintetizada nas células de *E. coli* permanece no interior da célula, não sendo secretada para o meio.

Nos experiemntos de PAGE-SDS e "western blotting", a ConBr nativa, que apresenta uma massa molecular aparente de 30 kDa, foi incluída como controle. A diferença entre a massa da pre-pro-ConBr (37 kDa) expressa em *E.coli* e a massa a lectina

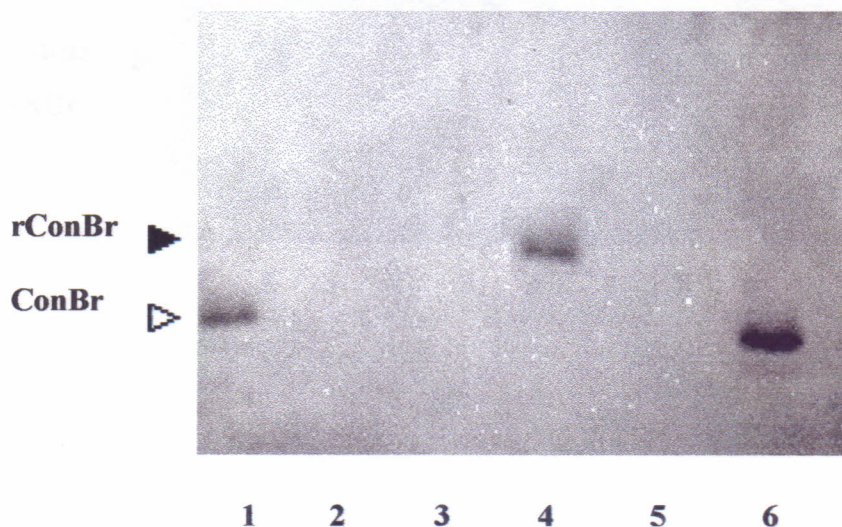


FIGURA 14 - Imunodeteccção ("western blotting") da rConBr expressa em células de *E. coli* BL21(λ DE3) contendo o vetor pETconbr e induzidas com IPTG 1 mM. As amostras foram submetidas a eletroforese em condições desnaturantes (PAGE-SDS, 12,5%), transferidas para uma membrana de nitrocelulose e detectadas com anticorpos policlonais de coelho anti-ConBr. Linhas 1 e 6: ConBr nativa, utilizada como padrão; Linha 2: Extrato total das células não induzidas; Linha 3: Meio de cultura das células não induzidas; Linha 4: Extrato total das células induzidas; Linha 5: Meio de cultura das células induzidas.

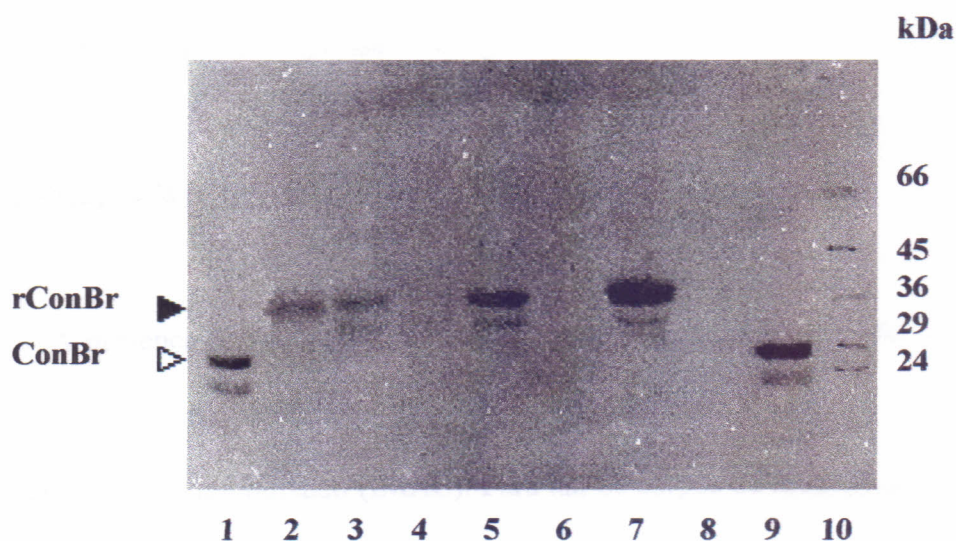


FIGURA 15 - Imunodeteccção ("western blotting") da rConBr expressa em células de *E. coli* BL21(λ DE3) contendo o vetor pETconbr e induzidas com IPTG 1 mM. As amostras foram submetidas a eletroforese em condições desnaturantes (PAGE-SDS, 12,5%), transferidas para uma membrana de nitrocelulose e detectadas com anticorpos policlonais de coelho anti-ConBr. Linhas 1 e 9: ConBr nativa, utilizada como padrão; Linha 2: Extrato total das células induzidas; Linha 3: fração insolúvel (corpos de inclusão) do lisado de células induzidas com IPTG 1mM; Linha 4: fração solúvel do lisado de células induzidas com IPTG 1mM; Linhas 5 e 7: Corpos de inclusão purificados; Linhas 6 e 8; sobrenadante das lavagens dos corpos de inclusão; Linha 10: marcadores de massa molecular (Tripsinigênio de pâncreas bovino: 24 kDa; Anidrase carbônica de eritrócitos bovinos: 29 kDa; Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase de músculos de coelho: 36 kDa; ovoalbumina de ovos de galinha: 45 kDa; Albumina sérica bovina: 66 kDa).

nativa (30 kDa) deve ser atribuída a ausência de qualquer processamento pós-traducional na pre-pro-ConBr quando expressa no citoplasma de *E. coli*.

7.2 Purificação da rConBr produzida em células de *Escherichia coli*

A presença do peptídeo N-terminal rico em histidina na rConBr expressa em *E. coli* foi explorada na purificação da proteína recombinante através de cromatografia de afinidade em metal imobilizado (IMAC). Para tal, os corpos de inclusão purificados foram solubilizados em um tampão contendo cloridrato de guanidina 6M e a fração solúvel aplicada a uma coluna de Sepharose "Fast Flow" contendo níquel imobilizado (FIGURA 16). Após a eluição das proteínas de origem bacteriana (picos I e II), a rConBr (pico III) foi eluída de maneira específica com o tampão de equilíbrio contendo imidazol 0,5 M, o qual compete com os resíduos de histidina presentes na extremidade N-terminal da rConBr pelo níquel imobilizado.

Quando submetido a análise eletroforética (PAGE-SDS), o pico III da cromatografia de afinidade em níquel imobilizado revelou uma banda protéica majoritária com massa molecular aparente de 37 kDa, semelhante à banda induzida em células de *E. coli* por IPTG e recuperada nos corpos de inclusão (FIGURAS 17 e 18). Nenhuma banda com mobilidade eletroforética semelhante foi observada nos picos I e II (FIGURA 17), o que demonstra a eficiência de ligação da matrix utilizada na purificação da lectina recombinante.

A banda de 37 kDa purificada por IMAC foi reconhecida por anticorpos policlonais anti-ConBr (FIGURA 19). Nenhum reconhecimento foi observado entre os anticorpos anti-ConBr e as proteínas dos picos I e II, as quais são de origem bacteriana.

Estes resultados confirmam a identidade da proteína isolada por IMAC como

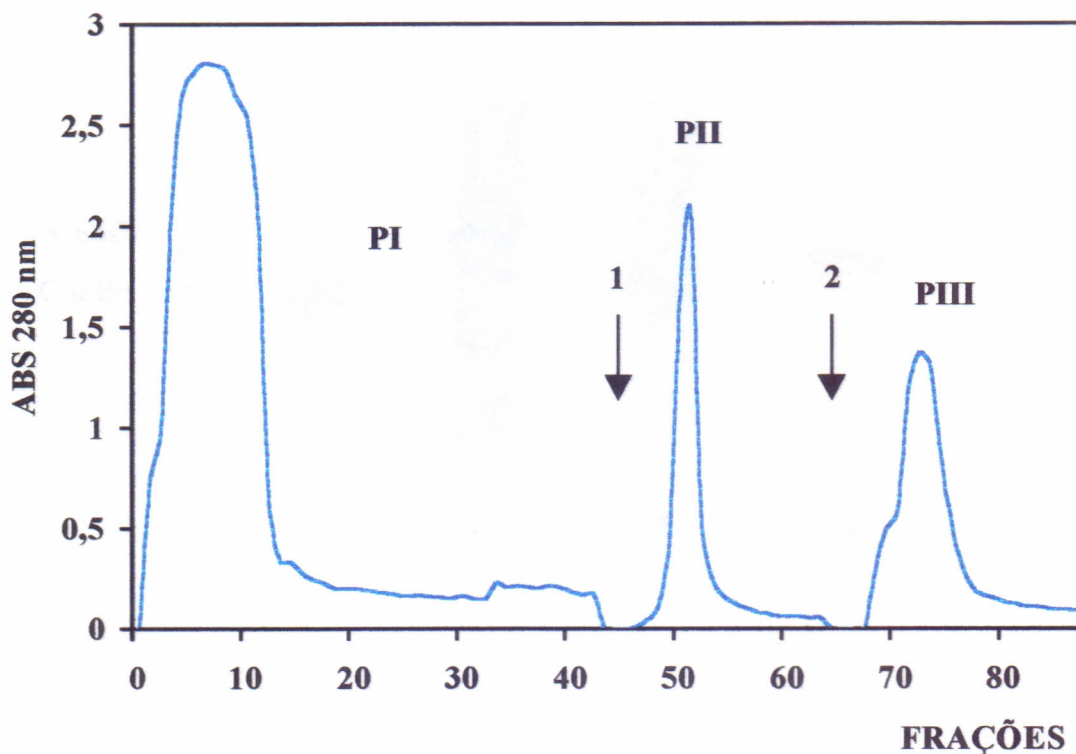


FIGURA 16 - Purificação da lectina recombinante (rConBr) de *Canavalia brasiliensis* por cromatografia de afinidade em níquel imobilizado (IMAC). Os corpos de inclusão foram solubilizados em tampão de solubilização (Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 0,5 M, Imidazol 5 mM contendo cloridrato de guanidina 6M). As proteínas bacterianas foram eluídas nos picos I e II, em tampão de solubilização e de lavagem (Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 0,5 M, Imidazol 50 mM contendo cloridrato de guanidina 6M) (1), respectivamente. A rConBr foi eluída integralmente no pico III, em tampão de eluição (Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 0,5 M, Imidazol 500 mM contendo cloridrato de guanidina 6M) (2).

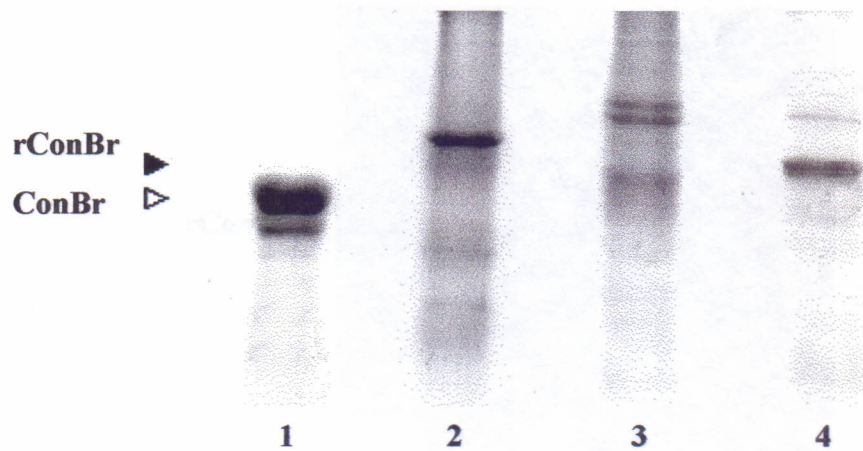


FIGURA 17 - Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (PAGE-SDS, 12,5%) das frações cromatográficas obtidas durante a purificação da rConBr por cromatografia de afinidade em níquel imobilizado em Sepharose. Linha 1: ConBr nativa, utilizada como padrão; Linha 2: Pico 1; Linha 3: Pico II; Linha 4: Pico III, rConBr purificada.

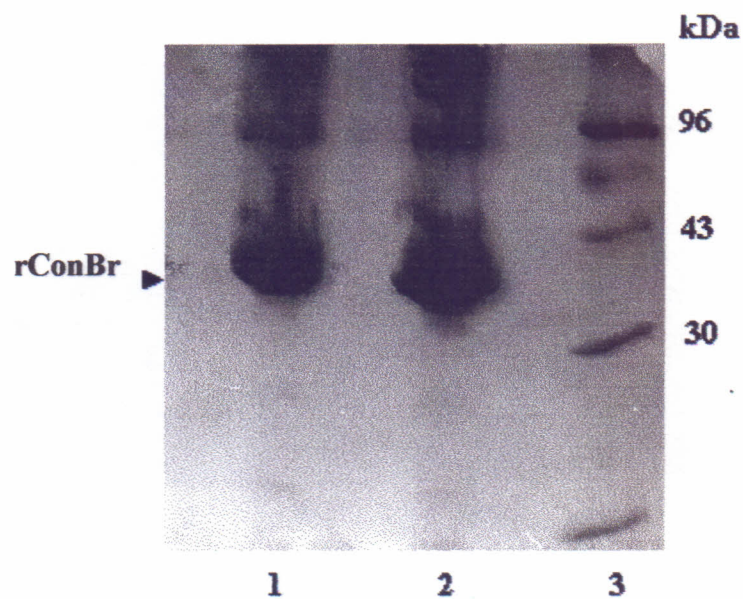


FIGURA 18 - Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (PAGE-SDS, 12,5%) da rConBr expressa em células de *E. coli* BL21(λ DE3) contendo o vetor de expressão *pETconbr*, e purificadas por cromatografia de afinidade em níquel imobilizado. Linhas 1 e 2: rConBr purificada; Linha 3: Marcadores de massa molecular.

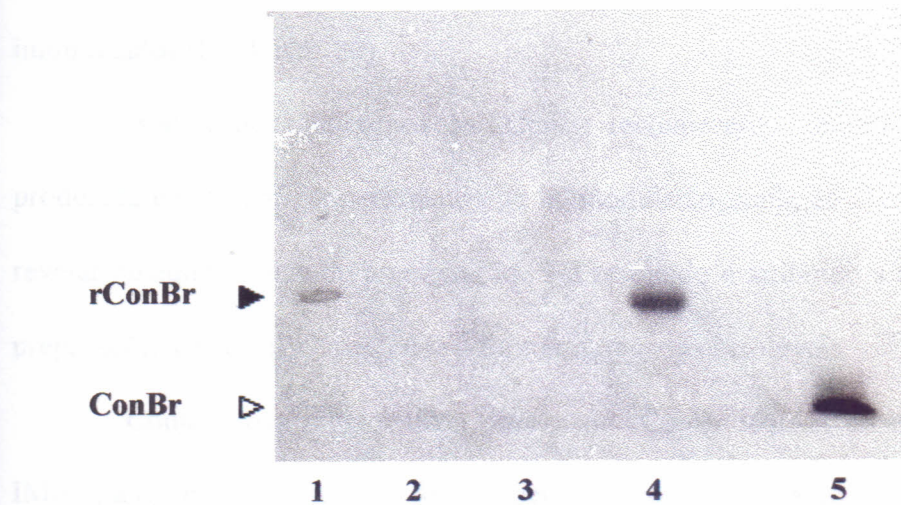


FIGURA 19 - Imunodeteção ("western blotting") da rConBr nas frações cromatográficas obtidas durante a sua purificação por cromatografia de afinidade em níquel imobilizado em Sepharose. As amostras foram submetidas a eletroforese em condições desnaturantes (PAGE-SDS, 12,5%), transferidas para uma membrana de nitrocelulose, e detectadas com anticorpos policlonais de coelho anti-ConBr. Linha 1: Extrato total das células induzidas; Linha 2: Pico I; Linha 3: Pico II; Linha 4: Pico III; Linha 5: ConBr nativa, utilizada como padrão.

sendo a pre-pro-ConBr, revelando o alto grau de pureza da rConBr purificada por este método.

A identidade imunológica da proteína purificada por IMAC foi também demonstrada por cromatografia de afinidade em coluna de anticorpos anti-ConBr imobilizados (FIGURA 20).

Apesar dos anticorpos anti-ConBr reconhecerem imunologicamente a rConBr produzida em *E. coli*, experimentos de imunodifusão dupla de Outcherlony falharam em revelar qualquer banda de precipitação. Tal resultado é atribuído a alta insolubilidade das preparações de rConBr, que tende a formar agregados insolúveis.

Como prova adicional da pureza da rConBr isolada de células de *E. coli* por IMAC, a lectina recombinante foi submetida a cromatografia de fase reversa em coluna de C₁₈ acoplada a um sistema de HPLC. Dois picos (FIGURA 21) foram obtidos na eluição da proteína recombinante com um gradiente linear de acetonitrila (0 a 100 % em 30 minutos). Um perfil cromatográfico semelhante foi obtido para a ConBr nativa submetida ao mesmo tipo de cromatografia, nas mesmas condições. Tanto na rConBr como na ConBr nativa, os dois picos devem corresponder às formas monomérica e agregada da lectina.

O rendimento da lectina recombinante expressa em células de *E. coli* variou de 15 a 30 mg por litro de cultura nas várias induções realizadas.

7.3 Seqüenciamento N-terminal

A seqüência de aminoácidos da extremidade N-terminal, obtida por degradação automática de Edman, a partir da rConBr purificada por IMAC e transferida para uma membrana de PVDF, foi a seguinte: GSSHHHHHSSGLVPRGSMAISKK. A seqüência GSSHHHHHSSGLVPRGS é proveniente do plasmídeo pET15b, com os seis resíduos de

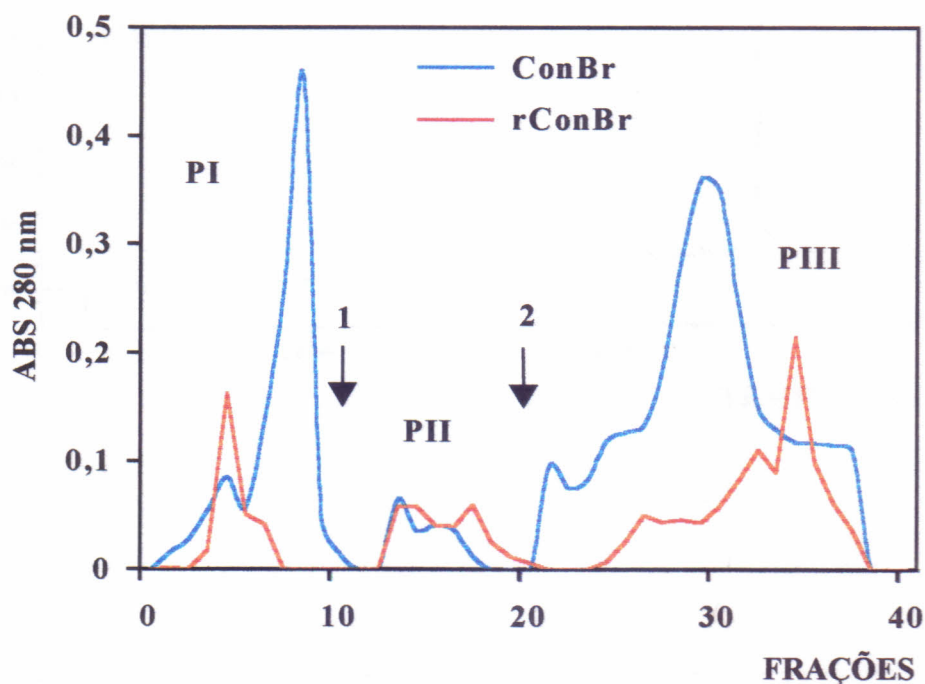


FIGURA 20 - Cromatografia de afinidade das lectinas recombinante (rConBr) e nativa (ConBr) de *Canavalia brasiliensis* em coluna de anti-ConBr imobilizado em Sepharose. As amostras foram solubilizadas em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,6, NaCl 0,15 M, CaCl₂ 5mM, MnCl₂ 5 mM, glicose 0,1 M contendo cloridrato de guanidina 0,4 M. Foram aplicados 2,5 mg de cada lectina. Pico I: eluído com tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,6, NaCl 0,15 M, CaCl₂ 5mM, MnCl₂ 5 mM; Pico II: eluído com tampão glicina 0,1 M (1); Pico III: eluído com tampão trietanolamina 0,1 M, pH 11 (2).

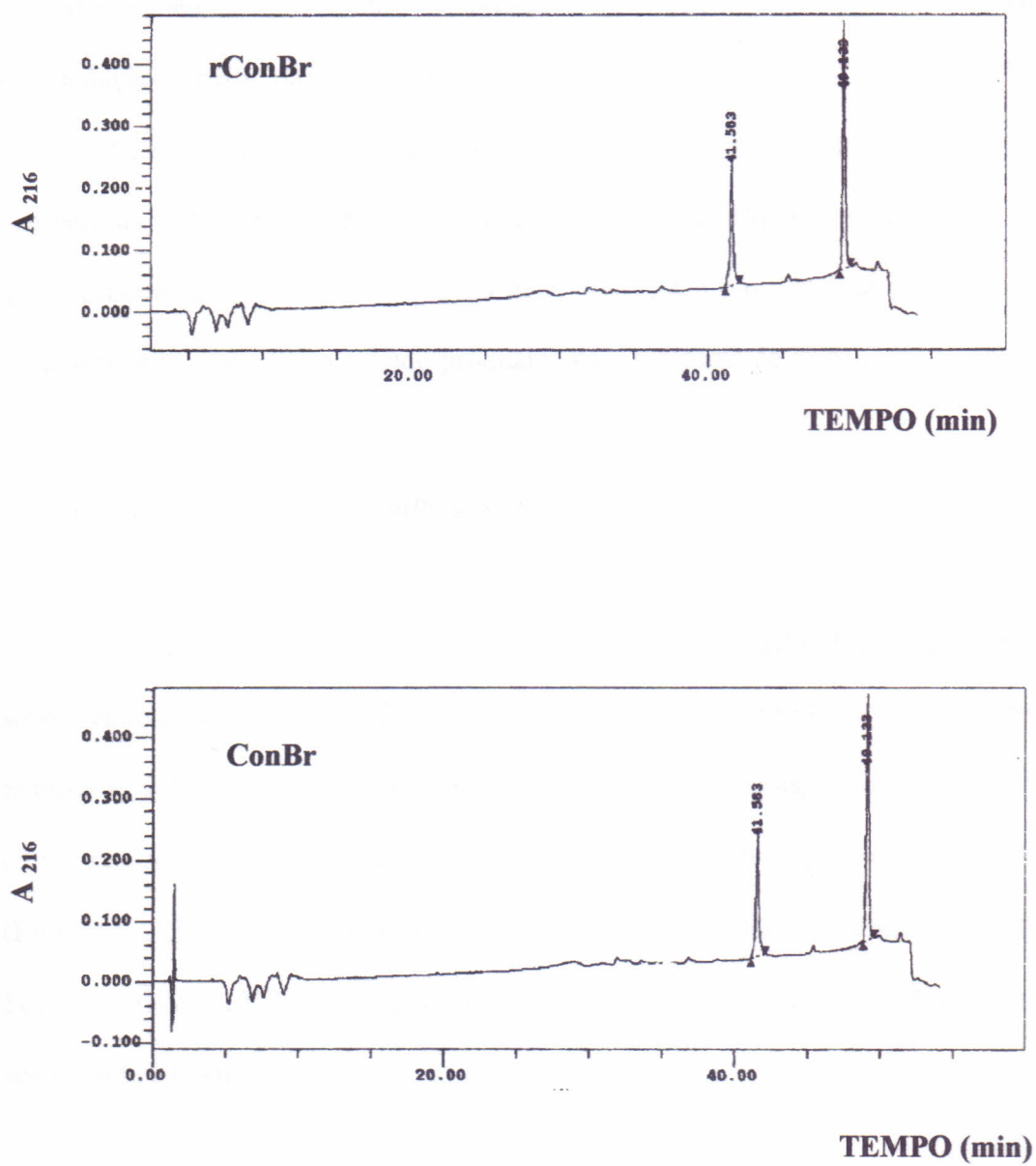


FIGURA 21 - Cromatografia de fase reversa em coluna C₁₈ acoplada a sistema HPLC das lectinas recombinante (rConBr) e nativa (ConBr) de *Canavalia brasiliensis*.

histidina seguidos de um sítio de clivagem para Trombina (LVPRGS). A seqüência MAISKK é idêntica aos primeiros seis resíduos do peptídeo sinal da pre-pro-ConBr, obtida por dedução a partir da seqüência de DNA (GRANGEIRO, 1996; GRANGEIRO *et al*, 1997a). Este resultado, juntamente com o valor encontrado para a massa molecular aparente da lectina expressa em *E. coli* e purificada por IMAC, demonstram claramente que o produto primário de tradução do gene *conbr*, a pre-pro-lectina, não sofre qualquer processamento proteolítico quando produzida no citoplasma de *E. coli*.

7.4 Interação da rConBr com carboidratos

A capacidade da rConBr em interagir com carboidratos foi determinada submetendo-se a lectina purificada a cromatografias de afinidade em Sephadex G-50, Sephadex G-75 e Manose-agarose. Em todas as cromatografias, a ConBr nativa foi usada como controle positivo. A rConBr praticamente não interagiu com Sephadex G-50 (FIGURA 22) nem com Manose-agarose (FIGURA 23), mas interagiu fortemente com Sephadex G-75 (FIGURA 24), sendo eluída do gel com tampão a pH 2,6, de maneira semelhante à ConBr nativa.

7.5 Atividades biológicas da lectina recombinante (rConBr) de *Canavalia brasiliensis*

7.5.1 Atividade hemaglutinante

A atividade hemaglutinante da rConBr foi determinada em tubos de ensaio frente a hemácias de coelho e humanas (A, B e O), tanto nativas como tratadas com proteases (bromelaina, papaina e tripsina). Quando hemácias de coelho foram usadas, a rConBr foi

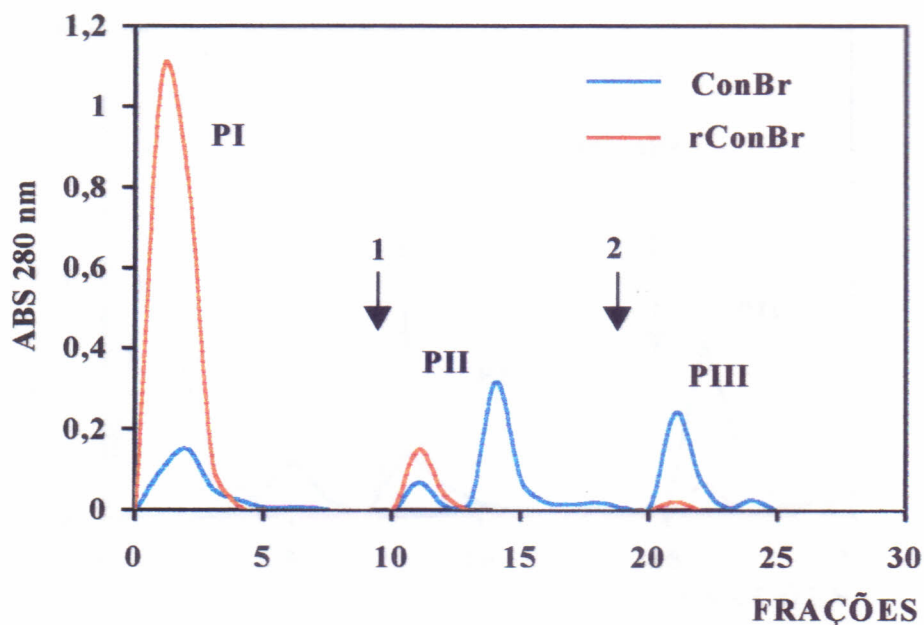


FIGURA 22 - Cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50 das lectinas recombinante (rConBr) e nativa (ConBr) de *Canavalia brasiliensis*. As amostras foram solubilizadas em tampão Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,15 M, CaCl₂ 5 mM, MnCl₂ 5 mM, pH 7,6, (1mg/ml), sendo aplicados 2,5 mg de lectina. A rConBr foi adicionada de cloridrato de guanidina 0,4 M. Pico I: eluído com tampão de equilíbrio; Pico II: eluído com tampão de equilíbrio contendo glicose 0,1 M (1); Pico III: eluído com tampão glicina 0,1 M pH 2,6 (2).

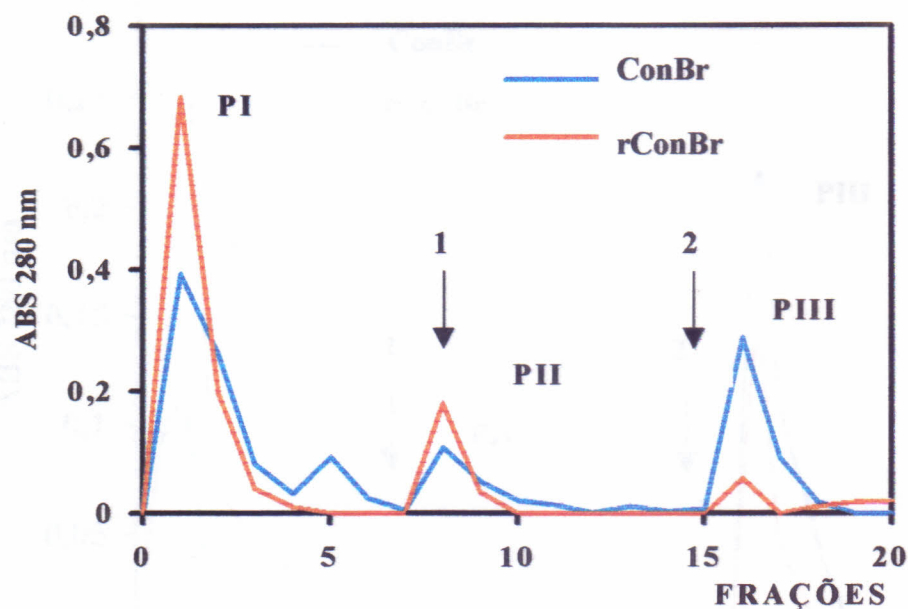


FIGURA 23 - Cromatografia de afinidade em coluna de Manose-Agarose das lectinas recombinante (rConBr) e nativa (ConBr) de *Canavalia brasiliensis*. As amostras foram solubilizadas em tampão Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,15 M, CaCl₂ 5 mM, MnCl₂ 5 mM, pH 7,6, (1mg/ml), sendo aplicados 2,5 mg de lectina. A rConBr foi adicionada de cloridrato de guanidina 0,4 M. Pico I: eluído com tampão de equilíbrio; Pico II: eluído com tampão de equilíbrio contendo glicose 0,1 M (1); Pico III: eluído com tampão glicina 0,1 M pH 2,6 (2).

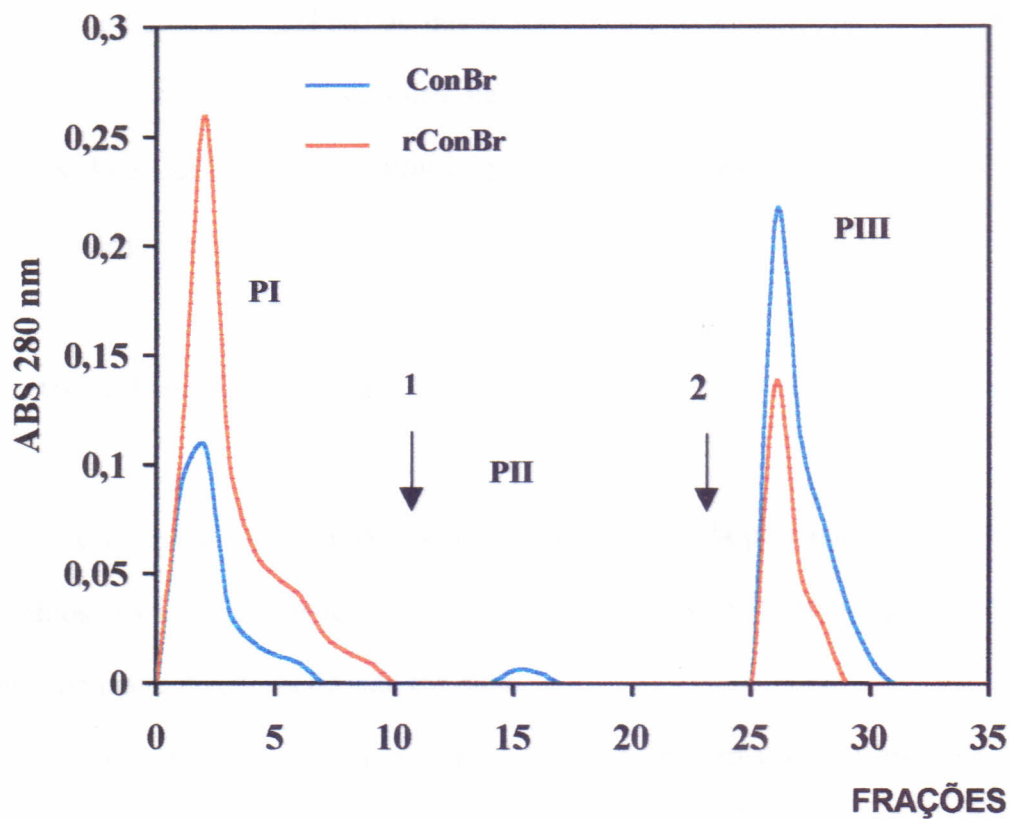


FIGURA 24 - Cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-75 das lectinas recombinante (rConBr) e nativa (ConBr) de *Canavalia brasiliensis*. As amostras foram solubilizadas em tampão Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,15 M, CaCl₂ 5 mM, MnCl₂ 5 mM, pH 7,6, (1mg/ml), sendo aplicados 2,5 mg de lectina. A rConBr foi adicionada de cloridrato de guanidina 0,4 M. Pico I: eluído com tampão de equilíbrio; Pico II: eluído com tampão de equilíbrio contendo glicose 0,1 M (1); Pico III: eluído com tampão glicina 0,1 M pH 2,6 (2).

capaz de causar aglutinação apenas das células previamente tratadas com enzimas proteolíticas. Mesmo assim, o título de hemaglutinação da rConBr (1 mg/ml) foi sempre menor (variou de 4 a 64 UH/ml) do que o observado para a ConBr nativa (1.024 UH/ml). A rConBr não foi capaz de aglutinar hemácias humanas, mesmo quando tratadas com proteases. Já a ConBr nativa aglutinou igualmente hemácias A, B e O nativas e tratadas com enzimas proteolíticas.

7.5.2 Atividade pro-inflamatória

A atividade pro-inflamatória da rConBr foi medida pela indução da migração de neutrófilos para a cavidade intraperitoneal de ratos e também pela indução do desenvolvimento de edema de pata em ratos.

A rConBr (300 µg por cavidade) induziu de forma significativa ($p < 0,05$) a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos, 4 horas após a administração do estímulo por via intraperitoneal (FIGURA 25). Entretanto, a resposta inflamatória promovida pela rConBr foi significativamente menor em relação ao efeito produzido pela ConBr nativa, usada como controle positivo.

Quando injetada por via subcutânea intraplantar em ratos, a rConBr (300 µg por pata) induziu de maneira significativa ($p < 0,05$) o desenvolvimento de edema de pata, que atingiu o máximo após 30 minutos da administração (FIGURA 26). Entretanto, a resposta inflamatória induzida pela rConBr foi também menor ($p < 0,05$) do que a produzida pela ConBr nativa.

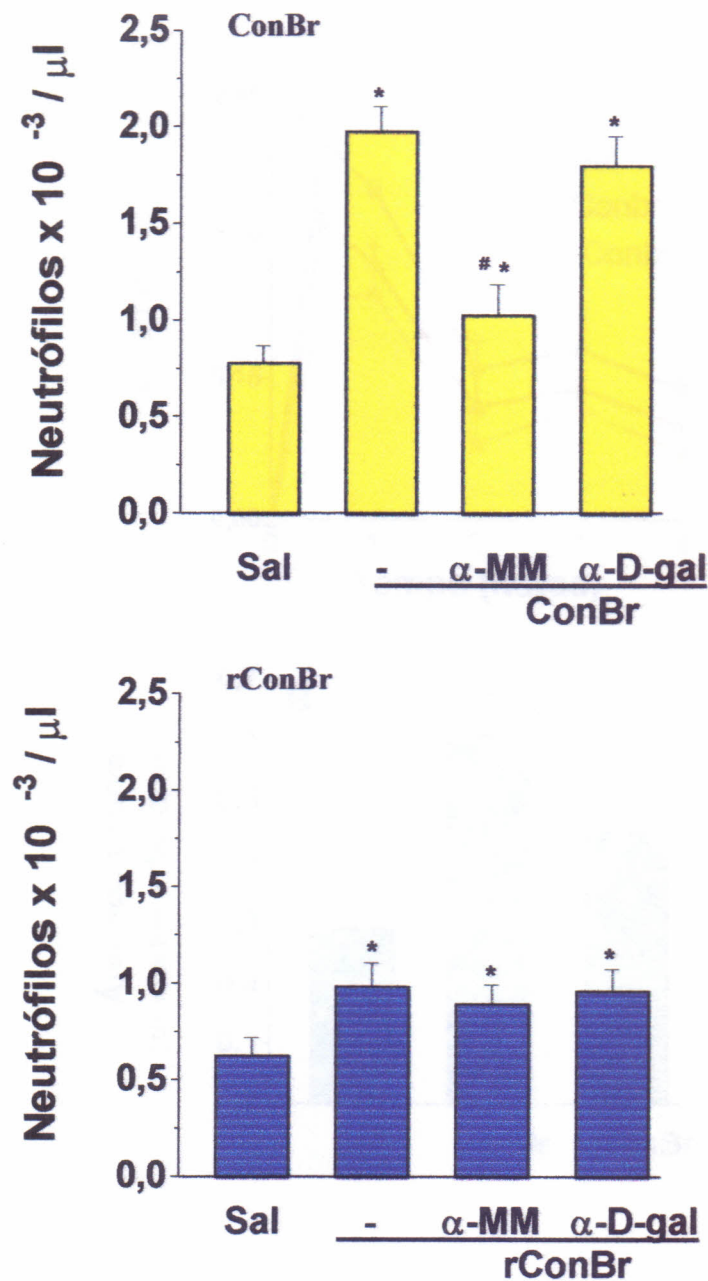


FIGURA 25 – Efeito da injeção intraperitoneal das lectinas recombinante (rConBr) e nativa (ConBr) de *Canavalia brasiliensis*, sobre a migração de neutrófilos em ratos. As lectinas (300μg/cavidade) ou salina estéril contendo cloridrato de guanidina 6M (Sal) foram administradas por via intraperitoneal, sozinhas ou em associação com α-metil-D-manosídeo (α-MM) e α-D-galactose (α-D-gal). A migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal foi avaliada após 4 horas. As barras representam a média ± E.P.M. do número de neutrófilos/μl. Foram utilizados seis animais em cada grupo. * p < 0,05 indicam as diferenças estatísticas significantes em relação ao grupo que recebeu salina contendo cloridrato de guanidina 6M (Sal), e # p < 0,05 em relação ao grupo tratado somente com lectina. ANOVA (teste de Ducam)

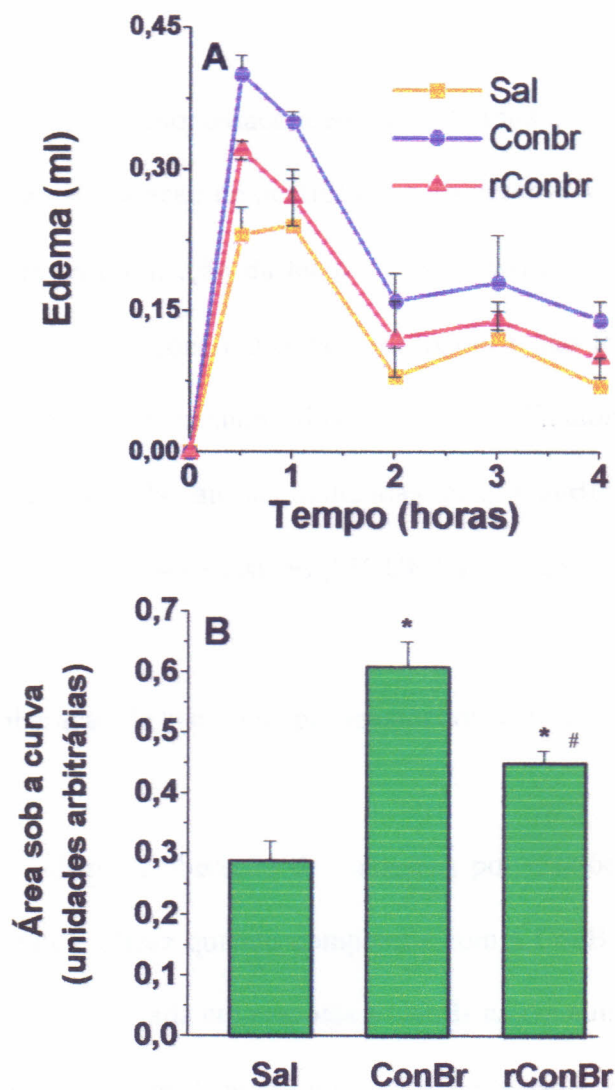


FIGURA 26 – Efeito das lectinas recombinante (rConBr) e nativa (ConBr) de *Canavalia brasiliensis* em induzir edema de pata em ratos. As lectinas (300 μ g/pata) ou salina estéril contendo cloridrato de guanidina 6M (Sal) foram injetadas por via intraplantar subcutânea. O edema foi avaliado 30 min., 1, 2, 3 e 4 horas após, e expresso como variação do volume das patas (ml), entre os tempos e o tempo zero (Painel A). As áreas sob as curvas também foram determinadas utilizando-se o método do trapézio (Painel B). Cada ponto representa a média \pm E.P.M. da variação de volume de patas de 6 ratos. * $p < 0,05$ indicam diferenças estatísticas significantes em relação ao grupo de animais que recebeu na pata salina contendo cloridrato de guanidina 6M (Sal). # $p < 0,05$ em relação ao grupo tratado com ConBr nativa. ANOVA (teste de Ducam).

7.5.3 Envolvimento de resíduos de açúcar na indução da inflamação induzida por rConBr

O envolvimento de monossacarídeos nas atividades pro-inflamatórias induzidas por rConBr (indução da migração de neutrófilos e do desenvolvimento de edema de pata) foi verificado através da co-injeção da lectina com α -metil-D-manosídeo (0,1M) e α -D-galactose (0,1M). As inflamações induzidas pela rConBr não foram revertidas de forma significativa ($p < 0,05$) por nenhum dos açúcares utilizados (FIGURAS 25 e 27). Entretanto, as respostas inflamatórias induzidas pela ConBr nativa foram revertidas especificamente por α -metil-D-manosídeo (FIGURAS 25 e 28).

7.5.4 Indução da liberação de histamina por mastócitos de rato pela rConBr

A rConBr induziu a liberação de histamina por mastócitos peritoneais de ratos, mas foi menos potente e eficaz quando comparada com a ConBr nativa (FIGURA 29). A quantidade de histamina liberada em resposta a ConBr nativa aumentou até a concentração de 10 $\mu\text{g/ml}$, decrescendo em doses maiores. Por outro lado, a rConBr só foi capaz de induzir a liberação de histamina na dose de 100 $\mu\text{g/ml}$.

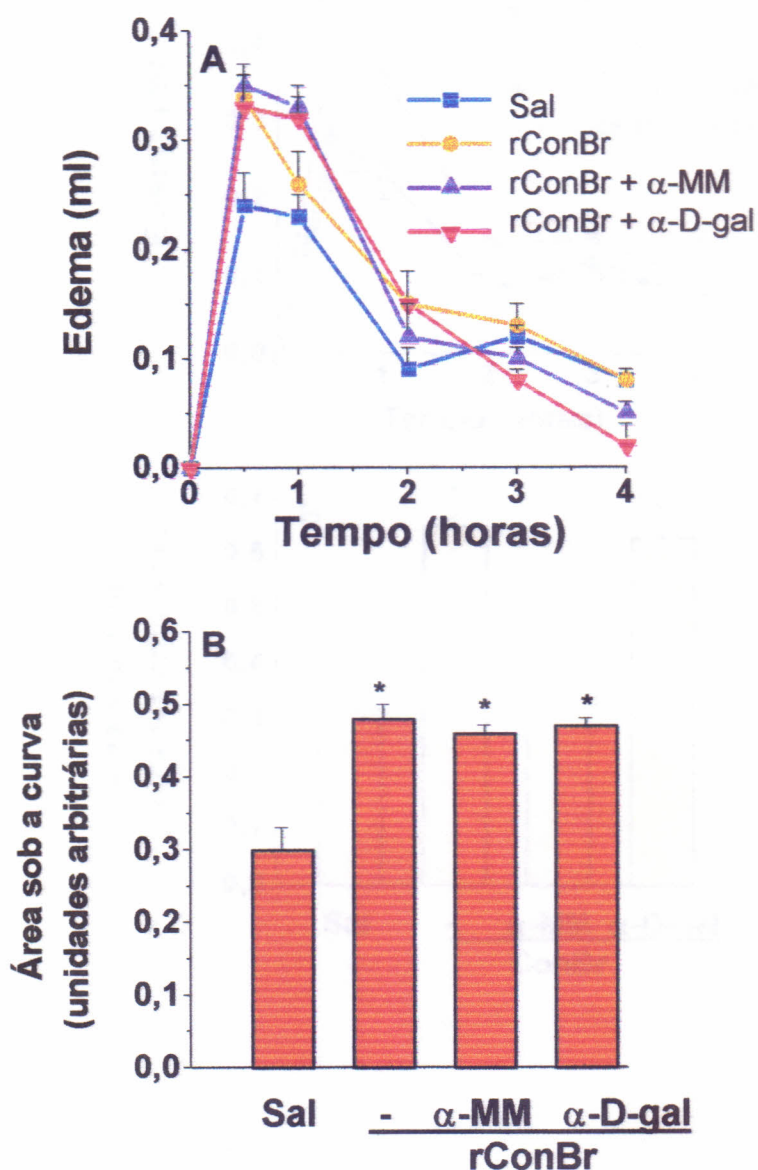


FIGURA 27 - α -metil-D-manosídeo (α -MM) não inibe o edema de pata induzido pela lectina recombinante (rConBr) de *Canavalia brasiliensis* em ratos. rConBr (300 μ g/pata) sozinha ou em associação com 0,1 M de α -MM e α -D-galactose (α -D-gal) foi injetada por via intraplantar subcutânea. O edema foi avaliado 30 min., 1, 2, 3 e 4 horas após, e expresso como a variação do volume das patas (ml), entre os tempos e o tempo zero (Painel A). As áreas sob as curvas foram determinadas utilizando-se o método do trapézio (Painel B). Cada ponto representa a média \pm E.P.M. da variação de volume de patas de seis ratos. * $p < 0,05$ indicam diferenças estatísticas significantes em relação ao grupo de animais que recebeu salina contendo cloridrato de guanidina 6 M (Sal). ANOVA (teste Ducam).

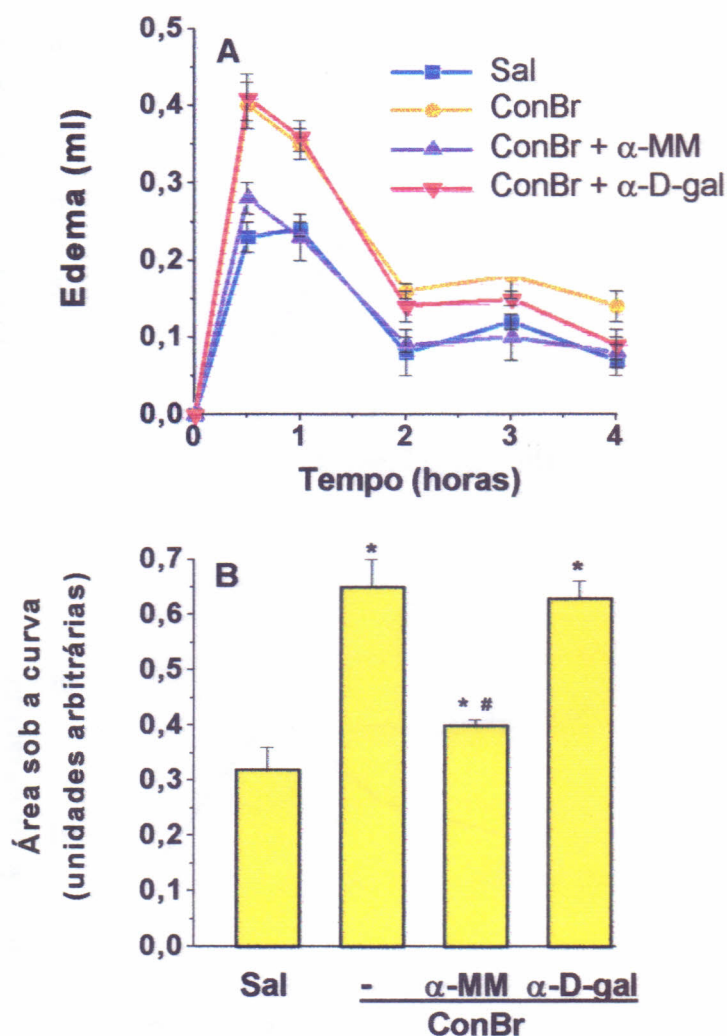


FIGURA 28 - α -metil-D-manosídeo (α -MM) inibe o edema de pata induzido pela lectina nativa (ConBr) de *Canavalia brasiliensis* em ratos. ConBr (300 μ g/pata) sozinha ou em associação com 0,1 M de α -MM e α -D-galactose (α -D-gal) foi injetada por via intraplantar subcutânea. O edema foi avaliado 30 min., 1, 2, 3 e 4 horas após, e expresso como a variação do volume das patas (ml), entre os tempos e o tempo zero (Painel A). As áreas sob as curvas foram determinadas utilizando-se o método do trapézio (Painel B). Cada ponto representa a média \pm E.P.M. da variação de volume de patas de seis ratos. * $p < 0,05$ indicam diferenças estatísticas significantes em relação ao grupo de animais que recebeu salina contendo cloridrato de guanidina 6 M (Sal), e # $p < 0,05$ em relação ao grupo que recebeu somente lectina na pata. ANOVA (teste Ducam).

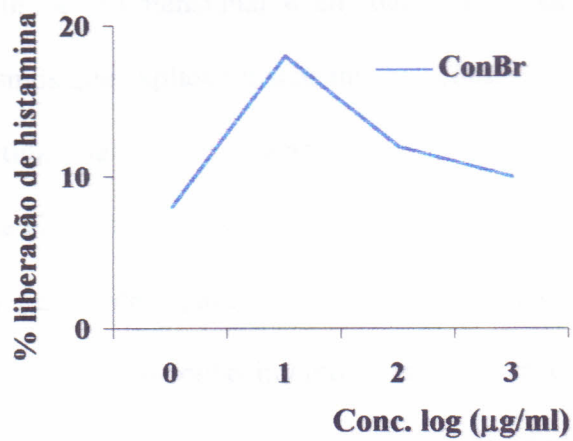
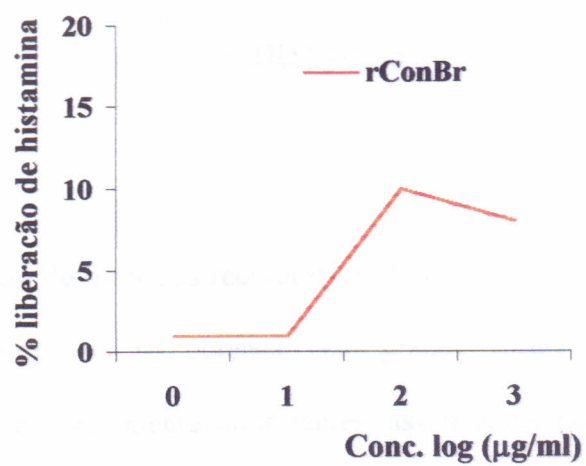


FIGURA 29 - Indução da liberação de histamina por mastócitos peritoneais de ratos pelas lectinas recombinante (rConBr) e nativa (ConBr) de *Canavalia brasiliensis*

8 DISCUSSÃO

A expressão de proteínas recombinantes em sistemas eucarióticos e procarióticos assume grande relevância na obtenção em grande escala de produtos de interesse econômico e farmacologicamente importantes, assim como nos estudos dos mecanismos de processamentos co- e pós-traducionais de ocorrência natural. Adicionalmente, através de mutações sítio-dirigidas, é possível esclarecer o papel de resíduos de aminoácidos específicos na estrutura tridimensional e atividade biológica dessas proteínas, e assim estabelecer mecanismos que expliquem suas interrelações.

Várias lectinas de origem vegetal têm sido expressas em células bacterianas, especialmente as de *Escherichia coli*. O produto recombinante obtido nesses sistemas de expressão constitui um modelo para o entendimento do papel do processamento dessas proteínas no vegetal, e assim, o conhecimento da etapa determinante para sua ativação.

O produto recombinante obtido pela indução de células de *E. coli* BL21 (λ DE3) contendo o plasmídeo pETconbr, corresponde a uma proteína com massa molecular aparente de 37 kDa, a qual é reconhecida imunologicamente por anticorpos de coelho anti-ConBr. O seqüenciamento dos resíduos de aminoácidos N-terminais dessa proteína confirmou se tratar do precursor da ConBr, a pre-pro-lectina, referida nesse trabalho como rConBr. A presença de uma cauda adicional de seis resíduos de histidina e de um sítio para trombina, demonstrados pelo seqüenciamento N-terminal da rConBr, foi determinada pelo vetor de expressão utilizado, pET15b. De acordo com o fabricante desse vetor, a presença da cauda de histidina no produto expresso, retarda a corrida eletroforética da proteína recombinante, determinando um aumento de massa molecular aparente em torno de 2 kDa. MIN &

JONES (1992) obteve uma banda com massa molecular de 35 kDa para a pre-pro-ConA. Assim, se levarmos em consideração a alta homologia entre sua seqüência de aminoácidos e aquela da pre-pro-ConBr, a massa molecular aparente de 37 kDa obtida, está de acordo com a esperada, e juntamente com os dados de seqüência N-terminal, indicam claramente que o peptídeo sinal da planta não é removido por peptidases sinais da bactéria. Estes resultados estão de acordo com os relatados durante a expressão da pre-pro-ConA no citoplasma de *E. coli* JM109 (MIN & JONES, 1992), bem como na expressão da pre-pro-lectina de *Dolichos biflorus* no citoplasma de *E. coli* BL21(DE3) (CHAO *et al.*, 1994).

A expressão de rConBr no sistema procariótico utilizado apresentou um rendimento variável (15-30 mg/litro), mas bastante elevado, quando comparado ao obtido por diversos autores (TABELA 1). A maior expressão da proteína foi atingida após 5 horas de indução das células com IPTG 1 mM, não sendo acompanhada por redução do crescimento celular da cultura, o que discorda dos resultados de obtidos por MIN & JONES (1992), em que a indução determina uma redução da divisão celular.

O produto rcombinante rConBr expresso em *E. coli* foi mantido exclusivamente na forma de corpos de inclusão insolúveis no interior bacteriano, à semelhança do relatado para a maioria das lectinas vegetais produzidas nesse procarioto. A formação de corpos de inclusão resulta da agregação de cadeias polipeptídicas dobradas incorretamente, e parece ser uma propriedade bacteriana natural, pois mesmo para proteínas nativas da bactéria, quando expressas em altos níveis, esses são também produzidos (SHARMA, 1986). Entretanto, a manutenção da rConBr numa forma bastante insolúvel no interior da bactéria pode ser atribuída, em parte, à presença na proteína expressa do peptídeo sinal altamente hidrofóbico, não removido pelas peptidases sinais do hospedeiro. Seria de se esperar que a presença desse peptídeo sinal aumentasse a hidrofobicidade e resultasse numa maior tendência à agregação, reduzindo assim a solubilidade do produto recombinante. Da

mesma maneira, a ConA recombinante expressa em *E. coli* com o peptídeo sinal da planta (pre-pro-ConA) foi produzida exclusivamente na forma insolúvel no interior bacteriano (MIN & JONES, 1992). Entretanto, a substituição do peptídeo sinal da planta por uma sequência sinal bacteriana (*ompA*), que direciona a proteína expressa para o espaço periplasmático, resultou na correta remoção do peptídeo sinal *ompA* da pre(*ompA*)-pro-ConA e na acumulação de uma certa fração de pro-ConA de forma solúvel no citoplasma bacteriano (MIN *et al.*, 1992). A presença do peptídeo sinal vegetal, além de diminuir a solubilidade do produto recombinante parece também influenciar o nível de expressão da proteína recombinante. Assim, a expressão da lectina recombinante de *D. biflorus* com o peptídeo sinal resultou na produção de lectina insolúvel em níveis menores do que 1 mg/litro de meio de cultura. A substituição do peptídeo sinal da planta por um resíduo de metionina causou um aumento de mais de 100 vezes no nível de expressão da lectina recombinante, sendo que 20% do produto recombinante foi mantido de forma solúvel (CHAO *et al.*, 1994).

Proteínas recombinantes expressas em sistemas procarióticos, muitas vezes apresentam diferenças estruturais em relação às proteínas nativas, de maneira que sua purificação por cromatografia de afinidade, uma técnica comumente utilizada na purificação de lectinas nativas, não é possível ou resulta num rendimento extremamente baixo. Assim, a utilização de vetores de expressão, como o plasmídeo pET15b, que contém a sequência codificante de uma cauda de seis histidinas, a qual é adicionada à porção N-terminal do produto de expressão recombinante, possibilita sua purificação por cromatografia de afinidade em metais imobilizados – IMAC (KAGEDAL, 1989), independentemente da proteína recombinante ser biologicamente ativa e, no caso de lectinas, de ser capaz de se ligar a carboidratos. Além disso, o uso de IMAC na purificação de lectinas recombinantes expressas em *E. coli* ao invés de cromatografias de afinidade em

açúcares imobilizados ou géis de polissacarídeos, evita que as mesmas sejam copurificadas com lectinas endógenas da bactéria, com especificidade semelhante à da lectina recombinante (RHEN *et al.*, 1986). Embora resíduos de cisteína ou triptofano também possam ser explorados por essa técnica de isolamento, a expressão da cauda de histidina tem se mostrado muito mais vantajosa. Dessa maneira, a capacidade de muitas proteínas em ligar com alta especificidade a íons metálicos formando complexos, muitas vezes multidentados (quelatos), permite sua purificação por IMAC, sendo a especificidade dessa técnica determinada pela seqüência primária e estrutura terciária da proteína, assim como pela natureza do íon metálico imobilizado. Podendo a proteína complexada ao íon metal através de sua cauda de histidina, ser eluída por redução de pH ou competição com imidazol, histidina ou cloreto de amônio (manual Pharmacia Biotech).

A rConBr, recuperada principalmente de corpos de inclusão insolúveis, foi então solubilizada com cloridrato de guanidina e purificada satisfatoriamente e de maneira bastante rápida em uma única etapa, por cromatografia de afinidade em níquel imobilizado, em condições desnaturantes. O redobramento *in vitro* da lectina recombinante purificada por IMAC foi realizado por diálise contra água (SHARMA, 1986) da lectina eluída da coluna em presença de cloridrato de guanidina. Essa técnica cromatográfica foi também empregada com sucesso na purificação da lectina de amendoim (*Arachis hypogea*), expressa como uma proteína de fusão contendo uma cauda com seis resíduos de histidina na extremidade C-terminal da lectina recombinante (SHARMA & SUROLIA, 1994). O sistema estabelecido no presente trabalho para a purificação da lectina recombinante de *C. brasiliensis* a partir de cromatografia de afinidade em Ni^{+2} imobilizado será de grande utilidade na purificação de moléculas mutantes da lectina com modificações no sítio de ligação a carboidratos ou em outros sítios funcionais, bem como em resíduos envolvidos na oligomerização da proteína. Estes estudos serão fundamentais para estabelecer as bases

moleculares da especificidade de interação entre a ConBr e seus ligantes (carboidratos, metais e hormônios vegetais, principalmente auxinas e citocininas).

A rConBr expressa em *E. coli* e purificada por cromatografia de afinidade em Ni^{+2} imobilizado apresentou uma única banda protéica com massa molecular aparente de 37 kDa (PAGE-SDS), sendo reconhecida especificamente por anticorpos de coelho anti-ConBr nativa em experimentos de "western blotting". Diferentemente, a ConBr nativa isolada de sementes maduras de *C. brasiliensis* apresenta, por PAGE-SDS (MOREIRA & CAVADA, 1984), uma banda protéica principal com 29-30 kDa (cadeia α , resíduos 1-237) e duas bandas adicionais com massas moleculares de 16-18 kDa (fragmento β) e de 12-13 kDa (fragmento γ). Os fragmentos β e γ correspondem às duas metades N- e C-terminais da cadeia α , ou seja, aos resíduos 1-118 (fragmento β) e 119-237 (fragmento γ). Os dois fragmentos β e γ são oriundos do processamento proteolítico da pre-pro-ConBr na célula vegetal das sementes em desenvolvimento, sendo religados através da formação de uma nova ligação peptídica entre os resíduos 118 e 119, originando assim a cadeia α que constitui a subunidade intacta da lectina madura. Os fragmentos livres ainda presentes na semente madura representam uma proporção dos produtos do processamento proteolítico do precursor que não foram religados (FIGURAS 3 e 4). Desta maneira, a ausência de qualquer banda protéica nas preparações de rConBr com massa molecular aparente similar às encontradas na ConBr nativa, associada à sua massa molecular de 37 kDa e à sua sequência N-terminal correspondendo ao peptídeo sinal presente na pre-pro-lectina (GRANGEIRO, 1996), demonstram claramente que a pre-pro-ConBr é expressa em células de *E. coli* como uma proteína estável e que não sofre qualquer processamento proteolítico adicional que possa resultar na formação da cadeia α e dos dois fragmentos β e γ , como ocorre no vegetal. De maneira semelhante, nenhum processamento proteolítico foi

constatado quando a pre-pro-ConA (MIN & JONES, 1992) ou a pro-ConA (MIN *et al.*, 1992) foram expressas em *E. coli* JM109. Os resultados apresentados nesse trabalho e em outros disponíveis na literatura contrastam de maneira marcante com os observados por YAMAUCHI & MINAMIKAWA (1990), que relataram que a pre-pro-lectina de *Canavalia gladiata*, quando expressa em *E. coli*, sofre um processamento proteolítico e religação semelhante ao observado nas células vegetais.

A ConBr madura é uma lectina oligomérica na qual existe um equilíbrio entre as formas dimérica e tetramérica, dependente do pH (GRANGEIRO *et al.*, 1997a). Cada subunidade possui um sítio de ligação a carboidratos, com a mesma especificidade para resíduos de glicose/manose (SANZ-APARICIO *et al.*, 1997). Entretanto, existem dois tipos de monômeros na ConBr nativa: intactos e fragmentados. Os monômeros intactos são formados por uma única cadeia polipeptídica com 237 resíduos de aminoácidos. Nos monômeros fragmentados, existe uma descontinuidade na estrutura primária da cadeia polipeptídica com 237 aminoácidos, caracterizada pela ausência da ligação peptídica entre os resíduos 118 e 119. Entretanto, a estrutura tridimensional das subunidades fragmentadas é indistinguível em relação à das subunidades intactas (SANZ-APARICIO *et al.*, 1997).

A rConBr produzida em *E. coli* foi capaz de interagir com carboidratos, como demonstrado pela sua adsorção ao gel de dextrana, à semelhança do observado para a ConBr madura. Entretanto, a lectina recombinante (rConBr) purificada de *E. coli* não sofre processamento proteolítico, contendo resíduos de aminoácidos extras em relação a lectina nativa isolada das sementes de *C. brasiliensis*, como demonstrado pelos dados de sequenciamento N-terminal, mobilidade eletroforética e "western blotting". Esses resíduos extras ocorrem em três sítios: 29 resíduos (peptídeo sinal) adicionais na extremidade N-terminal, 15 resíduos separando as duas metades da subunidade madura (resíduos 1-118 e 119-237) e 9 resíduos extras na extremidade C-terminal. Esses resultados demonstram que

os processamentos proteolíticos posteriores que ocorrem na pre-pro-ConBr durante a sua biossíntese na célula vegetal não são necessários para a ativação da lectina.

Tais resultados são consistentes com os relatados para outras lectinas vegetais expressas em *E. coli*, tais como a ConA (MIN & JONES, 1992), a lectina de ervilha (STUBBS *et al.*, 1986), e a lectina de amendoim (SHARMA & SUROLIA, 1994). Em todos esses trabalhos, relata-se que as lectinas recombinantes produzidas no citoplasma de *E. coli*, apesar de não sofrerem as clivagens proteolíticas que sofrem durante a sua biossíntese no vegetal, são capazes de se ligar a carboidratos.

Por outro lado, nas sementes em desenvolvimento de *C. brasiliensis* (MOREIRA *et al.*, 1993), o precursor da ConBr é N-glicosilado (glico-pro-ConBr) com um oligossacarídeo rico em manose e, à semelhança do demonstrado para a ConA, é inativo, ou seja, não é capaz de se ligar a carboidratos. Durante o transporte do precursor glicosilado do RER para os corpos protéicos, uma série de eventos pós-traducionais, que incluem deglicosilação e clivagens proteolíticas, resultam na conversão do precursor glicosilado inativo numa lectina madura completamente processada proteoliticamente, não glicosilada e ativa, com capacidade de ligação a carboidratos. A glicosilação se dá em um resíduo de asparagina localizado na porção mediana da pro-ConBr. O N-glicano ligado ao peptídeo central é removido por uma N-glicanase (SHELDON *et al.*, 1998) durante o transporte da lectina para os corpos protéicos. Imediatamente após ou concomitantemente à remoção do N-glicano, ocorrem as clivagens proteolíticas no precursor não glicosilado, todas realizadas do lado carboxil de resíduos de asparagina por uma asparaginil endopeptidase (MIN & JONES, 1994). Essas clivagens proteolíticas resultam na produção de dois fragmentos que são em grande parte religados, produzindo a subunidade intacta da lectina. A rapidez com que esses eventos (deglicosilação e clivagens proteolíticas) ocorrem *in vivo* nas sementes em desenvolvimento de *C. brasiliensis* impossibilita determinar com

precisão qual deles é o responsável pela ativação da lectina na célula vegetal. Além disso, a presença transitória do N-glicano na estrutura da lectina sugere que o mesmo não é necessário para a função da lectina madura.

A rConBr produzida em *E. coli* (pre-pro-ConBr), assim como outras lectinas recombinantes produzidas nessa bactéria (YOUNG *et al.*, 1995), não possui glicosilação, devido a incapacidade do hospedeiro de expressão em realizar esse evento co-traducional (SHARMA, 1986). Entretanto, a rConBr não glicosilada e sem sofrer as clivagens proteolíticas que ocorrem na planta, é ativa. Esses resultados demonstram então que é a deglicosilação do peptídeo central e não a remoção do peptídeo em si, a etapa responsável pela conversão do precursor inativo em lectina ativa. Esses resultados são consistentes com os relatados por SHELDON & BOWLES (1992), que demonstraram que a deglicosilação *in vitro* da glico-pro-ConA inativa, isolada de sementes em desenvolvimento de *C. ensiformis*, por uma N-glicosidase, leva à formação de uma molécula ativa com capacidade de ligação a carboidratos.

Desta maneira, as etapas de glicosilação/deglicosilação regulam a atividade de ligação a carboidratos da ConBr durante sua biossíntese nas sementes em desenvolvimento de *C. brasiliensis*. A princípio, a N-glicosilação do precursor poderia regular a sua atividade através de dois mecanismos, como sugerido por SHELDON & BOWLES (1992): auto-neutralização ou mudança na conformação da proteína.

A rConBr foi reconhecida especificamente, em solução, por anticorpos de coelho anti-ConBr imobilizados em agarose, indicando que epítopos antigênicos idênticos àqueles apresentados pela lectina nativa, também estão expostos na superfície da molécula recombinante, embora essa não sofra qualquer processamento co- e pós-traducional, sugerindo então ser a conformação da rConBr relacionada à da ConBr nativa. Assim, assumindo que o precursor (glico-pro-ConBr) adote uma estrutura tridimensional

semelhante à da lectina madura, como proposto por BOWLES *et al.* (1988) para a glicopro-ConA, o peptídeo central glicosilado estaria localizado na superfície da proteína, como uma alça dotada de uma certa flexibilidade em sua conformação (FIGURA 5). Assim, especula-se que a cadeia do N-glicano rico em manose ligado a esta alça poderia ocupar o sítio de ligação a carboidratos de sua própria subunidade ou de subunidades adjacentes inativando a proteína, ou estabilizando a conformação da forma inativa. Vale salientar que o N-glicano da pro-ConBr contém o núcleo trimanosídico 3,6-di-O-(α -D-manopiranosil)-D-manose, encontrado em todas as N-glicoproteínas e para o qual a ConBr nativa possui uma alta afinidade de ligação (RAMOS *et al.*, 1996; DAM *et al.*, 1998).

No segundo mecanismo, a ativação da lectina seria o resultado de uma mudança conformacional na proteína causada pela deglicosilação do precursor. As N-glicosidases são as enzimas responsáveis pela deglicosilação das proteínas N-glicosiladas. As N-glicosidases catalisam a clivagem da ligação amida entre o resíduo proximal de N-acetilglicosamina (GlcNAc) do glicano e o resíduo de asparagina ao qual está ligado na glicoproteína. Como observado por SUZUKI *et al.* (1997), a reação catalisada pelas N-glicosidases não somente remove a cadeia do glicano, mas também introduz uma carga negativa nas proteínas deglicosiladas, pela conversão do resíduo de asparagina glicosilado em um resíduo de ácido aspártico, resultando na alteração de várias propriedades fisiológicas e/ou físico-químicas das proteínas.

A inibição da N-glicosilação por tratamento das sementes em desenvolvimento de *C. ensiformis* por tunicamicina inibe o transporte da pro-ConA do RE/complexo de Golgi para os corpos protéicos (FAYE & CHRISPEELS, 1987). Desta maneira, qualquer que seja o mecanismo pelo qual a N-glicosilação regule a atividade do precursor da ConBr, da ConA e de lectinas taxonomicamente relacionadas, esta inativação inicial parece ser essencial para o seu transporte intracelular. A inativação do precursor por N-glicosilação

seria essencial, possivelmente por evitar interações com glicoproteínas endógenas.

Frequentemente, os glicanos modificam as propriedades físicas da proteína a qual estão ligados. Assim, eles afetam a solubilidade, a carga e a viscosidade das proteínas. Desde que a área de superfície dos glicanos é significativa em relação à cadeia polipeptídica, eles também podem influenciar outras propriedades, tais como estabilidade térmica e susceptibilidade a proteólise. Desta maneira, uma outra possível função para a glicosilação/deglicosilação da pro-ConBr *in planta* seria a de regular as clivagens proteolíticas posteriores, responsáveis pela maturação da ConBr, como sugerido por SUZUKI *et al.* (1997). É interessante observar que a maioria dos sítios de clivagem proteolítica, localizados na alça central da estrutura hipotética da pro-lectina (FIGURA 5), ocorrem próximos ao sítio de N-glicosilação. Assim, a remoção da cadeia do N-glicano poderia alterar a acessibilidade desses sítios à asparaginil endopeptidase responsável pelo processamento proteolítico do precursor.

Entretanto, talvez a função mais importante da N-glicosilação nas proteínas seja a de ajudar no dobramento da cadeia polipeptídica nascente no retículo endoplasmático (RE) e estabilizar a conformação da glicoproteína madura. Uma maneira pela qual as cadeias glicídicas N-ligadas afetam o dobramento das proteínas é mediando a interação do polipeptídeo recém-sintetizado com a calnexina, uma chaperona com seletividade aparente para N-glicoproteínas (GABIUS & GABIUS, 1997).

A calnexina é uma proteína não-glicosilada com 65,4 kDa, localizada na membrana do retículo endoplasmático. Experimentos com muitas glicoproteínas mostraram que a calnexina se liga transitoriamente a uma variedade de glicoproteínas recém-sintetizadas que possuem oligossacarídeos parcialmente monoglicosilados. Ela também exibe uma ligação prolongada às proteínas dobradas erroneamente ou incompletamente dobradas. Estudos recentes têm demonstrado que a calnexina funciona como uma chaperona

molecular, facilitando o dobramento da cadeia polipeptídica e a montagem dos oligômeros no RE. Além disso, a calnexina é um componente do sistema de controle de qualidade intracelular, que previne que proteínas prossigam na via secretória até que as mesmas adquiram suas estruturas terciárias ou quaternárias apropriadas. A maioria das proteínas eucarióticas que são translocadas para o lúmen do RE são co-traducionalmente glicosiladas em um ou mais resíduos de asparagina (N-glicosilação), através da transferência de um oligossacarídeo pré-montado ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) de um carreador dolicolpirofosforil para a cadeia polipeptídica nascente, por uma oligossacaril transferase. A cadeia do N-glicano transferido é, posteriormente, processada por várias glicosiltransferases e glicosidases localizadas no RE e no complexo de Golgi. As interações da calnexina são quase que exclusivamente restritas a proteínas N-glicosiladas. A preferência para N-glicoproteínas reside na habilidade da calnexina em funcionar como uma lectina com especificidade para o oligossacarídeo $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, um intermediário inicial do processamento dos glicanos N-ligados (WILLIAMS, 1995). As proteínas permanecem ligadas a calnexina por diferentes períodos de tempo, dependendo das velocidades nas quais elas atingem sua maturação conformacional.

Entretanto, evidências experimentais têm demonstrado que a interação da calnexina com o N-glicano não é imprescindível para que a cadeia glicídica possa influenciar no dobramento correto da proteína. Ou seja, o N-glicano apenas, uma vez transferido para a cadeia polipeptídica, pode funcionar como uma chaperona ("chaperone-like"), facilitando o dobramento da proteína através de interações intramoleculares (FENG *et al.*, 1995; KIMURA *et al.*, 1998; YAMAGUCHI & UCHIDA, 1996). Interessantemente, a primeira demonstração experimental direta da função essencial de N-glicanos no dobramento correto de proteínas e na montagem dos oligômeros foi fornecida para a lectina de soja (NAGAI & YAMAGUCHI, 1993; NAGAI *et al.*, 1993).

Por outro lado, como já discutido anteriormente, a rConBr é produzida em quantidades elevadas (15-30 mg/litro de meio de cultura) e se acumula no interior das células de *E. coli* na forma de agregados insolúveis, os corpos de inclusão. Uma das hipóteses para explicar a formação dos corpos de inclusão considera que a formação de tais agregados insolúveis resulta do fato de uma proteína estar sendo produzida em altos níveis, num ambiente que não contribui para o dobramento correto da cadeia polipeptídica (SHARMA, 1986). Concentrações ótimas *in vitro* para o redobramento de proteínas são da ordem de 1 μM ou abaixo deste valor. Se por engenharia genética uma proteína recombinante está sendo produzida num nível correspondente a 5 % das proteínas totais da célula, sua concentração intracelular pode ser tão alta quanto 100 μM , e estas altas concentrações podem afetar o processo de dobramento correto da proteína. Esta teoria é reforçada pela constatação da formação de corpos de inclusão durante a expressão de proteínas de *E. coli* normalmente solúveis sob o controle de promotores fortes. Entretanto, um outro fator que conduz ao dobramento incorreto de proteínas recombinantes produzidas em altas concentrações nas células de *E. coli* é a disponibilidade reduzida de chaperonas bacterianas em relação à quantidade de proteínas totais sendo sintetizadas. As chaperonas são proteínas que auxiliam o dobramento de outras proteínas, bem como na montagem das estruturas oligoméricas. Segundo LORIMER (1996), evidências experimentais mostram que, de uma maneira geral, existem na célula de *E. coli* quantidades suficientes das chaperoninas GroEL e GroES para facilitar o dobramento de não mais do que 5 % de todas as proteínas produzidas na célula bacteriana. Além disso, como já observado anteriormente, células de *E. coli* são incapazes de realizar muitas modificações pós-traducionais, incluindo N-glicosilação.

Nas sementes em desenvolvimento de *C. brasiliensis*, a ConBr é sintetizada em grandes quantidades, acumulando-se no interior de organelas chamadas corpos protéicos.

Apesar de nas sementes maduras a ConBr representar até 10% das proteínas totais, ela é extraída numa forma completamente solúvel (MOREIRA & CAVADA, 1984). Entretanto, a lectina é sintetizada como um precursor N-glicosilado, que é então deglicosilado durante o transporte do RER para os corpos protéicos. Desta maneira, levando-se em consideração todos os aspectos discutidos nos parágrafos anteriores, a acumulação da rConBr não glicosilada produzida em *E. coli* na forma de agregados insolúveis, permite sugerir, ainda que baseado em evidências indiretas, que uma das funções do N-glicano ligado ao precursor da ConBr está relacionada ao correto dobramento da cadeia polipeptídica no lúmen do RER e possivelmente na montagem dos oligômeros (dímeros e tetrâmeros).

A rConBr foi capaz de interagir com polissacarídeos, apesar de apresentar diferenças em relação a ConBr nativa. Embora a ConBr seja caracteristicamente purificada por cromatografia de afinidade em Sephadex G-50 (MOREIRA & CAVADA, 1984), a rConBr praticamente não interagiu com essa matrix, sendo porém retida fortemente em Sephadex G-75, que possui a mesma constituição química do Sephadex G-50, porém as partículas que formam o gel possuem um tamanho maior.

Além disso, a rConBr foi capaz de induzir respostas pro-inflamatórias (indução da migração de neutrófilos e desenvolvimento de edema de pata) e promover a liberação de histamina, quando aplicada a animais experimentais. Entretanto, em todas as respostas biológicas estudadas, os efeitos produzidos pela rConBr foram significativamente menores do que aqueles observados para a ConBr nativa, quando as duas proteínas foram avaliadas nas mesmas condições experimentais.

DALE (1989) demonstrou que células fagocitárias são potencialmente hábeis para contribuir com o desenvolvimento de edema de pata, através da liberação de vários mediadores da resposta inflamatória aguda. Dessa maneira, as diferentes respostas inflamatórias determinadas pela rConBr e ConBr, podem estar relacionadas à maior

capacidade da ConBr em induzir uma mobilização celular mais intensa, principalmente de polimorfos nucleados, para o sítio de injeção, no início do processo inflamatório. Dentre os mediadores da inflamação, a histamina e a serotonina provavelmente desempenham papéis fundamentais no início do desenvolvimento do edema de pata (BENTO *et al.* 1993), contribuindo para a migração de neutrófilos polimorfo nucleares para o sítio de injúria. Dessa maneira, a pequena indução da liberação de histamina determinada pela rConBr, quando comparada à induzida pela ConBr, pode explicar parcialmente a atividade edematogênica reduzida da lectina recombinante em relação a ConBr nativa.

As atividades pró-inflamatórias da ConBr nativa foram inibidas especificamente por α -metil-D-manosídeo, um açúcar inibidor dessa lectina (RAMOS *et al.*, 1996), demonstrando assim que os efeitos biológicos da ConBr são produzidos através do seu sítio de ligação a carboidratos. Esses resultados são consistentes com estudos prévios sobre o papel do sítio de ligação a carboidratos na indução das atividades biológicas dessa lectina e de lectinas relacionadas (BENTO *et al.*, 1993; ASSREUY *et al.*, 1997). Por outro lado, os efeitos pró-inflamatórios causados pela rConBr não foram revertidos na presença dos monossacarídeos α -metil-D-manosídeo e α -D-galactose.

Esses resultados sugerem então que, apesar de ser ativa, a rConBr possui um sítio de ligação a carboidratos com uma conformação diferente em relação ao sítio da lectina nativa, completamente processada. Os efeitos produzidos pela rConBr em animais experimentais podem então ser atribuídos à sua interação com receptores de natureza glicídica estruturalmente distintos dos receptores da ConBr, ou então, à interação com receptores idênticos aos da ConBr mas posicionados diferentemente na membrana das células.

Por outro lado, o fato da rConBr ser capaz de induzir respostas inflamatórias *in vivo* (em ratos), ainda que em menor intensidade quando comparadas aquelas determinadas

pela ConBr, é mais uma evidência de que somente a deglicosilação da glico-pro-ConBr é necessária para ativar o precursor da ConBr, tornando-o capaz de induzir respostas biológicas celulares.

Como já mencionado anteriormente, a rConBr produzida em *E. coli* possui seqüências de aminoácidos extras, que não estão presentes na lectina madura, biologicamente ativa. Assim, podemos sugerir serem essas supostas diferenças estruturais responsáveis pelas diferenças nas atividades biológicas induzidas pela ConBr e rConBr, evidenciando que os eventos pós-traducionais que ocorrem durante a biossíntese da lectina nas sementes em desenvolvimento de *C. brasiliensis*, são necessários para produzir uma proteína com atividades biológicas plenas.

Levando em consideração a estrutura hipotética proposta para o precursor da ConA (FIGURA 5), sugere-se que, das seqüências extras presentes na estrutura da pre-pro-ConBr, a remoção do peptídeo central que contém o sítio de glicosilação, provavelmente é uma etapa crítica, devido à sua proximidade com o sítio de ligação a carboidratos. Com efeito, especula-se que a remoção desse peptídeo, hipoteticamente localizado na superfície da proteína como uma alça, possa determinar uma mudança conformacional no sítio de ligação a carboidratos ou nas suas vizinhanças, o qual adquiriria a conformação biologicamente ativa, presente na lectina madura, completamente processada.

A determinação da estrutura tridimensional da rConBr produzida *E. coli* será de fundamental importância para a elucidação do papel dos eventos pós-traducionais na conversão da pre-pro-lectina numa lectina com atividades biológicas plenas.

Além disso, faz-se necessário a expressão da pre-pro-lectina em células eucarióticas, tais como as de levedura, um eucarioto unicelular bastante usado em estudos de expressão de proteínas recombinantes, a fim de esclarecer se os eventos co- e pós-traducionais que ocorrem nas sementes em desenvolvimento de *C. brasiliensis* e espécies

taxonomicamente relacionadas são exclusivos das células dessas espécies ou se podem ser realizados por outras células eucarióticas.

TABELA 1 - Rendimentos obtidos para a expressão de proteínas recombinantes em células de *E. coli*.

Produto expresso	Plasmídeo recombinante	Local de expressão	Rendimento (mg / l)	Forma de purificação	Fonte
ConG	pCONA1	Citoplasma	1,0	G-50	YAMAUCHI & MINAMIKAWA (1990)
Pre-pro-ConA	pKconA pTKconA	Citoplasma	0,5-1,3	G-75	MIN & JONES, (1992)
Pro-ConA	pIN-III-ompA	Citoplasma, Periplasma	0,4	G-75	MIN <i>et al.</i> 1992
BL	pET-3d-BL	Citoplasma	0,5	N-acetil-glicosamina	SCHROEDER & RAIKHEL (1992)
BL	pET-8c-ssSL	Citoplasma	1,0	Sepharose 4B	CHAO <i>et al.</i> (1994)
BL	pET-8c-mSL	Citoplasma	100	Sepharose 4B	(1994)
Cadeias β e γ da ConA	pIN-pro	Citoplasma	1,0-2,0	G-75	MIN & JONES, (1994)
PNA	pBSH-PN	Citoplasma	1,2	Sepharose-lactosil	SHARMA & SUROLIA (1994)
Pro-PSA	pMS-2	Citoplasma	2,0-5,0	G-75	STUBBS <i>et al.</i> (1986)
SBA	pET-3d-SBA	Citoplasma	1,0	Sepharose 6B	ADAR <i>et al.</i> (1997)
Pre-pro-ConBr	pETconbr	Citoplasma	15-30	Sepharose-níquel	NOGUEIRA (1999)

9 CONCLUSÃO

Os eventos co- e pós-traducionais que ocorrem durante a biossíntese da ConBr em sementes em desenvolvimento de *Canavalia brasiliensis* são necessários para produzir uma lectina com atividades biológicas plenas.

10 BIBLIOGRAFIA

- ABE, Y., IWABUCHI, M. & ISHIL, S. Multiple forms in the subunit structure of concanavalin A. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v.45, n.5, p.1271-1278, 1971.
- ABE, Y., SHIRANE, K., YOKOSAKA, H., MATSUSHITA, H., MITTA, M., KATO, I. & ISHII, S. Asparaginyl endopeptidase of jack bean seeds. **J. Biol. Chem.**, v.268, n.5, p.3525-3529, 1993.
- ADAR, R. *et al.* Synthesis of soybean agglutinin in bacterial and mammalian cells. **Eur. J. Biochem.**, v.249, p.684-689, 1997.
- ADAR, R., RICHARDSON, M., LIS, H. & SHARON, N. The amino acid sequence of *Erythrina corallodendron* lectin and its homology with other legume lectins. **FEBS Letter**, v.257, n.1, p.81-85, 1989.
- AINOUZ, I.L., MOREIRA, R.A., CAMPOS, F.D.A.P., RICHARDSON, M., BEGBIE, R. STEWART, J.C., WATT, W.P. & PUSZTAI, A. The isolation and amino acid sequence of the β - and γ -subunits of the lectin from the seeds of *Dioclea grandiflora*, **Phytochemistry**, v.26, n.5, p.1435-1440, 1987.
- ALTER, G.M. & MAGNUSON, J.A. Characterization of concanavalin A sugar binding site by ^{19}F nuclear magnetic resonance. **Biochemistry**, v.13, n.19, p.4038-4045, 1974.
- ANDRADE, J. L., ARRUDA, S., BARBOSA, T., PAIM, L., RAMOS, M. V., CAVADA, B. S. & BARRAL-NETTO, M. Lectin-induced nitric oxide production. **Cell. Immunol.**, v.194, n.1, p.98-102, 1999.

- ARANGO, E. R., ADAR, R., ROZENBLATT, S. & SHARON, N. Expression of *Erythrina corallodendrom* lectin in *Escherichia coli*. **Eur. J. Biochem.**, v.205, p.575-581, 1992a.
- ARANGO, E. R., ARANGO, R., ADAR, R., GALILI, G. & SHARON, N. Cloning sequence analysis and expression in *Escherichia coli* of the cDNA encoding a precursor of peanut agglutinin. **FEBS Lett.**, v.307, p.185-189, 1992b.
- ASSREUY, A. M. S., SHIBUYA, M. D., MARTINS, G. J., DE SOUZA, M. L. P., CAVADA, B. S., MOREIRA, R. A., OLIVEIRA, J. T. A., RIBEIRO, R. A. & FLORES, C. A. Anti-inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. **Mediators of inflammation**, v.6, p.201-210, 1997.
- BANERJEE, R., MANDE, S. C., GANESH, V., DAS, K., DHANARAJ, V., MAHANTA, S. K., SUGUNA, K., SUROLIA, A. & VIJAYAN, M. Crystal structure of peanut lectin, a protein with an unusual quaternary structure. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.91, p.227-231, 1994.
- BARBOSA, T., ARRUDA, S., CAVADA, B. S., RODRIGUES, L. A., GRANGEIRO, T. B. & BARRAL NETO, M. Lymphocyte activation and apoptosis induction in BALB/c mice treated with plant lectins. **Celular Immunology**, 1999, (submitted).
- BARRAL-NETTO, M., SANTOS, S.B., BARRAL, A., MOREIRA, L.I. M., SANTOS, C.F., MOREIRA, R.A., OLIVEIRA, J.T.A. AND CAVADA, B.S. Human lymphocyte stimulation by legume lectins from the Diocleae tribe. **Immunological Investigation**, v.21, n.4, p.297- 303, 1992.
- BARRAL-NETTO, M., VON SOHSTEN, R.L., TEIXEIRA, M., CONRADO DOS SANTOS, W.L., POMPEU, M.L., MOREIRA, R.A., OLIVEIRA, J.T.A., CAVADA, B.S., FALCOFF, E. & BARRAL, A. "In vivo" protective effect of the lectin from *Canavalia brasiliensis* on BALB/c mice infected by *Leishmania amazonensis*. **Acta Tropica**, v.60, p.237-250, 1996.

- BECKER, J.W., REEKE, G.N., WANG, J.L., CUNNINGHAM, B.A. & EDELMAN, G.M. The covalent structure and three-dimensional structure of concanavalin A III. Structure of the monomer and its interactions with metals and saccharides. **J. Biol. Chem.**, v.250, n.4, p.1513-1524, 1975.
- BENTO, C.A.M., CAVADA, B.S., OLIVEIRA, J.T.A., MOREIRA, R.A. AND BARJA-FIDALGO, C. Rat paw edema and leucocyte immigration induced by plant lectins. **Agents and Actions**, v.38, p.48-54, 1993.
- BHATTACHARYYA, I., HARALDSSON, M., SHARON, N., LIS, H. & BREWER, F. Binding and precipitating activities of *Erythrina* lectins with complex type carbohydrates and synthetic cluster glycosides. A comparative study of the lectins from *E. corallodendron*, *E. cristagalli*, *E. flabelliformis* and *E. indica*. **Glycoconjugate J.**, v.6, p.141-150, 1989.
- BOISSEAU, C., CAUSSE, H., MOISAND, A., PERE, D., CAVADA, B.S. & ROUGÉ, P. Localization and biosynthesis of *Lathyrus ochrus* seed lectin. In: ARNAUD, P., BIENVENU, J & LAURENT, P. (Eds.): **Marker proteins in inflammation**, Berlin: Walter de Gruyter, 1984, 2: p.651-654.
- BOLLINI, R., CERIOTTI, A., DIMINATI, M. G. & VITALE, A. Glycosylation is not needed for the intracellular transport of phytohemagglutinin in developing *Phaseolus vulgaris* cotyledons and for the maintenance of its biological activities. **Physiologia Plantarum**, v.65, p.15-22, 1985.
- BOURNE, Y., ABERAET, C., CABBILLAU, C., FREY, M., ROUGÉ, P. & FONTECILLA-CAMPS, J. C. X-ray crystal structure determination and refinement at 1,9 Å resolution of isolectin I from the seeds of *Lathyrus ochrus*. **J. Mol. Biol.**, v.214, p.571-584, 1990.
- BOURNE, Y., MAZURIER, L., LEGRAND, D., ROUGÉ, P., MONTREUIL, J., SPICK, G. & CABBILLAU, C. Structure of a legume lectin complexed with the human

- lactotransferrin N2 fragment, and with an isolated biantennary glycopeptide: role of the fucose moiety. **Structure**, v.2, p.209-219, 1994.
- BOWLES, D. J. & PAPPIN, D. J. Traffic and assembly of concanavalin A. **TIBS**, v.13, p.60-64, 1988.
- BOYD, W. C. & SHARPLEIGH, E. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). **Science**, v.119, p.419, 1954.
- BROEKAERT, W. F., ALLEN, A.K. & PEUMANS, W. J. Separation and partial characterization of isolectins with different subunits compositions from *Datura stramonium* seeds. **FEBS Letters**, v.220, n.1, p.16-120, 1987.
- BROEKAERT, W. F., NSIMBA-LUBAKY, M., PEETERS, B. & PEUMANS, W. J. A lectin from elder (*Sambucus nigra* L.) bark. **Biochemistry J.**, v.221, p.163-169, 1984.
- BROWN, R.D., BREWER, C.F. & KOENIG, S.H. Conformation states of concanavalin A: kinetics of transitions induced by interaction with Mn^{2+} and Ca^{2+} ions. **Biochemistry**, v.16, n.17, p.3883-3896, 1977.
- BREWER, C. F. Multivalent carbohydrate-lectin interactions. A general mechanism for the formation of homogenous non-covalent cross-linked complex in biological systems. In: VAN DRIESSE, E., ROUGÉ, P., BEECKMANS, S. & BOG-HANSEN, T. C. (Eds.) **Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**, 1996, v.11, p.10-166.
- 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.
- CAVADA, B. S. **Lectinas de *Canavalia brasiliensis* Mart. Isolamento, caracterização parcial e comportamento durante a germinação.** Fortaleza, 1980. Dissertação

(Mestrado). Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade Federal do Ceará 87 p.

CAVADA, B.S., GRANGEIRO, T.B., RAMOS, M.V., CORDEIRO, E.F., OLIVEIRA, J.T.A. & MOREIRA, R.A. Isolation and partial characterization of a lectin from *Dioclea rostrata* Benth seeds. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.**, v. 8, n.1, p.31-36, 1996b.

CAVADA, B.S., MOREIRA, R.A., OLIVEIRA, J.T.A. AND GRANGEIRO, T.B. Primary structures and functions of plant lectins. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.**, v.5, n.2, p.193-202. 1993.

CAVADA, B. S., NOGUEIRA, N. A. P., FREITAS, C. M. S. A., GRANGEIRO, T. B., RAMOS, M. V., THOLE, H. H., ROUGÉ P. & CALVETE, J. J. Primary structure and kinetic interaction with glycoproteins of the lectin from seeds of *Cratylia floribunda*. **Protein and Peptide Letters**, v.6, n.1, p.27-34, 1999.

CAVADA, B.S., RAMOS, M.V., CORDEIRO, E.F., GRANGEIRO, T.B., OLIVEIRA, J.T.A., A. DE F.F.U. CARVALHO, A. DE F.F.U. & MOREIRA, R.A. Purification and partial characterization of a lectin from *Dioclea virgata* Benth seeds. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.**, v. 8, n.1, p.37-42, 1996a.

CHAO, Q., CASALONGUE, C., QUINN, J. M. & ETZLER, M. E. Expression and partial characterization of *D. biflorus* seed lectin in *Escherichia coli*. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.313, n.2, p.46-350, 1994.

CHRISPEELS, M.J., HARTL, P.M. & FAYE, L. Characterization of the endoplasmic reticulum-associated precursor of concanavalin A. **J. Biol. Chem.**, v.261, n.22, p.10021-10024, 1986.

CHRISPEELS, M. J. & RAIKHEL, N. V. Lectins, lectins genes, and their role in plant defense. **The Plant Cell.**, v.3, p.1-9, 1991.

- CLAUSEN, J. Immunochemical techniques for the identification of macromolecules. In: WORK, T. S. & WORK, E. (Eds.). **Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology.**, Amsterdam: North-Holland, 1969, v.1, 572 p.
- COOPER, A. A. & STEVENS, T. H. Protein splicing: Excision of intervening sequences at the protein level. **BioEssays**, v.15, n.10, p.667-674, 1993.
- CUNNINGHAM, B. A., HEMPERLY, J., HOPP, T. P. & EDELMAN, G. M. Favin versus concanavalin A: circularly permuted amino acid sequence. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.76, n.7, p.3218-3222, 1979.
- CUNNINGHAM, B. A.; WANG, J. L.; WAXDAL, M. J. & EDELMAN, G. M. The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A II. Amino acid sequence of cyanogen bromide fragment F2. **J. Biol. Chem.**, v.250, n.4, p.1503-1512, 1975.
- DALE, J. R. & FOREMAN, J. C. Introduction of immunology and pathology of host defense mechanisms. In: DALE, M. M. & FOREMAN, J. C. (Eds.), **Textbook of Immunopharmacology**, Blackwell Scientific Publications, 1989, p.1-16.
- DAM, T. K., CAVADA, B. S., GRANGEIRO, T. B., SANTOS, C. F., SOUSA, F. A. M., OSCARSON, S. & BREWER, C. F. Diocleinae lectins are a group of proteins with conserved binding sites for the core trimannoside of asparagine-linked oligosaccharides and differential specificities for complex carbohydrate. **The J. Biol. Chem.**, v.273, n.20, p.12082-12088, 1998.
- DATTA, P.K., FIGUEROA, M.O.D.C.R. & LAJOLO, F.M. Purification and characterization of two major lectins from *Araucaria brasiliensis* syn. *Araucaria angustifolia* seeds (pinh ã). **Plant Physiol.**, v.90, p.856-862, 1991.
- DELBAERE, L. T. J., VANDONSELAAR, M., PRASAD, L., QUAIL, J. W., WILSON, K. S. & DAUTER, Z. Structure of the lectin IV of *Grinffonia simplicifolia* and its complex with the Lewis b human blood group determination at 2,0 Å resolution. **J. Mol. Biol.**, v.230, p.950-965, 1993.

- DEREWENDA, Z., YARIV, J. HELIOWELL, J. R., KALB (GILBOA), A. J., DODSON, E. J., PAPIZ, M. W., WAN, T. & CAMPELL, J. The structure of the saccharide-binding site of concanavalin A. **EMBO J.**, v.8, p.2189-2193, 1989.
- DESSEN, A., GUPTA, D., SABESAN, S., BREWER, C. F. & SACCHETTINI, J. C. X-ray structure of the soybean agglutinin cross-linked with a biantennary analog of the blood group I carbohydrate antigen. **Biochemistry**, v.34, p.4933-4942, 1995.
- DIAZ, C. L., LEMS-VAN KAK, P., VAN DER SCHAAL, I. A. M. & KIJNE, J. W. Determination of pea (*Pisum sativum*) root lectin using an enzyme-linked immunoassay. **Planta**, v.161, p.302-307, 1984.
- DRICKAMER, K. Multiplicity of lectin-carbohydrate interactions. **Structural Biol.**, v.2, n.6, p.437-439, 1995.
- EDELMAN, G.M. & WANG, J.L Binding and functional properties of concanavalin A and its derivatives III. Interactions with indoleacetic acid and other hydrophobic ligands. **J. Biol. Chem.**, v.253, n.9, p.3016-3022, 1978.
- EDMAN, P. Preparation of phenyl thiohydantoin from some natural amino acids. **Acta Chem. Scand.**, v.4, p.277-282, 1950.
- EINSPAHR, H., PARKS, E. H., SUGUNA, K., SUBRAMANIAN, E. & SUDDATH, F. L. The crystal structure of pea lectin at 3,0 Å resolution. **J. Biol. Chem.**, v.261, p.16518-16527, 1986.
- ELTZER, M. E. 1985. Plant lectins: molecular and biological aspects. **Ann. Rev. Plant Physiol.**, v.36, p.209-234, 1985.
- ELTZER, M. E. Distribution and function of plant lectins. In: LIENER, I. E., SHARON, N. & GOLDSTEIN, I. J. (Eds.). **The Lectins: Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine**. Academic Press, Inc., 1986, 600 p.,

- ELTZER, M. E. The *Dolichos biflorus* lectins family: A model system for studying legume lectin structure and function. In: VAN DRIESSCHE, E., ROUGÉ P., BEECKMANS, S. & BOG-HANSEN, T. C. (Eds.). **Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**, 1996, v. 11, p.3-9.
- FAYE, L. & CHRISPEELS, M. J. Transport and processing of the glycosylated precursor of concanavalin A in jack-bean, **Planta**, 170: p.217-224, 1987.
- FAYE, L., STURM, A., BOLLINI, R. VITALE, A. & CHRISPEELS, M. J. The position on the oligosaccharide side-chains of phytohemagglutinin and their accessibility to glycosidases determines their subsequent processing in the Golgi. **Eur. J. Biochem.**, v.158, p.655-661, 1986.
- FELSTED, R. L., LEAVITT, R. D., CHEN, C., BACHUR, N. R. & DALE, R. M. K. Phytohemagglutinin isolectin subunit composition. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.668, p.132-140, 1981.
- FENG, W., HUTH, J. R., NORTON, S. E. & RUDDON, R. W. Asparagine-linked oligosaccharides facilitate human chorionic gonadotropin beta-subunit folding but not assembly of prefolded beta with alpha. **Endocrinology**, v.136, n.1, p.52-61, 1995.
- FERREIRA, R. R., CAVADA, B. S., MOREIRA, R. A., OLIVEIRA, J. T. A. & GOMES, J. C. Characteristics of the histamine release from hamster cheek pouch mat cells stimulated by lectins from Brazilian beans and concanavalin A. **Inflamn. Res.**, v.45, p.442-447, 1996.
- FORIERS, A., LEBRLUN, E., VAN RAPENBUSCH, R., DE NEVE, R. & STROSBERG, A. D. The structure of the lentil (*Lens culinaris*) lectin: Amino acid sequence determination and prediction of a secondary structure. **J. Biol. Chem.**, v.224, p.301-307, 1981.

- FUJIMURA, S., TERADA, S., JAYAVARDHANAN, K. K., PANIKKAR, K. R. & KIMOTO, E. Primary structures of Concanavalin A-like lectins from seeds of two species of *Canavalia*. **Phytochemistry**, v.33, n.5, p.985-987, 1993.
- GABIUS, H. J. & GABIUS, S. **GLYCO-SCIENCES**. London, Chapman & Hall, 1997, 631p.
- GOHIER, A., ESPINOSA, J. F., JIMENEZ-BARBERO, J., CARRUPT, P. A., PEREZ, S. & IMBERTY, A. Knowledge-based modeling of legume lectin and docking of the carbohydrate ligand: the *Ulex europaeus* lectin I and its interaction with fucose. **J. Mol. Graph.**, v.14, n.6, p.322-327, 1996.
- GOLDSTEIN, I. J., HUGHES, R. C., MONSIGNY, M., OSAWA, T. & SHARON, N. What should be called a lectin? **Nature**, v.285, p.66, 1980.
- GOLDSTEIN, I. J. & PORETZ, R. D. Isolation and chemical properties of lectins. In: LIENER, I. E., SHARON, N. & GOLDSTEIN, I. J. (Eds.). **The Lectins: Properties, Functions and applications in Biology and Medicine**. Academic Press, London, 1986, p.33-247.
- GOMES, J.C., CAVADA, B.S., MOREIRA, R.A. & OLIVEIRA, J.T.A. Histamine release induced by glucose (mannose) specific lectins isolated from Brazilian plants. Comparison with concanavalin A. **Agents and Actions**, v.41, p.132-135, 1994.
- GRANGEIRO, T. B. **Seqüência parcial de aminoácidos da lectina (ConBr) de sementes de *Canavalia brasiliensis* Mart.** Fortaleza, 1993. Dissertação (Mestrado). Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará. 138p.
- GRANGEIRO, T. B. **Clonagem, sequenciamento e expressão do gen da lectina (ConBr) de sementes de *Canavalia brasiliensis*.** Fortaleza, 1996. Dissertação

(Doutorado. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará 133p.

- GRANGEIRO, T. B., GATEHOUSE, J. A., PEREIRA, M. N. & CAVADA, B. S. Investigation on the origin of the naturally occurring fragments of *Cratylia floribunda* lectin. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.**, v.9, n.1, p.9-13, 1997b.
- GRANGEIRO, T. B., SCHRIEFER, A., CALVETE, J.J., RAIDÁ, M., URBANKE, C., BARRAL-NETTO, M. & CAVADA, B. S. Molecular cloning and characterization of ConBr, the lectin of *Canavalia brasiliensis* seeds. **Eur. J. Biochem.**, v.248, p.43-48, 1997a.
- GUILLOT, J., GRIFFAUT, B., JAEGHER, G. & DUSSER, M. Isolament, caracterisation partielle et localisation d'une lectine dans le tubercule de Topinambour (*Helianthus tuberosus* L.). **C. R. Acad. Sci. Paris**, t.312, Serie III, p.573-578, 1991.
- HANKINS, C., KINDINGER, J. I. & SHANNON, L. M. The lectins of *Sophora japonica*. II. Purification, properties and N-terminal amino acid sequences of five lectins from bark. **Plant Physiol.**, v.86, p.67-70, 1988.
- HARDMAN, K.D. & AINSWORTH, C.F. Structure of concanavalin A at 2.4-Å resolution. **Biochemistry**, v.11, n.26, p.4910-4919, 1972.
- HARDMAN, K.D. & AINSWORTH, C.F. Structure of the concanavalin A-methyl alpha-D-mannopyranoside complex at 6-Å resolution. **Biochemistry**, v.15, n.5, p.1120-1128, 1976.
- HEMPERLY, J. J., MOSTOV, K. E. & CUNNINGHAM, B. A. *In vitro* translation and processing of a precursor form of favin, a lectin from *Vicia faba*. **J. Biol. Chem.**, v.257, n.13, p.7903-7909, 1982.
- HERMAN, E. M., SHANNON, L. M. & CHRISPEELS, M. J. Concanavalin A is synthesized as a glycoprotein precursor. **Planta**, v.165, p.23-29, 1985.

- HIGGINS, T. J. V., CHANDLER, P. M., ZURAWSKI, G., BUTTON, S. C. & SPENCER, D. The biosynthesis and primary structure of pea seed lectin. **J. Biol. Chem.**, v.258, n.15, p.9544-9549, 1983.
- HOFFMAN, L. M. & DONALDSON, D. D. Characterization of two *Phaseolus vulgaris* phytohemagglutinin genes closely linked on the chromosome. **The EMBO Journal**, v.4, n.4, p.883-889, 1985.
- HOPP, T. P., HEMPERLY, J. J. & CUNNINGHAM, B. A. Amino acid sequence and variant forms of favin, a lectin from *Vicia faba*. **J. Biol. Chem.**, v.257, n.8, p.4473-4483, 1982.
- IMBRIE-MILLIGAN, C., DATTA, P. & GOLDSTEIN, I. J. Isolation and characterization of a cDNA clone encoding the lima bean lectin. **J. Biol. Chem.**, v.264, n.28, p.16793-16797, 1989.
- JORDAN, E. T. & GOLDSTEIN, I. J. The sequence of a second member of the lima bean lectin gene family and the expression and characterization of recombinant lectin in *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.**, v.269, n.10, p.7674-7681, 1994.
- KAGEDAL, L. Immobilized metal ion affinity chromatography. In: JANSON, J. C. & RYDÉN, L. (Eds.). **Protein Purification. Principles, high resolution methods, and applications**. VCH Publ, Inc, NY, 1989.
- KELLA, N. D. K., ROBERTS, D. D., SHAFER, J. A. & GOLDSTEIN, I. J. Fluorescence energy transfer studies on lima bean lectin. Distance between the subunit hydrophobic binding site and the thiol group essential for carbohydrate binding. **J. Biol. Chem.**, v.259, n.8, p.4777-4781, 1984.
- KIMURA, N., UCHIDA, M., NISHIMURA, S. & YAMAGUCHI, H. Promotion of the polypeptide folding by interactions with Asn-Glycans. **J. Biochem.**, v.124, n.4, p.857-862, 1998.

- KONAMI, Y., YAMAMOTO, K. & OSAWA, T. The primary structures of two types of the *Ulex europeus* seed lectin. **J. Biochem.**, v.109, p.650-658, 1991a.
- KONAMI, Y., YAMAMOTO, K. & OSAWA, T. Purification and characterization of two types of *Cytisus sessilifolius* Anti-H(O) lectins by affinity chromatography. **Biol. Chem.**, v.372, p.103-111, 1991c.
- KONAMI, Y., YAMAMOTO, K., OSAWA, T. & IRIMURA, T. The primary structure of the *Cytisus scoparium* seed lectin and a carbohydrate-binding peptide. **J. Biochem.**, v.112, p.366-375, 1992.
- KONAMI, Y., YAMAMOTO, K., TOYOSHIMA, S. & OSAWA, T. The primary structure of the *Laburnum alpinum* seed lectin. **FEBS Letters**, v.286, n.1, p.35-38, 1991b.
- KOSHTE, V. L., DIJK, W. V., STELT, M. E. V. D. & AALBERSE, R. C. Isolation and characterization of Banlec-I, a mannoside-binding lectin from *Musa paradisiac* (Banana). **Biochem. J.**, v.272, p.721-726, 1990.
- KOUCHALAKOS, R., BATES, O. J., BRADSHAN, R. A. & HAPNER, K. D. Lectin from sainfoin (*Onobrychis viciifolia*). Complete amino acid sequence. **Biochemistry**, v.23, n.1824-1830, 1984.
- KUSNADI, A. R., NIKOLOV, Z. L. & HOWARD, J. A. Production of recombinant proteins in transgenic plants: Practical considerations. **Biotech. Bioengin.**, v.56, n.5, p.474-484, 1997.
- KUSUI, K., YAMAMOTO, K., KONAMI, Y. & OSAWA, T. cDNA cloning and expression of *Bauhinia purpurea* lectin. **J. Biochem.**, v.109, p.899-903, 1991.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

- LIENER, I. L., SHARON, N. & GOLDSTEIN, I. J. **The Lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine**, New York, Academic Press, 1986, 600p.
- LIS, H. & SHARON, N. Lectins in Higher Plants, In: STUMPF, P. K. & CONN, E. E. (Eds.). **The Biochemistry of Plants**. Academic Press Inc., New York, 1981, v.6, p.371-447.
- LOONTIENS, F. G., CLEGG, R. M. & JOVIN, T. M. Binding of 4-methylumbelliferyl alfa-D-mannopyranoside to tetrameric and unmodified or derivatized dimeric concanavalin A: equilibrium studies. **Biochemistry**, v.16, n.2, p.59-166, 1977.
- LORIMER, G. H. A quantitative assessment of the chaperonin proteins in protein folding *in vivo*. **FASEB J.**, v.10, n.1, p.5-9, 1996.
- LORIS, R., STEYAERT, J., MAES, D., LISGARTEN, J., PICKERSGILL, R. & WYNS, L. Crystal structure determination and refinement a 2,3 Å resolution of the lentil lectin. **Biochemistry**, v.32, p.8772-8781, 1993.
- MAKELA, O. Studies in hemagglutinins of Leguminosae seeds. **Ann. Med. Exp. Biol. Fenn.**, v.35, (Suppl. 11), p.1-156, 1957.
- MALIARIK, M. & GOLDSTEIN, I. J. Photoaffinity labeling of the adenine binding site of the lectins from lima beans, *Phaseolus lunatus*, and the kidney bean, *Phaseolus vulgaris*. **J. Biol. Chem.**, v.263, n.23, p.1274-1279, 1988.
- MIN, W., DUNN, A. J. & JONES, D. H. Non-glycosylated recombinant pro-concanavalin A is active without polypeptide cleavage. **EMBO J.**, v.11, p.1303-1307, 1992.
- MIN, W. & JONES, D. H. Stability and detection of recombinant pre-pro-concanavalin A after cytoplasmic expression in *Escherichia coli*. **FEBS**, v.3, p.315-318, 1992..

- MIN, W. & JONES, D. H. In vitro splicing of concanavalin A is catalysed by asparaginyl endopeptidase. **Structural Biol.**, v.1, n.8, p.502-504, 1994.
- MOREIRA, R. A., BARROS, A. C. H., STEWART, J. C. & PUSZTAI, A. Isolation and characterization of a lectin from the seeds of *Dioclea grandiflora* (Mart). **Planta**, v.158, p.63-69, 1983.
- MOREIRA, R. A. & CAVADA, B. S. Lectin from *Canavalia brasiliensis* (Mart). isolation, characterization and behavior during germination. **Biologia Plantarum**, v.26, n.2, p.113-120, 1984.
- MOREIRA, R.A., CORDEIRO, E.F., GRANGEIRO, T.B., RAMOS, M.V., MARTINS, J.L., CAVADA, B.S., OLIVEIRA, J.T.A. & MOREIRA, R.A. Isolation and partial characterization of a lectin from *Dioclea violacea* Benth seeds. Aceito para publica çã na: **Rev. Bras. Fisiol. Veg.**, 1996.
- MOREIRA, R.A., SILVA, L.M.A., HORTA, A.C.G., OLIVEIRA, J.T.A AND CAVADA, B.S. Lectin from *Canavalia brasiliensis* mart. Behavior during maturation and detection of a lectin precursor. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.**, v.5, n.2, p.133-138, 1993.
- NAGAI, K., SHIBATA, K. & YAMAGUCHI, H. Role of intramolecular high-mannose chains in the folding and assembly of soybean (*Glycine max*) lectin polypeptides: studies by the combined use of spectroscopy and gel-filtration size analysis. **J. Biochem.**, v.114, p.830-834, 1993.
- NAGAI, K & YAMAGUCHI, H. Direct demonstration of the essential role of the intramolecular high-mannose oligosaccharide chains in the folding and assembly of soybean (*Glycine max*) lectin polypeptides. **J. Biochem.**, v.113, p.123-125, 1993.
- NAISMITH, J. H., EMMERICH, C, HABASH, J., HARROPS, S. J., HELLIWELL, J. R., HUNTER, W. N., RAFTERY, J., KALB(GILBOA), A. J.& YARIV, J. Refined structure of concanavalin A complexed with methyl- α -D-mannopyranoside at 2,0 Å

- resolution and comparison with the saccharide-free structure. **Acta Crystallogr., D50**, p.847-858, 1994.
- NAISMITH, J. H. & FIELD, R. A. Structural basis of trimannoside recognition by concanavalin A, **J. Biol. Chem.**, v.271, p.972-976, 1996.
- OLIVEIRA, J. T. A., CAVADA, B. S. & MOREIRA, R. A. Isolation and partial characterization of a lectin from *Cratylia floribunda* Mart. seeds. **Rev. Bras. Bot.**, v.14, p.61-66, 1991.
- OSAWA, T. & MATSUMOTO, I. Gorse (*Ulex europaeus*) phytohemagglutinins. **Methods in Enzymology**, v.28, p.323-327, 1972.
- OSINAGA, E., TELLO, D., BATHYANY, C., BIANCHET, M., TAVARES, G., DURAN, R., CERVENANSKY, C., CAMOIN, L., ROSETO, A. & ALZARI, P. M. Amino acid sequence and three-dimensional structure of the Tn-specific isolectin B4 from *Vicia villosa*. **FEBS Letters**, v.412, n.1, p.190-196, 1997.
- PEREZ, G., HERNANDEZ, M. & MORA, E. Isolation and characterization of a lectin from the seeds of *Dioclea lehmanni*. **Phytochemistry**, v.29, n.6, p.1745-1749, 1990.
- PEREZ, G.; PEREZ, C.; CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A.; & RICHARDSON, M. Comparison of the amino acid sequences of the lectins from seeds of *Dioclea lehmanni* and *Canavalia maritima*. **Phytochemistry**, v.30, n.8, p.1619-2621, 1991.
- PEUMANS, W. J., DE LEY, M. & BROEKAERT, W. F. An unusual lectin from stinging nettle (*Urtica dioica*) rhizomes. **FEBS Letters**, v.177, p.99-103, 1984.
- PEUMANS, W. J., NSIMBA-LUBAKI, M., PEETERS, B. & BROEKAERT, W. F. Isolation and partial characterization of a lectin from ground elder (*Aegopodium podagraria*) rhizoms. **Planta**, v.164, p.75-82, 1985.

- PEUMANS, W. J. & VAN DAMME, E. J. M. The role of lectins in plant defence. **Histochem. Journal**, v.27, p.253-271, 1995a.
- PEUMANS, W. J. & VAN DAMME, E. J. M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiol.**, v.109, p.347-352, 1995b.
- PEUMANS, W. J., ALLEN, A. K. & CAMMUE, B. P. A. A new lectin from meadow saffron (*Colchicum autumnale*). **Plant Physiol.**, n.82, p.1036-1039, 1986..
- POLHILL, R. M., RAVEN, P.H., STIRTON, C. H. Evolution and sistematics of the *Leguminosae*. In: POLHILL, R. M. & RAVEN, P. H. (Eds.): **Advances in legume sistematics**. Richmond, England, 1981, parte I, 425 p.
- POOLA, I. & KELLA, N. K. D. Binding of methylumbelliferyl N-acetyl-beta-D-glucopyranoside and 4- methylumbelliferyl N, N'-diacetyl-beta-chinobioside to rice lectin: Studies by equilibrium dialysis and fluorescence quenching titrations. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.882, p.12-17, 1986.
- PRASTHOFER, T., PHILLIPS, S. R., SUDDATH, F. L. & ENGLER, J. A. Design, expression, and crystallization of recombinant lectin from the garden pea (*Pisum sativum*). **J. Biol. Chem.**, v.264, n.12, p.6793-6796, 1989.
- PUSZTAI, A. **Plant lectins**. Cambridge. Cambridge University Press, 1991, 263 p..
- PUSZTAI, A. & BARDOCZ, S. **Lectins. Biomedical Perspectives**. Taylor & Francis, Aberdeen, Scotland., 1995, 331 p.
- RAMOS, M.V. **Características estruturais e funcionais de lectinas de *Diocleinae***. Fortaleza, 1996, Tese (Doutorado). Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Cear á 116 p.

- RAMOS, M.V., MOREIRA, R. A., CAVADA, B. S., OLIVEIRA, J. T. A. & ROUGÉ P.
Interaction of lectins from the sub-tribe *Diocleinae* with specific ligands. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.**, v.8, n.3, p.193-199, 1996.
- REEKE Jr, G. M. & BECKER, J. W. Three-dimensional structure of favin: saccharide binding-cyclic permutation in leguminous lectins. **Science**, v.234, p.1108-1111, 1986.
- REEKE, G.N., BECKER, J.W. & EDELMAN, G.M. The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A IV. Atomic coordinates, hydrogen bonding, and quaternary structure. **J. Biol. Chem.**, v.250, n.4, p.1525-1547, 1975.
- RHEN, M., KLEMM, P. & KORHONEN, T. K. Identification of two new hemagglutinins of *Escherichia coli*, N-acetyl-D-glucosamine-specific fimbriae and a blood group M-specific agglutinin, by cloning the corresponding genes in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v.168, n.3, p.1234-1242, 1996.
- RICHARDSON, M., CAMPOS, F. D. A. P., MOREIRA, R.A., AINOUS, I.L., BEGBIE, R., WATT, W.B. & PUSZTAI, A. The complete amino acid sequence of the major alpha subunit of the lectin from seeds of *Dioclea grandiflora* (Mart). **Eur. J. Biochem**, v.144, p.101-111, 1984a.
- RICHARDSON, M., ROUGÉ P., CAVADA, B.S. AND YARWOOD, A. The amino acid sequences of the alpha and beta subunits of the isolectins from the seeds of *Lathyrus ochrus* (L) DC. **FEBS Letters**, v.175, p.76-81, 1984b.
- RINI, J. M. Lectins structure. **Annu. Ver. Biophys. Biomol. Struct.**, v.24, p.551-577. 1995.
- ROBERTS, D. D. & GOLDSTEIN, I. J. Adenine binding sites of the lectins from lima beans (*Phaseolus lunatus*). **J. Biol. Chem.**, v.258, p.13820-13824, 1983.

- RODRIGUEZ-ARANGO, E., ARANGO, R., ADAR, R., GALILI, G. & SHARON, N. Cloning, sequence analysis and expression in *Escherichia coli* of the cDNA encoding a precursor of peanut agglutinin. **FEBS Letters**, v.307, n.2, p.185-189, 1992..
- RODRIGUEZ, D., CAVADA, B.S., OLIVEIRA, J.T.A., MOREIRA, R.A. AND RUSSO, M. Differences in macrophage stimulation and leukocyte accumulation in response to intraperitoneal administration of glucose/ mannose-binding plant lectins. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, v.25, p.823-826, 1992.
- ROUGÉ P., RICHARDSON, M., RANFAING, P., YARWOOD, A., CAVADA, B.S. Single and two-chain legume lectins as phylogenetic markers of speciation. **Bioch. Sys. Ecol.**, v.15, n.3, p.341-348, 1987.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. **MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL**. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- 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, p.114-118, 1997.
- SCHNELL, D. J. & ETZLER, M. E. Primary structure of the *Dolichos biflorus* seed lectin. **J. Biol. Chem.**, v.262, n.15, p.7220-7225, 1987.
- SCHROEDER, M. R. & RAIKHEL, N. V. Isolation and characterization of pro-barley lectin expressed in *Escherichia coli*. **Prot. Expression and Purification**, v.3, p.508-511, 1992.
- SCHULER, T. H., POPPY, G. M., KERRY, B. R. & DENHOLM, I. Insect-resistant transgenic plants. **TIBTECH**, v.16, p.168-174, 1998.

- SHAANAN, B., LIS, H. & SHARON, N. Structure of a legume lectin with an ordered N-linked carbohydrate in complex with lactose. **Science**, v. **254**, p.862-866, 1991.
- SHARMA, S. K. On the recovery of genetically engineered proteins from *Escherichia coli*-Review. **Separation Sci. Technol.**, v.**21**, n.8, p.701-726, 1986.
- SHARMA, V. & SUROLIA, A. Cloning by genomic PCR and production of peanut agglutinin in *Escherichia coli*. **Gene**, v.**148**, p.299-304, 1994.
- SHARON, N. Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals: an atomic view. **Trends Biochem. Sci.**, v.**18**, p.221-226, 1993.
- SHARON, N. & LIS, H. **LECTINS**. Chapman and Hall; London. 1989. 126 p.
- SHARON, N. & LIS, H. Legume lectins - a large family of homologous proteins. **FASEB J.**, v.**4**, p.3198-3208, 1990.
- SHELDON, P. S. & BOWLES, D. J. The glycoprotein precursor of concanavalin A is converted to an active lectin by deglycosylation. **ENDO J.**, v.**11**, p.1297-1301, 1992.
- SHELDON, P. S., KEEN, J. N. & BOWLES, D. J. Purification and characterization of N-glycanase, a concanavalin A binding protein from jackbean (*Canavalia ensiformis*). **Biochem. J.**, v.**30**, n.1, p.13-20, 1998.
- SHORE, P. A., BURKALTER, A. & COHN, J. H. A method for the fluorometric assay of histamine in tissue. **J. Pharmacol Exp. Ther.**, v.**127**, p.182-190, 1959.
- SIKDAR, S., AHMED, H. & CHATTERJEE, B.P. A pH dependent low-molecular weight blood group A specific lectin from *Crotalaria striata* seeds: purification and carbohydrate specificity. **Biochemical Archives**, v.**6**, p.207-215, 1990.
- SIPRA, D. **Structural studies on the *Dolichos biflorus* seed lectins**. Tese (Doutorado). University of Portsmouth, 1997, 207p.

- SOUZA, G. E. P. & FERREIRA, S. H. Blockage by antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophili into the inflammed peritoneal cavity. **A Genes Actions**, v.17, p.1-5, 1985.
- STINISSEN, H. M. & PEUMANS, W. J. Recent advances in biochemistry, cell biology, physiology, biosynthesis and genetics of *Gramineae* lectins. **Biochem. Physiol. Pflanzen.**, v.180, p.85-106, 1985.
- STUBBS, M. E., CARVER, J. P. & DUNN, R. J. Production of pea lectin in *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.**, v.261, n.14, p.6141-6144, 1986.
- STURN, A. & CHRISPEEL, M. J. The high mannose oligosaccharide of phytohemagglutinin is attached to asparagine 12 and the modified oligosaccharide to asparagine 60. **Plant Physiol.**, v.81, p.320-322, 1986.
- SUZUKI, T., KITAJIMA, K., INOUE, S. & INOUE, Y. Occurrence and potential functios of N-glycanases. In: GABIUS, H. J. & GABIUS, S. (Eds.) **GLYCO-SCIENCES**. London, Chapman & Hall, 1997, p.120-131.
- VAN DAMME, E.J.M., ALLEN, A.K. & PEUMANS, W.J. Leaves of the orchid twayblade (*Listera ovata*) contain a mannose-specific lectin. **Plant Physiol.**, v.85, p.566-569, 1987a.
- VAN DAMME, E.J.M., ALLEN, A.K. & PEUMANS, W.J. Isolation and characterization of a lectin with exclusive specificity towards mannose from snowdrop (*Galanthus nivalis*) bulbs. **Febs Letters**, v.215, n.1, p.140-144, 1987b.
- VAN DAMME, E.J.M. & PEUMANS, W.J. Isolectins in Narcissus: complexity, inter- and intraspecies differences and developmental control. **Physiologia Plantarum**, v.79, p.1-6, 1990.

- VAN DAMME, E.J.M. & PEUMANS, W.J. Lectins from *Monocotyledonae*. In: KILPATRICK, D. C., VAN DRIESSE, E., & B Ø-HANSEN, T. C. (Eds.), **Lectins Reviews**, Sigma Chemical Company, 1991, v.1, p.161-170.
- VAN DAMME, E. J. M. & PEUMANS, W. J. Progress in structural analysis of plant lectins through molecular cloning. In: VAN DRIESSE, E., ROUG É P., BEECKMANS, S., B Ø-HANSEN, T. C. (Eds.). **Lectins: Biochemistry, Clinical Biochemistry**. Textop, Hellerup, Denmark, 1996, v.11, p.17-27.
- VASCONCELOS, I.M., CAVADA, B.S., MOREIRA, R.A. & DE OLIVEIRA, J.T.A. Purification and partial characterization of a lectin from the seeds of *Dioclea guianensis*. **J. Food Bioch.**, v.15, p.137-154, 1991.
- VOELKER, T. A., HERMAN, E. M. & CHRISPPELS, M. J. "In vitro" mutated phytohemagglutinin genes expressed in tobacco seeds: role of glycans in protein targeting and stability. **The Plant Cell**, v.1, p.95-104, 1989.
- WEIS, W. I. & DRICKAMER, K. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. **Annu. Ver. Bioch.**, v.65, p.441-473, 1996.
- WEIS, W. I., KAHN, R., FOURME, R., DRICKAMER, K. & HENDRICKSON, W. A. Structure of the calcium-dependent lectin domain from a rat mannose-binding protein determined by MAD phasing. **Science**, v.254, p.1608-1615, 1991.
- WILLIAMS, D. B. The Merck Frosst Award Lecture 1994/La conference Merck Frosst 1994. Calnexin: a molecular chaperone with a taste for carbohydrate. **Biochem. Cell. Biol.**, v.73, n.3-4, p.123-132, 1995.
- WILSON, I. A., SKEHEL, I. J. J. & WILEY, D. C. Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution. **Nature**, v.289, p.366-373, 1981.

- YAMAGUCHI, H. & UCHIDA, M. A chaperone-function of intramolecular high-mannose chains in the oxidative refolding of bovine pancreatic Rnase B. **J. Biochem.**, v.120, n.3, p.474-477, 1996.
- YAMAUCHI, D. & MINAMIKAWA, T. Structure of the gene encoding concanavalin A from *Canavalia gladiata* and its expression in *Escherichia coli* cells. **FEBS Letters**, v.30, n.1, p.147-150, 1990.
- YAMAUCHI, D., NAKAMURA, K., ASAHI, T. & MINAMIKAWA, T. Nucleotide sequence of cDNA for concanavalin A from *Canavalia gladiata* seeds. **Plant Cell Physiol.**, v.30, n.1, p.147-150, 1989.
- YARWOOD, A., RICHARDSON, M., SOUSA-CAVADA, B. & ROUGÉ P. The complete amino acid sequences of the beta1- and beta2- subunits of the isolectins LOLI and LOLII from seeds of *Lathyrus ochrus* (L.) DC. **FEBS Letters**, v.184, n.1, p.104-109, 1985.
- YOUNG, N. M. & OOMEN, R. P. Analyses of sequence variation among legume lectins. A ring of hypervariable residues forms the perimeter of the carbohydrate-binding site. **J. Molec. Biol.**, v.228, p.942-934, 1992.
- YOUNG, N. M., WATSON, D. C., YAGUCHI, M., ADAR, R., ARANGO, R., RODRIGUEZ-ARANGO, E., SHARON, N., BLAY, P. K. S. & THIBAUT, P. C-terminal post-translational proteolysis of plant lectins and their recombinant forms expressed in *Escherichia coli*: characterization of "ragged ends" by mass spectrometry. **J. Biol. Chem.**, v.270, n.6, p.2563-2570, 1995.
- ZHU, K., HUESING, J. E., SHARE, R. E., BRESSAN, R. A. HASEGAWA, P. M. & MURDOCK, L. An insecticidal N-acetylglucosamine-specific lectin gene from *Griffonia simplicifolia* (Leguminosae). **Plant Physiol.**, v.110, n.1, p.195-202, 1996.

11 APÊNDICE

11.1 Preparação de meios de cultura

11.1.1 Ágar Luria-Bertani (Ágar LB)

Ágar LB foi obtido pela mistura dos seguintes ingredientes:

Bacto-triptona	10 g
Extrato de Levedura	5 g
NaCl	10 g
Bacto-ágar	15 g
H ₂ O	1000 ml

Após a dissolução dos ingredientes acima em água destilada, o meio obtido foi esterilizado em autoclave a 121 °C por 20 minutos a 15 lb/pol².

Quando necessário o uso de antibiótico, o meio foi resfriado a aproximadamente 50 °C, acrescido de ampicilina para uma concentração final de 100 µg/ml e distribuído em placas de Petri ou tubos de ensaio. Após solidificação do meio, as placas foram invertidas e mantidas a 4 °C, juntamente com os tubos de ensaio, até serem utilizados.

11.1.2 Caldo Luria-Bertani (Caldo LB)

A composição de caldo LB foi a mesma utilizada para ágar LB excluindo-se a adição de bacto-ágar. A adição de ampicilina foi realizada de maneira idêntica, e o meio pronto foi estocado a 4 °C em frascos erlemmeyer ou tubos de ensaio, até serem utilizados.

11.2 Preparação de culturas estoque em glicerol

Os estoques de *E. coli* BL21 (λ DE3) pET15b *conbr* em glicerol a 10 % foram preparados a partir de uma cultura crescida por 14-16 horas em 5 ml de caldo LB. Os estoques foram mantidos congelados a - 20 °C.