

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ESTRUTURA CRISTALINA DA LECTINA DE *Canavalia maritima* (ConM)
COMPLEXADA COM DINUCLEOTÍDEO E A POSSÍVEL INTERNALIZAÇÃO
DESSE COMPLEXO NO NÚCLEO CELULAR

Derek Barroso Holanda Asp Vieira

Plínio Delatorre

João Pessoa - 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ESTRUTURA CRISTALINA DA LECTINA DE *Canavalia maritima* (ConM)
COMPLEXADA COM DINUCLEOTÍDEO E A POSSÍVEL INTERNALIZAÇÃO
DESSE COMPLEXO NO NÚCLEO CELULAR

Derek Barroso Holanda Asp Vieira

Plínio Delatorre

Trabalho - Monografia apresentada
ao Curso de Ciências Biológicas
(Trabalho Acadêmico de conclusão
de Curso), como requisito parcial à
obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas

João Pessoa – 2012

Universidade Federal da Paraíba
Biblioteca Setorial do CCEN
Catalogação na publicação

V657e Vieira, Derek Barroso Holanda Asp.

Estrutura cristalina da lectina de *canavalia marítima* (ConM) complexada com dinucleotídeo e a possível internalização desse complexo no núcleo celular / Derek Barroso Holanda Asp Vieira. – João Pessoa, 2012.

60p. : il. -

Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) –
Universidade Federal da Paraíba.

Orientador: Plínio Delatorre.

1. Biologia celular.
2. Lectinas.
3. Lectinas vegetais.
4. *Canavalia marítima*. I. Título.

BS/CCEN

CDU: 576(043.2)

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Derek Barroso Holanda Asp Vieira

**ESTRUTURA CRISTALINA DA LECTINA DE *Canavalia maritima* (ConM)
COMPLEXADA COM DINUCLEOTÍDEO E A POSSÍVEL
INTERNALIZAÇÃO DESSE COMPLEXO NO NÚCLEO CELULAR**

Trabalho – Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas, como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas

Data: _____

Resultado: _____

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Plínio Delatorre – Orientador
UFPB/Departamento de Biologia Molecular

Prof^a. Dr^a. Tatiane Santi Gadelha
UFPB/Departamento de Biologia Molecular

Prof. Dr. Carlos Alberto de Almeida Gadelha
UFPB/Departamento de Biologia Molecular

Dedico este trabalho exclusivamente aos meus Pais, pois sem a persistência, dedicação, preocupação e acima de tudo, o Amor deles, não teria chegado nunca onde estou hoje.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente à Deus, por todos os momentos vividos até hoje e pelo sucesso em mais uma etapa cumprida na minha vida;

Agradeço à toda a minha família por estar sempre ao meu lado em cada momento vivido, mas em especial aos meus Pais. À minha Mãe, Vanda Vieira e ao meu Pai, Nils Asp Vieira, agradeço especialmente por toda atenção, dedicação, apoio e amor dado ao longo desses anos, pois sem eles e sua persistência, não seria nem metade da pessoa que sou hoje. Aos meus irmãos Camille Vieira e Edwin Vieira, pelo carinho e amor e por sempre estarem por perto para me apoiar e presentes nos momentos de necessidade, meu muito obrigado. Agradeço aos demais entes queridos, que apesar da distância, sempre torceram pelo meu sucesso;

Agradeço à Universidade Federal da Paraíba, pela oportunidade de estudar nessa Instituição, adquirir conhecimentos, e aplicá-los em pesquisas científicas ao longo do curso. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro ao longo desses anos de bolsista PIBIC;

Agradeço ao Prof. Dr. Plínio Delatorre, por ter aceitado me orientar desde o segundo período do curso, por toda a paciência, a transmissão de conhecimentos ao longo desses anos e pela enorme ajuda na realização deste trabalho;

Agradeço ao Prof. Dr. Carlos Alberto de Almeida Gadelha, por ter aceitado o convite para participar desta banca examinadora e principalmente pela transmissão de conhecimentos, pelas dicas para a realização dos experimentos de cristalização, pelas trocas de informações na construção deste trabalho e por sempre estar disposto a ajudar se fosse preciso;

Agradeço à Prof^a. Dr^a. Tatiane Santi Gadelha, por ter aceitado o convite para participar desta banca examinadora, também por toda a atenção dada, desde uma dúvida à uma conversa informal e pela ajuda na construção deste trabalho;

Agradeço aos demais professores da minha graduação, por todo o conhecimento transmitido, mas principalmente à Prof^a. Dr^a. Amélia Kanagawa e a Prof^a. Dr^a. Eliete Lima, por toda a paciência e dúvidas tiradas na construção deste trabalho de conclusão de curso;

Agradeço à minha namorada Neusa Kaline, por todo o apoio dado durante todo o desenvolvimento deste trabalho, por me acalmar nas horas de desespero e dar palavras

de confiança, carinho e incentivo e por sempre estar ao meu lado ao longo desses anos nos momentos mais importantes.

Agradeço à turma de Bacharelado em Ciências Biológicas 2008.2, por todos os momentos de tensão, correria, estudos e descontração que com certeza ficarão na memória. Mas agradeço principalmente à três mulheres que fizeram esta graduação ser especial, são elas: Cyntya Sousa, Patrícia Petraglia e Rachel Ramalho. Obrigado por todos os momentos de estudos, correrias, trabalhos, aperreios, saídas, madrugadas em claro, caronas, gritaria...enfim, cada momento da graduação valeu graças à vocês;

Agradeço ao pessoal do LaProtE, principalmente ao Paulo J., por todos os momentos de descontração, aperreio com cálculos, e pela enorme ajuda na realização dos experimentos, desde a siliconização de lamínulas e lavagem e montagem de placas;

Agradeço ao pessoal do UPE (a famosa sala 6) principalmente ao Msc. Guilherme por todas as conversas produtivas e dúvidas tiradas ao longo do tempo e ao mestrando José Caetano, pela enorme paciência comigo, por toda a ajuda computacional, pela transmissão de conhecimentos, pelas conversas produtivas, pelos plantões de dúvidas via facebook, o meu muito obrigado, pois sem ele este trabalho não teria saído do primeiro passo;

Agradeço aos meus amigos Amri Máximo, Camila Costa, Camila Lenbel, Élide Rayanne, Elói Matias, Fernanda Leite, Herberth Acioli, Isis Cirino, John Herberth, Larissa Medeiros, Luciana Maria, Maíra Leite, Maria Emília, Maria Gabriela, Mayara Costa, Max Viana, Renan Lobo, Sâmara Fontes, Thales Pereira e Vinicius de Moraes, tanto pelo apoio como a preocupação do andamento deste trabalho.

Por fim, quero agradecer à todos os demais amigos que não foram mencionados, mas que torceram pela concretização desta etapa.

*Veja!
Não diga que a canção
Está perdida
Tenha fé em Deus
Tenha fé na vida
Tente outra vez!...*

Raul Seixas

RESUMO

A molécula de DNA é capaz de interagir com várias proteínas diferentes, não especificamente ou de uma maneira sequência-específica e essa interação tem um papel fundamental em toda a regulação celular. Ela é capaz de formar complexos chamados de lectina-DNA. As lectinas vegetais pertencem a um grupo de proteínas de origem não imune, que apresentam pelo menos um sítio não-catalítico de ligação reversível a açúcares e podem ser encontradas em animais vertebrados, invertebrados, microorganismos e no reino vegetal. O objetivo deste trabalho foi cristalizar e resolver a estrutura tridimensional da lectina de *Canavalia marítima* (ConM) complexada com fragmentos de DNA de *Bauhinia variegata*. O DNA purificado foi incubado em Banho Maria a 37°C com a ConM e liofilizada. A amostra foi diluída homogeneamente em tampão Tris-HCL 1mM pH 7,0 contendo 5mM CaCl₂ e 5 mM de MnCl₂ numa concentração de 40mg/mL e utilizado no preparo de placas de cristalização. Foi obtido um cocristal em uma condição constituída por 0,2M de formato de magnésio e o cristal pertence ao grupo espacial ortorrômbico I222. Na cavidade central da ConM foi encontrada uma densidade eletrônica de um dinucleotídeo entre os resíduos de HIS 127 das cadeias do tetrâmero com os quais o dinucleotídeo interage com três, dos quatro aminoácidos dessa região, através de pontes de hidrogênio e interações de Van der Waals. Essa interação explicaria uma possível atividade antitumoral e anticarcinogênica e sugere-se que os efeitos antitumorais estejam associados com a habilidade de modular o crescimento, a diferenciação, a proliferação e a apoptose, mediadas por receptores de superfícies. A lectina seria internalizada no núcleo e então poderia atuar como fator de transcrição, mimetizando a p53, responsável pela inibição da proliferação celular, envolvidas no processo apoptótico. Uma hipótese para essa internalização seria através de um receptor relacionado à proteína LDL, chamado de LRP, que tem um domínio de ligação para heparina, semelhante a algumas lectinas.

Palavras-chave: Lectinas; DNA; *Canavalia marítima*; apoptose.

ABSTRACT

The DNA molecule is capable of interacting with several different proteins, in a not specifically way or a sequence-specific and this interaction plays a key role in all cellular regulation. It is capable of forming complexes called lectins DNA. Lectins are a group of proteins from non-immune origin, which have at least one non-catalytic site of reversibly binding to sugars and can be found in vertebrates, invertebrates organisms and the plant kingdom. The objective of this study was to crystallize and solve the three-dimensional structure of the lectin from *Canavalia maritima* (ConM) complexed with DNA fragments of *Bauhinia variegata*. The DNA was purified and incubated in a water bath at 37 ° C with ConM and lyophilized. Homogeneously was diluted in Tris-HCL pH 7.0 containing 1mM 5mM CaCl₂, and 5 mM MnCl₂ at a concentration of 40mg/ml and plate used in the preparation of crystallization. A cocrystal was obtained in a condition consisting of 0.2 M magnesium format, and the crystal belongs to the orthorhombic space group I222. In the central cavity of ConM was found an electron density of a dinucleotide between residues HIS 127 chains of the tetramer with which the dinucleotide interacts with three of the four amino acids of this region through hydrogen bonds and van der Waals interactions. Some lectins have antitumor activity and anticancer activity, and suggest that the anti-tumor effects are associated with the ability to modulate the growth, differentiation, proliferation and apoptosis mediated by receptors surfaces. The lectin would be internalized in the nucleus and then could act as a transcription factor, mimicking p53, responsible for the inhibition of cell proliferation, involved in the apoptotic process. One hypothesis for this internalization would be through an LDL receptor-related protein called LRP, which has a binding domain for heparin, similar to some lectins.

Key Words: Lectins; DNA; *Canavalia maritima*; apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 01. Interações lectina-carboidrato..... | 15 |
| Figura 02. <i>Canavalia maritima</i> | 18 |
| Figura 03. Retículo cristalino e cela unitária..... | 20 |
| Figura 04. Diagrama de fases típico de cristalização..... | 22 |
| Figura 05. Técnicas de difusão de vapor..... | 24 |
| Figura 06. Placa de cristalização..... | 25 |
| Figura 07. Geração de um padrão de difração..... | 28 |
| Figura 08. Estrutura do DNA..... | 29 |
| Figura 09. Ação da DNA polimerase..... | 30 |
| Figura 10. Cocrystal de ConM+DNA..... | 36 |
| Figura 11. Interação do dinucleotídeo com a ConM..... | 38 |
| Figura 12. Interação da base nitrogenada com a HIS 127/A..... | 39 |
| Figura 13. Interação do grupamento fosfato e a ribose com a HIS 127/D..... | 40 |
| Figura 14. Interação da base nitrogenada com a HIS 127/E..... | 40 |
| Figura 15. Cristais com cavidades abertas e fechadas..... | 42 |
| Figura 16. ConM complexada com AIA..... | 42 |
| Figura 17. Sequências de lectinas de Diocleínas..... | 44 |
| Figura 18. Internalização da Midkina..... | 46 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 01. Sistemas cristalográficos..... | 20 |
| Tabela 02. Valores referentes à coleta de dados, refinamento e qualidade da estrutura..... | 37 |

SUMÁRIO

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.Introdução | 13 |
| 2. Fundamentação Teórica | 14 |
| 2.1. Lectinas | 14 |
| 2.1.1. Lectinas de Plantas | 16 |
| 2.1.2. Lectinas de Leguminosas | 16 |
| 2.1.3. Concanavalina M (ConM) | 17 |
| 2.2. Cristalização | 19 |
| 2.2.1. Método da Difusão de Vapor | 23 |
| 2.2.2. Método da Matriz Esparsa | 25 |
| 2.2.3. Cocrystalização | 26 |
| 2.3. Difração de raios-X | 27 |
| 2.4. DNA | 28 |
| 3. Objetivos | 32 |
| 3.1. Objetivo geral | 32 |
| 3.2. Objetivos específicos | 32 |
| 4. Materiais e Métodos | 33 |
| 4.1. Purificação do DNA de <i>Bauhinia variegata</i> | 33 |
| 4.2. Experimento de interação da lectina da ConM com DNA | 33 |
| 4.3. Cristalização | 33 |
| 4.4. Coleta de dados de difração de raios-X | 34 |
| 4.5. Resolução da estrutura da <i>Canavalia marítima</i> complexada com DNA | 34 |
| 5. Resultados | 36 |
| 5.1. Cristalização, coleta de dados e difração de raios-X | 36 |
| 6. Discussão | 41 |
| 7. Conclusões | 48 |
| 8. Bibliografia | 49 |
| APÊNDICE 1 | 56 |

1. INTRODUÇÃO

A pesquisa em estruturas tridimensionais de moléculas biológicas tem sido muito importante nos últimos anos, não somente na parte de descobertas de novos fármacos na indústria farmacêutica, mas também em vários programas de genômica estruturais que se estabeleceu no mundo (DALE, 2003). A principal técnica que tem sido utilizada nos últimos anos para descobrir e compreender a estrutura tridimensional de macromoléculas é chamada de cristalografia de raios X, tendo como um pré-requisito, a produção de cristais da molécula, de boa qualidade, sendo então um fator limitante neste processo (ALBERTS et al, 2007; DALE, 2003). A cristalização vem sendo aplicada em pequenas moléculas por mais de 80 anos com grande sucesso. Um grande marco foi realizado por James Batcheller Sumner, que em 1926 cristalizou a enzima urease da *Canavalia ensiformis* que resultou na primeira vez que esta macromolécula foi cristalizada (SUMNER 1926), seguido por Northrop que cristalizou a pepsina e uma série de outras enzimas proteolíticas (DUCRUIX & GIEGÉ, 1999).

A cocristalização de proteínas com a molécula de DNA tem ocorrido desde o início dos anos 80 e vem apresentando uma grande significância biológica (DUCRUIX & GIEGÉ, 1999). Essa molécula é capaz de interagir com várias proteínas diferentes, podendo ser não específica ou sequência específica (BREITWIESER, 2003) e essa interação é importante em muitas reações biológicas que podem estar envolvidas na expressão gênica (DUCRUIX & GIEGÉ, 1999). Além disso, essa área de pesquisa tem recebido muita atenção nas últimas décadas, pois a interação dessa molécula com proteínas pode trazer novas respostas e novos mecanismos que ainda são desconhecidos.

O grupo das lectinas tem sido um grande alvo de muitos pesquisadores, graças à intensificação dos estudos, houve aumento no número de estruturas e sequências determinadas com o passar dos anos (LIS & SHARON, 2004). As mesmas são encontradas em todos os tipos de organismos e apresentam alta afinidade e especificidade à carboidratos, atuando em uma ampla variedade de processos intercelulares, tais como de reconhecimento, adesão e sinalização (LEHNINGER, 2006). As lectinas de plantas estão presentes em diversas famílias. Na família das leguminosas as lectinas têm sido escolhidas como alvo de estudos, por apresentarem grande facilidade de serem purificadas e por sua sequência ser conservada no processo evolutivo (LORIS et al, 1998).

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Lectinas

As lectinas pertencem a um grupo de proteínas de origem não imune, que apresentam pelo menos um sítio não-catalítico de ligação reversível a açúcares (LIS & SHARON, 1998). Desde a descoberta de uma hemaglutinina em extratos de sementes de mamona, feito por Stilmark em 1888, muitas dessas proteínas já foram isoladas, caracterizadas e até a sua definição aprimorada, em relação a sua ligação específica à carboidratos, estrutura molecular e propriedades químicas (PEUMANS & VAN DAMME, 1995), sendo essas características muito importantes, já que estão presentes na maioria dos processos biológicos tais como, infecções virais, bacterianas, parasitárias, entre outros (LORIS et al, 1998). As lectinas são encontradas em animais vertebrados, invertebrados, microrganismos e vírus, frequentemente na superfície celular ou em partículas intracelulares (SHARON E LIS, 1989) e no reino vegetal, estão largamente distribuídas em várias espécies de plantas (CALVETE et al., 1999).

As lectinas por possuírem sítio de ligação à carboidratos, são capazes de interagir com várias moléculas nos fluidos biológicos, inclusive com receptores presentes na superfície celular (Figura 1), sendo de extrema importância, já que moléculas, células e organismos apresentam as suas informações na forma de glicoconjugados, sendo os mesmos decodificados pelas lectinas (MISQUITH et al, 1994). Na intensificação dos estudos moleculares dessas proteínas, o entendimento de suas atividades molecular foi necessário, assim, os primeiros estudos variavam da determinação das sequências primárias, as quais inicialmente foram feitas aos poucos, à determinação da estrutura em 3D, sendo grande parte desses estudos com lectinas de plantas (LIS & SHARON, 2004).

Atualmente o número de sequências e estruturas determinadas aumentou drasticamente, permitindo a identificação de homologias de sequências primárias entre essas proteínas (LIS & SHARON, 2004). Assim, esse grupo tem sido alvo de grandes estudos científicos, servindo para avaliação e entendimento de diversas funções nos sistemas biológicos.

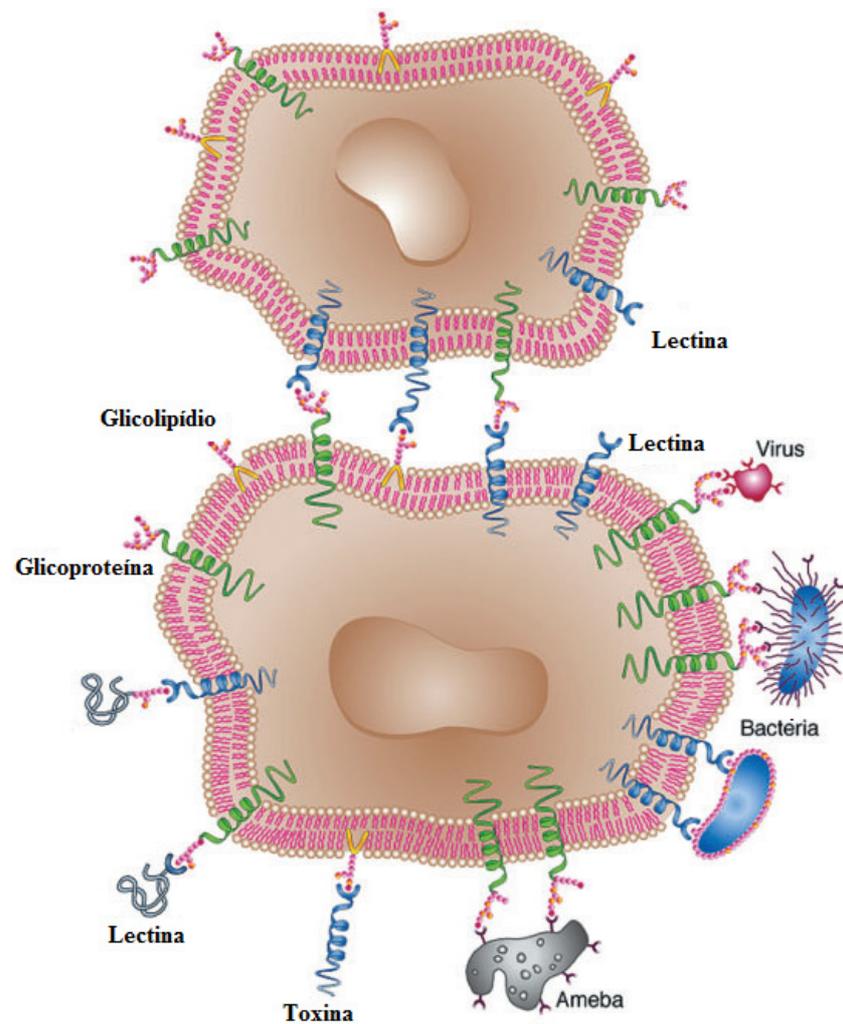


Figura 1. Interações lectina-carboidrato: Representação das interações lectina-carboidrato na superfície celular, nos diversos tipos de células. Adaptado de SHARON & LIS, 2004.

2.1.1 Lectinas de plantas

Desde que as lectinas se distinguiram de outras proteínas de plantas devido a sua característica de se ligarem a carboidratos, o seu papel fisiológico tem sido relacionado a essa propriedade. Nesse caso as interações ocorrem com receptores chamados de glicoconjugados, que apresentam uma porção de carboidrato complementar ao sítio de ligação da lectina. Sendo assim, as lectinas de vegetais são definidas como toda proteína de planta que possui pelo menos um domínio não-catalítico, que se ligue reversivelmente a mono e oligossacarídeos específicos (PEUMANS & VAN DAMME,1995).

Com algumas exceções, as lectinas são as únicas proteínas de plantas que são capazes de reconhecer e se ligar à gliconjugados presentes na superfície de microrganismos. Índícios moleculares, bioquímicos, celulares, fisiológicos e evolucionários indicam que as mesmas apresentam papel importante na defesa da planta (PEUMANS & VAN DAMME,1995). De acordo com Mitra et al, 2002, lectinas de plantas compreendem pelo menos sete famílias distintas nas suas relações estruturais e evolucionárias, sendo quatro dessas famílias consideradas maiores. Dentro deste grupo, encontra-se a família das leguminosas que tem sido amplamente estudada.

2.1.2 Lectinas de leguminosas

As lectinas da família das leguminosas (*Fabaceae*) são escolhidas para estudos moleculares devido a grande facilidade de serem purificadas em grandes quantidades, a sua especificidade à carboidratos e a conservação da sua sequência. A sua especificidade tem permitido a caracterização de complexos de carboidratos e glicoconjugados, que tem sido estudada através da cristalografia de raios X (LORIS et al, 1998). Essa família têm mostrado níveis altos de similaridade e diferenças significantes nas suas atividades biológicas (VAN DAMME et al, 1998), como por exemplo o estímulo de secreção de histamina e a produção de óxido nítrico (CAVADA et al, 2001). De acordo com Cavada et al, 2001, as interações no sítio de ligação ao

carboidrato podem ser a resposta para elucidar a correlação entre as suas estruturas e as suas funções fisiológicas.

Essas lectinas são de interesse de estudo não apenas por suas propriedades de se ligar à carboidratos, mas também pelo fato de que juntamente com esse potencial, são capazes de aglutinar células e precipitar carboidratos multivalente. Por isso, são proteínas oligoméricas, podendo formar dímeros ou tetrâmeros e apresentam múltiplos sítios de ligação (LORYS et al, 1998); e são quase sempre compostas de uma cadeia polipeptídica estabilizada por ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e eletrostáticas (ROUGÉ et al, 1987).

Várias lectinas da família *Fabaceae* tem sido isoladas e caracterizadas (SHARON & LIS, 1990), inclusive as que estão presentes nas sementes da subtribo Diocleinae. Dentre as lectinas dessa subtribo, a mais conhecida das suas aplicações biológicas, é a ConA (Concanavalina A) (BITTIGER & SCHNEBLI, 1976) e foi a primeira a ter sua estrutura tridimensional resolvida (EDELMAN et al, 1972). Outra lectina que vem sendo bastante estudada e caracterizada nos últimos anos é a *Canavalia maritima*.

2.1.3. Concanavalina M (ConM)

A lectina de *Canavalia maritima* (ConM) é obtida da semente da planta *Canavalia maritima* que é conhecida popularmente como feijão de praia (em inglês “bay bean”) (Figura 2A). Ela é uma leguminosa que ocorre em todo o mundo, principalmente em locais tropicais e subtropicais costeiros, consegue sobreviver em períodos de secas, sendo facilmente encontrada na areia da praia, dunas e arbustos costeiros (Figura 2B). Estabiliza suas raízes e as dispõe em formas de redes que a ajuda na estabilização na areia.



(A)

(B)

Figura 2. *Canavalia maritima*: (A) Visão aproximada da *Canavalia maritima*, mostrando a sua flor e o seu fruto conhecido como vagem, onde encontram-se as sementes de onde a lectina é extraída. (B) Mostra o local onde essa planta é encontrada e como ela se comporta no local. Fontes: <http://botany.szu.edu.cn/pic/fenlei/qiniangshan%20jpg/%20canavalia%20maritima%.jpg> e http://www.serc.si.edu/labs/animal_plant_interaction/Trail/English/FullScreen/Stop23/Canavalia-maritimaFS.jpg

A lectina foi purificada por Perez et al, 1991, e tem uma massa de 25.5 kDa, sendo composta por 237 resíduos de aminoácidos por monômeros; após a sua cristalização e resolução, realizada por GADELHA et al, 2005 foi visto que a mesma apresenta uma similaridade de 98% na sua sequência de aminoácidos com a ConA, sendo as pequenas mudanças nas sequências dos aminoácidos responsáveis pelas mudanças de atividades, como no caso da propriedade de liberação de óxido nítrico no músculo liso, principalmente mudanças relacionadas ao sítio de ligação ao carboidrato. Além disso, a ConM apresenta similaridade nas interações com outros mono, oligossacarídeos e glicanos como relatado por Ramos et al, 1996, a mesma foi cocristalizada e resolvida por Delatorre et al, 2006 complexada com maltose e trealose, corroborando com o que foi proposto por RAMOS et al, 1996. Assim, o aprimoramento dos estudos dessa lectina tem como objetivo entender as suas afinidades e mostrar o quanto essas pequenas diferenças entre as lectinas ConA-like podem alterar a atividade biológica e melhorar a especificidade de ligação por glicanos na superfície celular, além

de correlacionar essas ligações às atividades biológicas em sistemas fisiológicos diferentes (DELATORRE et al, 2006).

2.2. Cristalização

O estudo estrutural de proteínas fornece a base para entender mais sobre a vida em aspectos moleculares. Desde a primeira resolução estrutural de uma proteína até os dias de hoje, milhares de macromoléculas biológicas tiveram suas estruturas tridimensionais determinadas (AZEVEDO JR, 2004). A principal técnica para a resolução da estrutura tridimensional de macromoléculas biológicas é chamada de cristalografia por difração de raios X (BLUNDELL E JOHNSON, 1976; DRENTH, 2007; MCPHERSON, 2003).

O objetivo de se obter um cristal de uma macromolécula é o estudo estrutural da mesma, pelos métodos de difração de raios X, sendo esse estudo fundamental para o entender os mecanismos biológicos (AZEVEDO JR, 2004). Os cristais de macromoléculas são característicos pelo seu tamanho, não excedendo 1mm^3 em volume, e também por serem muito frágeis. Essa fragilidade se deve às fracas interações que existem nas macromoléculas em uma rede cristalina de alto conteúdo de solvente. As ligações fracas que mantêm essa estrutura cristalina são principalmente pontes de hidrogênio intervindo com moléculas de água (RHODES, 1993), por isso o ambiente que os cristais devem permanecer deve ser saturado de solvente, pois caso contrário a desidratação levará à quebra dessas ligações e a destruição do cristal (AZEVEDO JR, 2004).

Cristais apresentam um alto grau de ordenação interna, sendo formados por repetições translacionais de átomos ou moléculas em todas as direções (Figura 03A). A sua regularidade interna é descrita por uma pequena unidade de volume uniforme, chamada de cela unitária, a qual é caracterizada por três vetores a , b e c que definem suas arestas e pelos ângulos α , β e γ existentes entre elas (Figura 3B) (DELATORRE, 2001). O empacotamento dos átomos em busca de um mínimo de energia para proporcionar um posicionamento simétrico entre as moléculas forma uma rede cristalina ordenada, sendo a menor unidade dessa rede a cela unitária. A simetria de uma célula unitária é descrita pelo seu grupo espacial, representado por um símbolo críptico que

indica o tipo de rede cristalina e as operações simétricas (RHODES, 1993). A mesma pode assumir até sete sistemas cristalográficos, sendo essa limitação dada por elementos simétricos (Tabela 01) (DRENTH, 2007).

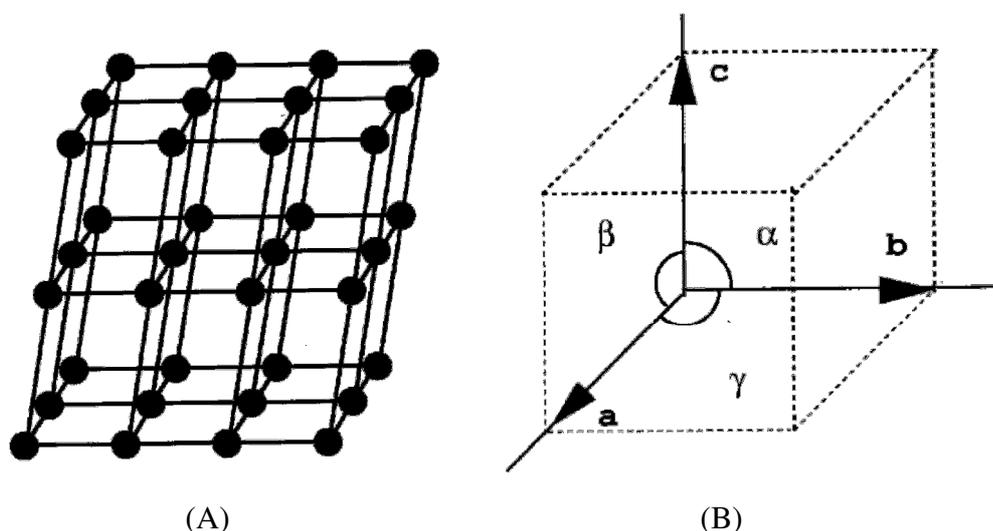


Figura 3. Retículo cristalino e cela unitária: (A) Referente à um retículo cristalino tridimensional (B) Referente à uma cela unitária. Adaptado de DELATORRE et al, 2001.

Tabela 1. Sistemas cristalográficos. Adaptado de DRENTH, 2007

| Sistema cristalográfico | Condições impostas na geometria da cela | Ponto mínimo de simetria de grupo |
|-------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| Triclínico | Nenhum | 1 |
| Monoclínico | $\alpha = \gamma = 90^\circ$ (b é o único eixo) ou $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ (c é o único eixo) | 2 |
| Orthorhombico | $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ | 222 |
| Tetragonal | $a = b$; $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ | 4 |
| Trigonal | $a = b$; $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$; $\gamma = 120^\circ$ (eixo hexagonal) ou $a = b = c$; $\alpha = \beta = \gamma$ (eixo rhombohedral) | 3 |
| Hexagonal | $a = b$; $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$; $\gamma = 120^\circ$ | 6 |
| Cubico | $a = b = c$; $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ | 23 |

Em alguns casos obter um cristal adequado é particularmente difícil. Algumas formas podem ser difíceis de cristalizar, enquanto que a cristalização de complexos de proteínas com alguns ligantes é menos difícil de ser alcançado (OCHI et al, 2009). O que faz com que este processo de cristalização de macromoléculas seja tão diferente do crescimento dos cristais de pequenas moléculas é a quantidade de parâmetros envolvidos (AZEVEDO JR, 2004).

Em certas circunstâncias, várias substâncias moleculares, incluindo as proteínas, se solidificam para formar cristais. Entrando no estado cristalino, através da solução, moléculas individuais da substância adotam algumas orientações, resultando em um cristal com as moléculas ordenadas tridimensionalmente, sendo mantidas juntas por interações não-covalentes. São formados por várias células unitárias, cada uma destas, é o menor e o mais simples elemento que é completamente representativo para todo o cristal, ou seja, sabendo o conteúdo de uma célula unitária é possível imaginar o cristal por inteiro (RHODES, 1993).

Para surgir cristais, as moléculas devem ser trazidas a um estado de supersaturação. A mesma pode ser alcançada por evaporação lenta do solvente ou por variações em diversos parâmetros, tais como pH, temperatura e força iônica (AZEVEDO JR, 2004) sob condições que não desnaturam a proteína. Compostos iônicos (sais) ajudam na precipitação, através de um processo chamado de “salting out”, assim como solventes orgânicos, porém, os últimos podem frequentemente interagir com porções hidrofóbicas das proteínas e causar a sua desnaturação. (RHODES, 1993).

A cristalização ocorre em três passos básicos: nucleação, crescimento e o término do crescimento do cristal (AZEVEDO JR, 2004). A nucleação é um pré-requisito para ocorrer a cristalização e requer condições diferentes das necessárias para o crescimento. Uma vez que a nucleação é formada, o crescimento ocorre espontaneamente (CHAYEN, 2005; DUCRUIX & GIEGÉ, 1999). O processo de cristalização pode ser ilustrado através de um diagrama de fases (Figura 04), que mostra em qual estado é estável em uma variedade de parâmetros de cristalização. Ele permite uma maneira de quantificar a influência de parâmetros como a concentração da proteína, precipitantes, aditivos, pH e temperatura na produção de cristais (CHAYEN, 2005).

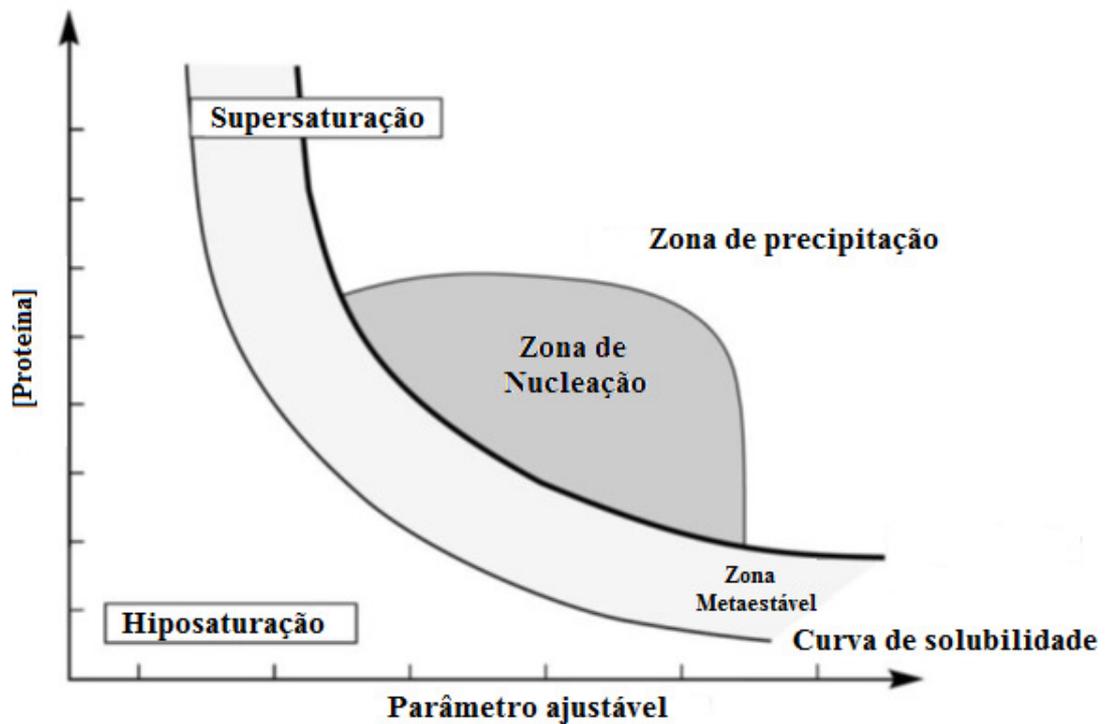


Figura 4. Diagrama de fases típico de cristalização: São mostradas quatro áreas: Zona de precipitação, uma área de alta supersaturação, onde a proteína irá precipitar; Zona de nucleação, área de supersaturação moderada, onde nucleação espontânea ocorre; área de baixa supersaturação, abaixo da zona de nucleação, onde cristais são estáveis e podem crescer, mas a nucleação não ocorrerá; e a área de hiposaturação onde as proteínas estão dissolvidas e não irão cristalizar. Adaptado de CHAYEN, 2005.

2.2.1. Método da Difusão de Vapor

Existem diversas técnicas para a cristalização de macromoléculas biológicas, todas com um mesmo objetivo. A mais utilizada é chamada de difusão de vapor, que consiste em uma gota com a macromolécula que se deseja obter o cristal, com o agente de cristalização e aditivos, equilibrada contra um reservatório contendo a solução do agente de cristalização a uma concentração mais alta do que na gota (AZEVEDO JR, 2004). O equilíbrio vai ocorrer através da difusão das espécies voláteis, que consistem na água e nos solventes orgânicos. Como o precipitante é o soluto principal, a difusão de vapor no sistema fechado resulta na transferência da água da solução da proteína para a solução no reservatório, até que a concentração seja a mesma nas duas soluções (AZEVEDO JR, 2004; RHODES, 1993). Uma vez que o equilíbrio da gota ocorre através da troca de vapor de água, o volume da gota diminui e há um aumento nas concentrações de todos os constituintes da gota de cristalização, provocando uma mudança lenta em parâmetros cinéticos da gota. A supersaturação da gota leva a mesma ao estado sólido ou na forma de precipitado ou cristal (DUCRUIX & GIEGÉ, 1999). Quando o sistema chega ao equilíbrio, a transferência da água para e a solução da proteína é mantida na concentração do precipitante (RHODES, 1993). Esse princípio se aplica para as gotas suspensas (hanging drops), gotas sentadas (sitting drops) e gotas sanduíches (sandwich drops) (Figura 5), sendo a mais utilizada a difusão de vapor em gota suspensa.

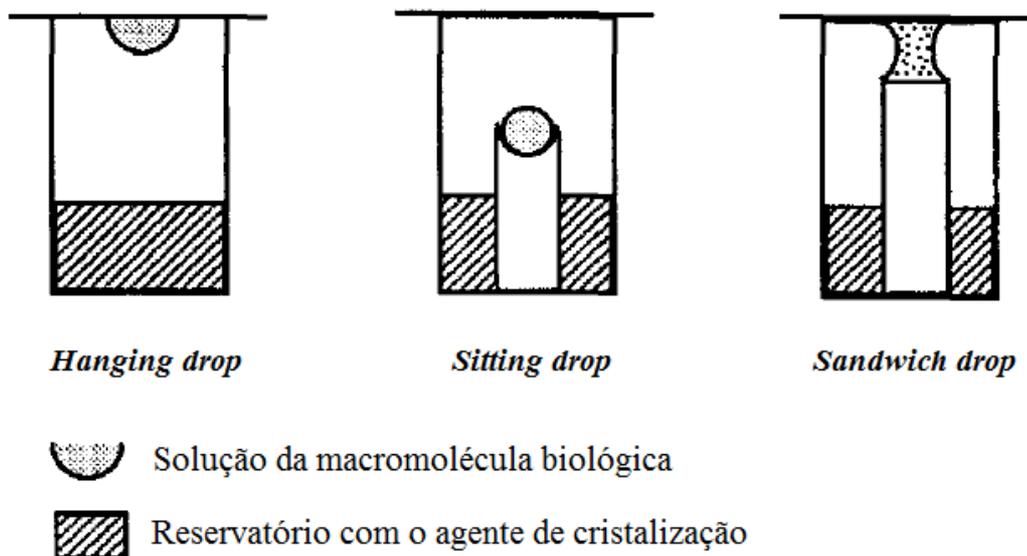


Figura 5. Técnicas de difusão de vapor: Representação esquemática do Hanging drop, sitting drop e sandwich drop. Adaptado de DUCRUIX & GIEGÉ, 1999.

Uma quantia da solução da proteína, formando uma pequena gota, é colocada em uma lamínula siliconizada de 22mm de diâmetro, já que essas lamínulas em contato com soluções macromoleculares devem ser colocadas de uma maneira a obter uma superfície hidrofóbica (DUCRUIX & GIEGÉ, 1999). Juntamente à essa gota é misturada, em mesma quantia, a solução do reservatório, dando uma concentração de 50% do que é preciso para a cristalização da proteína. Essa solução (gota) é suspensa sob a lamínula siliconizada, colocada sobre um reservatório e é selado por uma graxa de vácuo (RHODES, 1993). Os experimentos são feitos em placas de acrílico, vendidas comercialmente como Placas Linbro® (Figura 6). As placas apresentam 24 poços rotulados A, B, C e D verticalmente e 1-6 horizontalmente. Cada poço tem aproximadamente 2 mL e um diâmetro interno de 16mm (DUCRUIX & GIEGÉ, 1999).



Figura 6. Placa de cristalização: Referente a uma placa Linbro. Fonte: <http://hamptonresearch.com/img/product/250/0000000114-250.jpg>

2.2.2. Método da Matriz Esparsa

O aumento do número de macromoléculas sendo cristalizadas e os resultados positivos com diversas soluções que de alguma forma se assemelham, levou a propostas de diversos métodos de cristalização (CARTER & CARTER, 1979). O melhoramento das condições para se conseguir cristais de boa qualidade logo na primeira tentativa, para se tornarem padrões, levou ao surgimento do método da matriz esparsa (JANCARIK & KIM, 1991), onde diversas condições diferentes são utilizadas na tentativa de encontrar a condição inicial para se cristalizar uma macromolécula biológica, variando diversos parâmetros. Neste método foram escolhidas três categorias de parâmetros que afetam a cristalização, sendo então as variáveis principais, já que considerar todas as possibilidades seria inviável o número elevado de variáveis e de combinações. As três categorias são: pH, materiais tampões e agentes precipitantes (AZEVEDO JR, 2004).

2.2.3. Cocrystalização

Além da busca pela a estrutura nativa de uma proteína é de interesse obter cristais de proteínas em complexo com alguns ligantes, como co-fatores, substratos análogos, inibidores e efetores alostéricos já que muitos mecanismos biológicos envolvem interações entre as proteínas, sendo necessário um conhecimento estrutural. A determinação da estrutura desse complexo revela detalhes que podem ajudar no entendimento da interação e da função da proteína (RHODES, 1993; DUCRUIX & GIEGÉ, 1999).

É possível obter cristais de proteína com um ligante, através de um processo chamado de cocrystalização, que consiste na cristalização da proteína com o seu ligante. Este é o único método que permite obter cristais de complexos de proteínas com grandes ligantes como ácidos nucleicos e outras proteínas (RHODES, 1993). A cocrystalização não é muito usada, por causa do risco que os cristais tem de não crescer, ou crescer de forma errada, no entanto, às vezes a cocrystalização é uma vantagem por se ter um controle melhor sobre a estequiometria e a habilidade de evitar o excesso de ligação (DRENTH, 2007).

Existem ainda outras maneiras de se conseguir cristais com seus ligantes. As proteínas apresentam os seus sítios funcionais na forma de cristal e assim o ligante pode difundir e se ligar nesses sítios através de canais de água no cristal. Esse processo é chamado de “soaking”, sendo o mesmo mais utilizado quando se deseja comparar a estrutura da forma nativa da proteína com a do complexo proteína-ligante (RHODES, 1993). Quando a porção de interesse é um ligante pequeno como nucleotídeos ou pequenos oligonucleotídeos, às vezes é possível difundi-los em um cristal receptor (Soaking), mas com substâncias maiores que não podem penetrar ou quando muitas mudanças conformacionais ocorrem é necessário utilizar a cocrystalização (DUCRUIX & GIEGÉ, 1999).

2.3. Difração de raios X

Raios X são radiações eletromagnéticas de comprimento de onda de 0,1-100 Å. Estes são produzidos quando uma partícula de alta energia cinética é rapidamente desacelerada, bombardeando um alvo metálico (geralmente cobre ou molibdênio) com elétrons produzidos por um filamento aquecido e acelerado por um campo elétrico. Quando esse elétron de alta energia colide com um elétron do átomo do material, é liberado na forma de fotoelétron. Em seguida, um elétron de um orbital mais alto cai em uma vacância, emitindo seu excesso de energia como um fóton de raios-X (BLEICHER & SASAKI, 2000; RHODES, 1993). Existe ainda outra fonte de produção de raios-X não convencional que é a fonte de radiação síncrotron. Nesta fonte há uma intensa radiação eletromagnética que é produzida por elétrons de alta energia em um acelerador de partículas, apresentando todos os comprimentos de onda. As partículas são injetadas em um anel de armazenamento com uma estrutura circular, diretamente de um acelerador linear ou de um “booster” onde os elétrons ganham energia e atingem velocidades próximas à da luz (RHODES, 1993; DRENTH, 2007).

Quando incidido sobre um cristal, ocorre a interação dos raios-X com a distribuição eletrônica da carga do retículo cristalino. A distribuição das cargas eletrônicas faz com que a superposição de espalhamentos de raios-X forme regiões de interferência, produzindo um padrão de difração (Figura 7). Os espalhamentos das ondas provenientes de diversos planos atômicos faz com que seja gravada uma imagem em uma placa fotográfica, graças à natureza eletromagnética dos raios-X, que se é permitido a formação da imagem do padrão de difração. A análise do padrão de difração obtido é fundamental para a resolução de sua estrutura tridimensional (BLUNDELL & JOHNSON, 1976; MCPHERSON, 2003; RHODES, 1993).

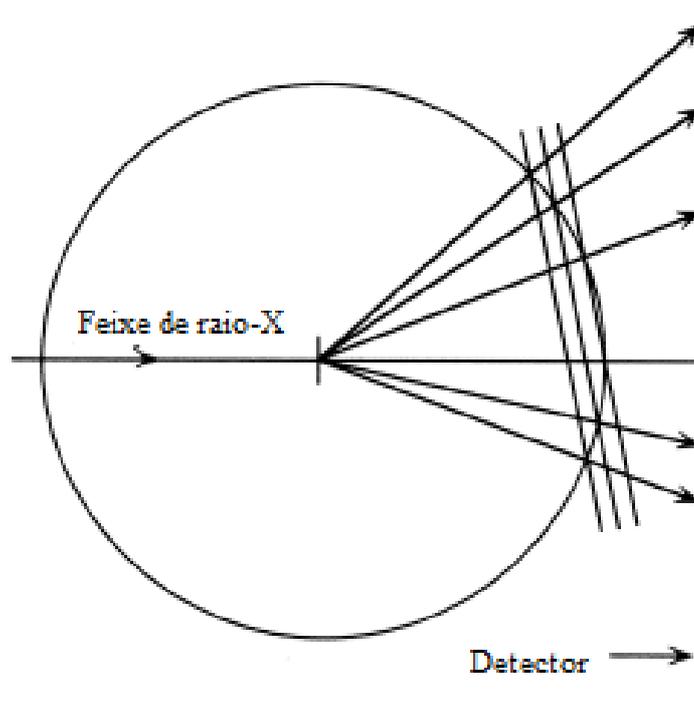


Figura 7. Geração de um padrão de difração: Representação da geração de um padrão de difração a partir de uma difração de raios X. Adaptado de DRENTH, 2007

2.4. DNA

A molécula de DNA é um polímero linear que consiste de repetições de unidades nucleotídicas, que assume uma forma de dupla hélice, devido ao arranjo feito pelos seus componentes. São formados por uma base heterocíclica (Adenina, Citosina, Guanina ou Timina), por um açúcar desoxirribose e por um grupamento fosfato, estando os dois últimos voltados para o exterior da dupla hélice do DNA (WATSON & CRICK, 1953) (Figura 8). A sua estrutura tridimensional é decorrente das características químicas e estruturais de suas cadeias polipeptídicas, as quais são mantidas juntas por pontes de hidrogênio. Além disso, a chamada complementaridade de bases permite que os pares de bases estejam dispostos em um arranjo que é energeticamente favorável no interior da hélice (ALBERTS et al, 2007).

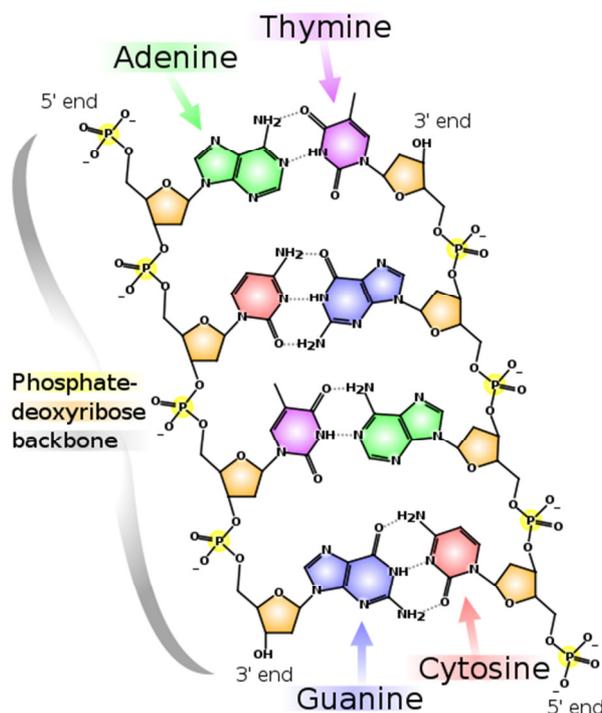


Figura 8. Estrutura do DNA: Estrutura básica de uma molécula de DNA com quatro possíveis nucleotídeos compostos por uma base nitrogenada, um açúcar desoxirribose e um grupo fosfato. Fonte: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/e4/DNA_chemical_structure.svg

Quase todo DNA de uma célula eucariótica está contida em um núcleo. No processo de alongamento de uma cadeia de DNA, a atividade é realizada por uma enzima chamada DNA polimerase que requer uma fita não pareada para atuar como molde. Essa enzima catalisa a adição sequencial de um desoxirribonucleotídeo à extremidade 3'-OH da cadeia polinucleotídica que está sendo sintetizada. Cada desoxirribonucleosídeo trifosfato deve formar o par com a fita molde para ser reconhecido pela DNA polimerase. A reação da adição de um dos quatro nucleotídeos possíveis é dirigida pela perda de dois grupos fosfato terminais. Esse mecanismo catalítico envolve íons que facilitam na remoção do pirofosfato (Figura 9) (ALBERTS et al, 2007; LEHNINGER et al; LEWIN, 2009).

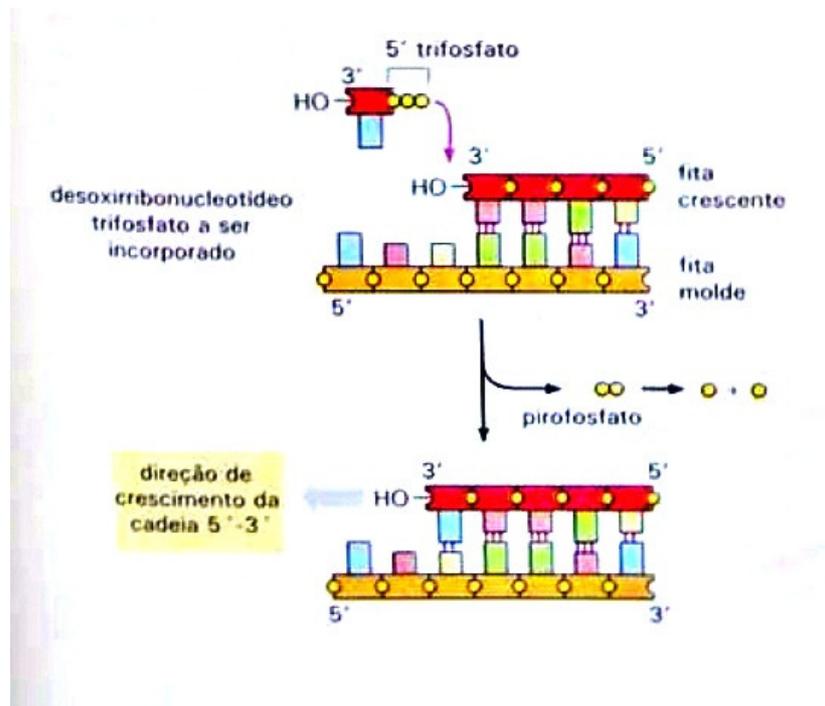


Figura 9. Ação da DNA polimerase: Mecanismo catalítico da adição de um nucleotídeo na cadeia crescente do DNA realizado pela DNA polimerase. Fonte: ALBERTS et al, 2007.

Muitas reações biológicas envolvem interações de proteínas com ácidos nucléicos, como por exemplo, aquelas relacionadas com a expressão da mensagem genética (DUCRUIX & GIEGÉ, 1999). A molécula de DNA é capaz de interagir com várias proteínas diferentes, não especificamente ou de uma maneira sequência-específica (BREITWIESER, 2003) e a interação das proteínas com essa macromolécula tem um papel fundamental em toda a regulação celular e nas funções vitais. Quase todas as funções da macromolécula, são mediadas pela participação de proteínas, e a interação das mesmas com o DNA é uma das mais fundamentais entre as macromoléculas nos organismos vivos (BLOOMFIELD et al, 2000).

Desde o início dos anos 80, mais de 60 diferentes interações entre DNA e proteínas foram cocristalizadas com oligonucleotídeos de DNA de significância biológica. Com bons resultados, o aumento no número de cristais de alta qualidade de complexos com deoxioligonucleotídeos mostrou que em alguns casos a cristalização de complexos são melhores nos cristais da proteína pura (DUCRUIX & GIEGÉ, 1999). A escolha precisa dos fragmentos de DNA podem ser críticas para a formação de cocristais de proteína com DNA, porque a interação entre as moléculas de DNA

frequentemente geram contatos no empacotamento do cristal (TAN et al, 2000) . Após o primeiro sucesso da cristalização de complexos de DNA com proteína de procariotos, permitiu que os estudos aumentassem em relação aos desafios do mundo dos eucarióticos (DUCRUIX & GIEGÉ, 1999).

Sendo assim, durante as últimas décadas o estudo com DNA, principalmente em relação à interação dessa molécula e proteínas, em organismos e células de mamíferos (BREITWIESER, 2003), tem recebido uma atenção especial, pois uma vez ocorrida esta interação, a transferência da molécula para dentro das células seria facilitada (WIENHUES et al.,1987). Mas ainda há pontos a serem estudados e discutidos, como as dificuldades para o DNA ser transferido para dentro das células, já que o mesmo não se liga e nem se transporta através das membranas celulares (MAHATO et al.,1997).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

- Cristalizar e resolver a estrutura tridimensional da lectina de *Canavalia marítima* complexada com fragmentos de DNA de *Bauhinia variegata*.

3.2. Objetivos Específicos

- Determinar a condição inicial de cristais de *Canavalia marítima* complexada com fragmentos de DNA de *Bauhinia variegata*;
- Resolver tridimensionalmente a estrutura da *Canavalia marítima* complexada com fragmentos de DNA de *Bauhinia variegata*;
- Determinar o local da interação da molécula com a proteína;
- Analisar a possível atividade fisiológica da interação da ConM com o fragmento de DNA.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Purificação do DNA de *Bauhinia variegata*

Em parceria com o Prof^o. Dr. Luciano da Silva Pinto (Universidade Federal de Pelotas) o DNA genômico foi purificado de folhas frescas de *Bauhinia variegata* de mudas com apenas uma semana de idade crescidas de sementes maduras. O protocolo para a purificação do DNA usou CTAB (Cetyl Triethylammonium Bromide) como descrito por Foster e Twell (1996). A qualidade de todas as preparações de DNA foi checada por eletroforese em gel de agarose 0,8% de acordo com Sambrook & Russel (2001).

4.2. Experimento de interação da lectina da ConM com DNA

Em parceria com a Prof^a. Dr^a. Tatiane Santi Gadelha e o Prof^o. Dr. Carlos Alberto de Almeida Gadelha, a lectina da ConM foi obtida a partir de uma única cromatografia de afinidade, foi incubada por 30 minutos em banho maria a 37°C previamente com o DNA de *Bauhinia variegata*, dializada e liofilizada. Após esta etapa, foi diluída homoganeamente em tampão Tris-Hcl 1mM pH 7,0 contendo 5mM CaCl₂ e 5 mM de MnCl₂ numa concentração de 40mg/mL e utilizado no preparo de placas de cristalização.

4.3. Cristalização

A ConM complexada com fragmentos de DNA foi submetida ao método da matriz esparsa e da difusão de vapor em gota suspensa, com o objetivo de encontrar a condição inicial de cristalização. Para reproduzir esse método da matriz esparsa foram utilizadas placas de Linbro® e as noventa e oito condições provenientes dos kits de

cristalização “Crystal Screen N°1” e “Crystal Screen N°2” da Hampton Research (Riverside, CA, USA).

As gotas de cristalização foram montadas com 2 μL de solução de proteína e 2 μL da solução de cristalização, totalizando um volume de 4 μL ; cada gota foi posicionada no centro de uma lamínula de vidro siliconizada de 22x22 mm. Essas lamínulas cobriram cada um dos reservatórios correspondentes e foram devidamente vedadas com graxa de silicone. Em cada reservatório foi adicionado um volume de 200 μL da solução de cristalização. Os experimentos de cristalização foram realizados no LaProtE (Laboratório de Proteômica Estrutural) na UFPB (Universidade Federal da Paraíba) a uma temperatura constante de 293 K.

4.4. Coleta de dados de difração de raios X

Os dados de difração de raios X foram coletados a partir de um único cristal, mantido a uma temperatura de 100 K com nitrogênio. Para prevenir a formação de gelo, o cristal, previamente laçado no “loop”, foi banhado numa solução de crioproteção contendo 75 % da solução de cristalização e 25 % de glicerol e só então, instalados na cabeça do goniômetro para serem submetidos à coleta de dados na linha de raios X. A coleta de dados foi feita num comprimento de onda de 1,4727 Å usando-se fonte de radiação Síncrotron proveniente da estação CPr do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) situado no município de Campinas-SP. A coleta de dados de difração de raios-X foi feita numa placa detectora de imagem MAR de 34,5cm (MAR research), com tempo de exposição de 42,5 segundos por imagem, com os cristais variando numa distância de 110 mm do detector (CCD). Foram coletadas 120 imagens do cristal contendo a lectina previamente incubada com DNA de *Bauhinea variegata* a uma resolução de 3,25 Å e amplitude de oscilação de 1,0°.

4.5. Resolução da estrutura da *Canavalia maritima* complexada com DNA

Os dados foram obtidos indexados, integrados usando o programa Mosfilm (LESLIE, 1997) e scalonados usando o programa Scala (COLLABORATIVE COMPUTACIONAL PROJECT, NUMBER 4, 1994). A estrutura preliminar foi resolvida por substituição molecular através do programa MolRep (VARGIN & TEPLYKOV, 1997) usando como modelo de procura a lectina de *Canavalia maritima* (PDB code: 2CWM) (GADELHA et al, 2005). O modelo molecular foi submetido a alguns ciclos de refinamento de corpo rígido e em seguida, a um refinamento por restrições usando o programa Refmac (MURSHDOV et al, 2011).

O mapa de densidade eletrônica foi gerado e visualizado usando programa Coot (EMSLEY & COWTAN, 2004), observando se havia ou não a presença da densidade de algum fragmento de DNA; as moléculas de água foram adicionadas à estrutura complexada ConM-DNA usando o mesmo programa. A estrutura foi submetida a um refinamento twin e anisotrópico e o modelo final do complexo foi visualizado com o PyMol (DELANO, 2002). O modelo foi validado no PDB Validation Report (www.rcsb.org) e pode ser visto no APÊNDICE 1.

5. RESULTADOS

5.1. Cristalização, coleta de dados e difração de raios-X

Foi obtido um cocrystal de ConM complexada com fragmentos de DNA de *Bauhinia variegata* (Figura 10). O cristal formou-se na condição 44 do kit de cristalização Crystal Screen N°1 da Hampton Research, em aproximadamente 30 dias. Essa condição é constituída por 0,2M de formato de magnésio. Este foi difratado e os dados podem ser vistos na Tabela 2. O cristal pertence ao grupo espacial ortorrômbico I222, e a sua célula unitária apresenta os seguintes parâmetros (Å) $a = 140,6$; $b = 140,5$; $c = 199,0$ e o coeficiente de Mathews $3,22 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$ com conteúdo de solvente de aproximadamente 61,77%.

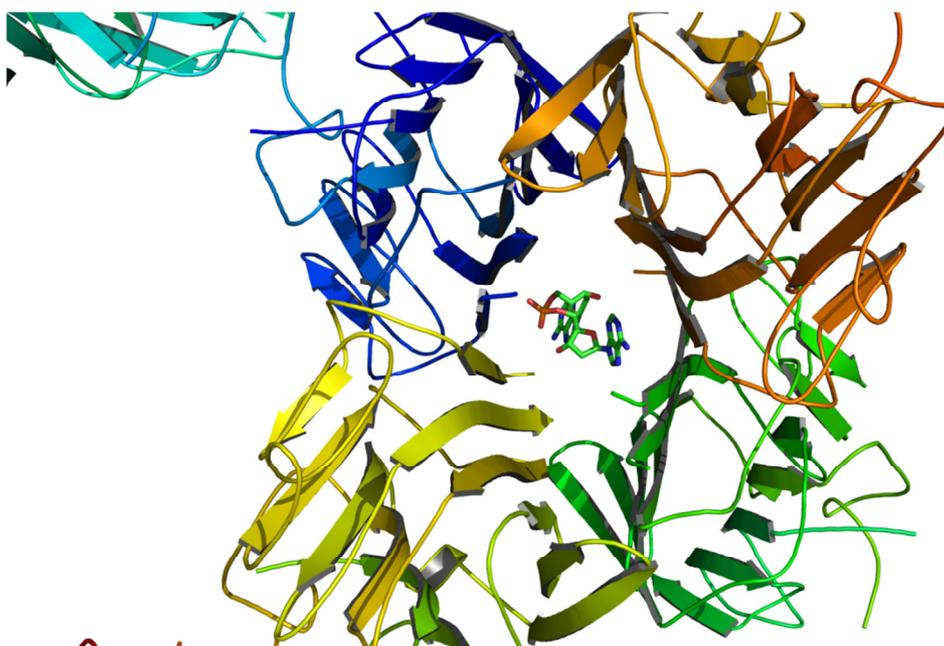


Figura 10. Cocrystal de ConM+DNA: Referente à um cristal de ConM complexada com DNA de *Bauhinia variegata*.

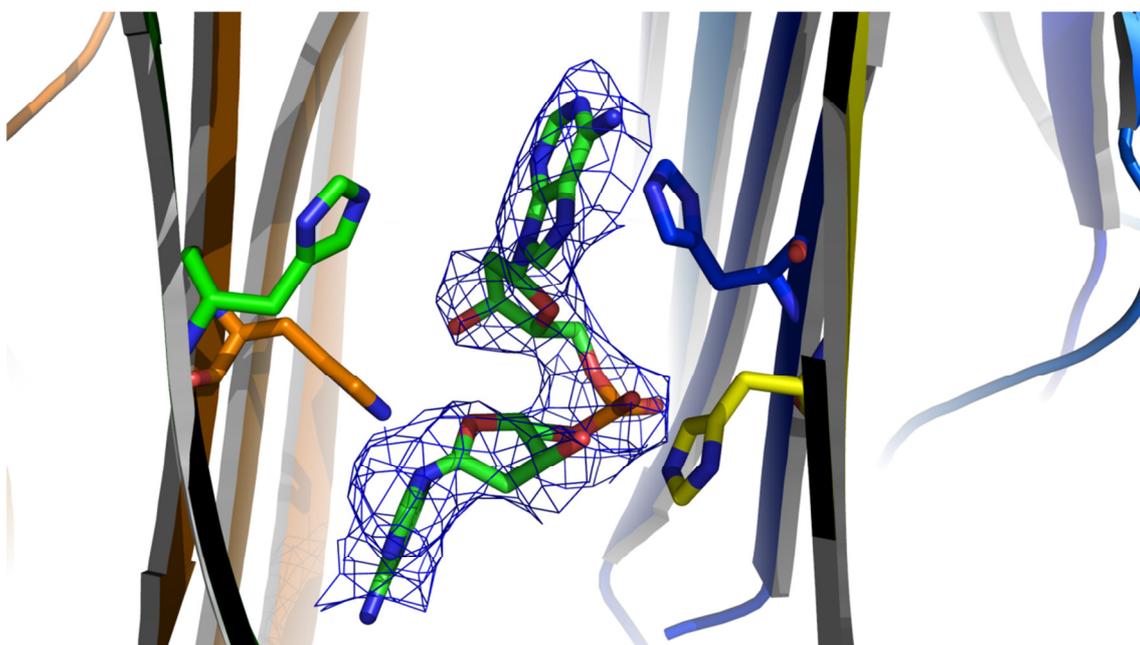
Tabela 02. Valores referentes à coleta de dados, refinamento e qualidade da estrutura.

| Parâmetros | Valores |
|---------------------------------------------------|-----------|
| <i>Coleta de Dados</i> | |
| Grupo Espacial | I222 |
| Parâmetros por Cella (Å) | |
| A | 140,6 |
| B | 140,5 |
| C | 199,0 |
| Reflexões Total | 29618 |
| Número de Reflexões únicas | 28058 |
| Moléculas por unidade assimétrica | 6 |
| Limites de Resolução (Å) | 3,25 Å |
| R_{merge} (%) | 22,5 |
| Completeza (%) | 98,73 |
| Multiplicidade | 3,9 |
| $(I)/\sigma$ | 2,0 (2,0) |
| Comprimento de onda (Å) | 1,42 |
| <i>Substituição Molecular</i> | |
| Coefficiente de correlação | 41,7 |
| R_{factor} (%) | 21,62 |
| R_{free} (%) | 26,71 |
| Número de resíduos em unidade assimétrica | 1422 |
| Número de moléculas de água | 137 |
| <i>Gráfico de Ramachandran</i> | |
| Resíduos em regiões mais favorecidas (%) | 88,24 |
| Resíduos em regiões adicionalmente permitidas (%) | 11,76 |
| Resíduos em regiões generosamente permitidas (%) | 0 |

Na cavidade central da ConM foi encontrada uma densidade eletrônica de um dinucleotídeo. Após algumas tentativas, dois nucleotídeos de dAMP (desoxiadenosina monofosfato) ligados, foram devidamente posicionados dentro da sua respectiva nuvem eletrônica. Os mesmos se encontram entre os resíduos de HIS 127, das cadeias do tetrâmero com os quais o dinucleotídeo interage com três, desses quatro aminoácidos que estão nessa região, através de pontes de hidrogênio e interações de Van der Waals (Figura 11 A e B).



(A)



(B)

Figura 11. Interação do dinucleotídeo com a ConM: (A) Visão geral do tetrâmero da ConM com um dinucleotídeo ligado na região central da proteína. (B) Visão aproximada da região central do tetrâmero, mostrando o dinucleotídeo dentro de sua densidade eletrônica, e as quatro histidinas da região, sendo a cadeia A representada pela cor azul, a cadeia D pela cor amarela, a cadeia E pela cor laranja, e a cadeia C pela cor verde. Dos quatro resíduos, apenas a histidina da cadeia C não interage com a molécula.

Uma das bases nitrogenadas interage com a HIS 127 da cadeia A do tetrâmero, representado nas figuras pela cor azul. É possível observarmos a ocorrência de três pontes de hidrogênio, com distâncias de 2,82 Å do átomo N6 da adenina com a histidina, 2,90 Å entre o átomo N7 da base com o aminoácido e 3,07 Å do átomo N1 da adenina com a histidina (Figura 12).

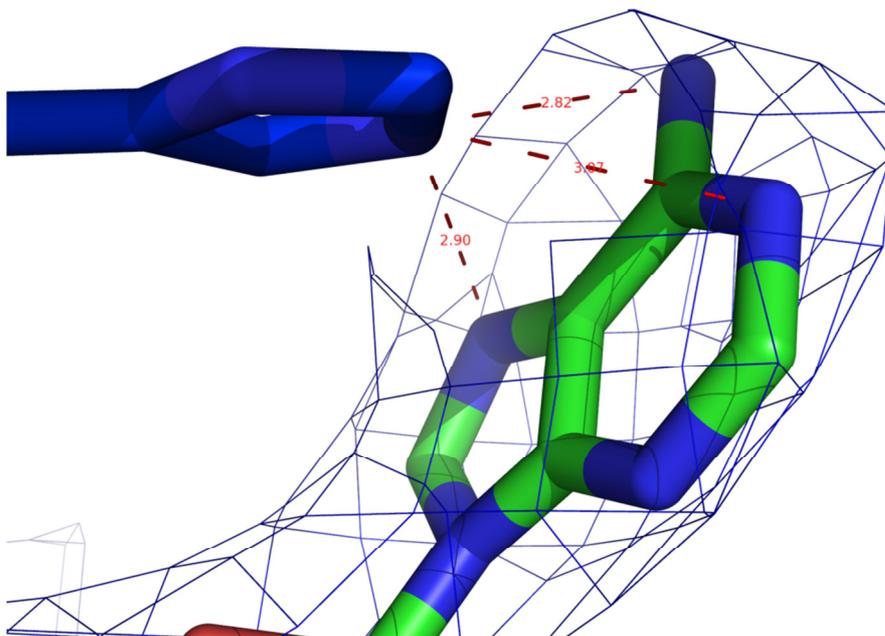


Figura 12. Interação da base nitrogenada com a HIS 127/A: Base nitrogenada, adenina, interagindo com a HIS 127 da cadeia A através dos átomos N1, N6 e N7.

Seguindo com o dinucleotídeo, a pentose ligada a essa adenina, não realiza nenhuma ligação com nenhuma cadeia. O grupamento fosfato interage com a HIS 127 da cadeia D do tetrâmero, representado nas figuras pela cor amarela. Observando a Figura 13 podemos ver que o átomo O2 desse grupo interage por ligação de hidrogênio a uma distância de 2,82 Å com o aminoácido positivamente carregado.

A outra pentose, no entanto realiza duas ligações de hidrogênio, sendo uma do átomo O3 interagindo a uma distância de 2,63 Å com a histidina da cadeia D (Figura 13), e a outra do átomo O4 com uma distância de 2,81 Å com a HIS 127 da cadeia E (Figura 14), aqui representado pela cor laranja. Por fim, a outra adenina realiza duas interações de hidrogênio com a HIS 127 da cadeia E, sendo o átomo N9 da adenina

interagindo a uma distância de 3,00 Å, e o átomo de N3 a uma distância de 2,33 Å (Figura 14).

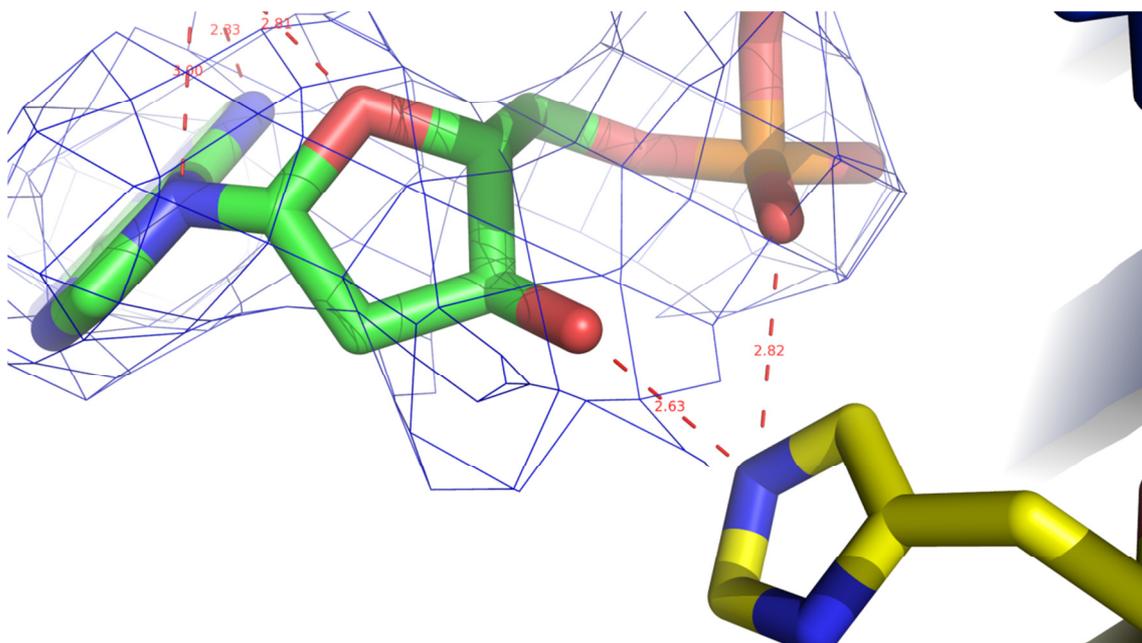


Figura 13. Interação do grupamento fosfato e a ribose com a HIS 127/D: HIS 127 da cadeia D interagindo com o átomo O2 do grupamento fosfato e com o átomo O3 da pentose.

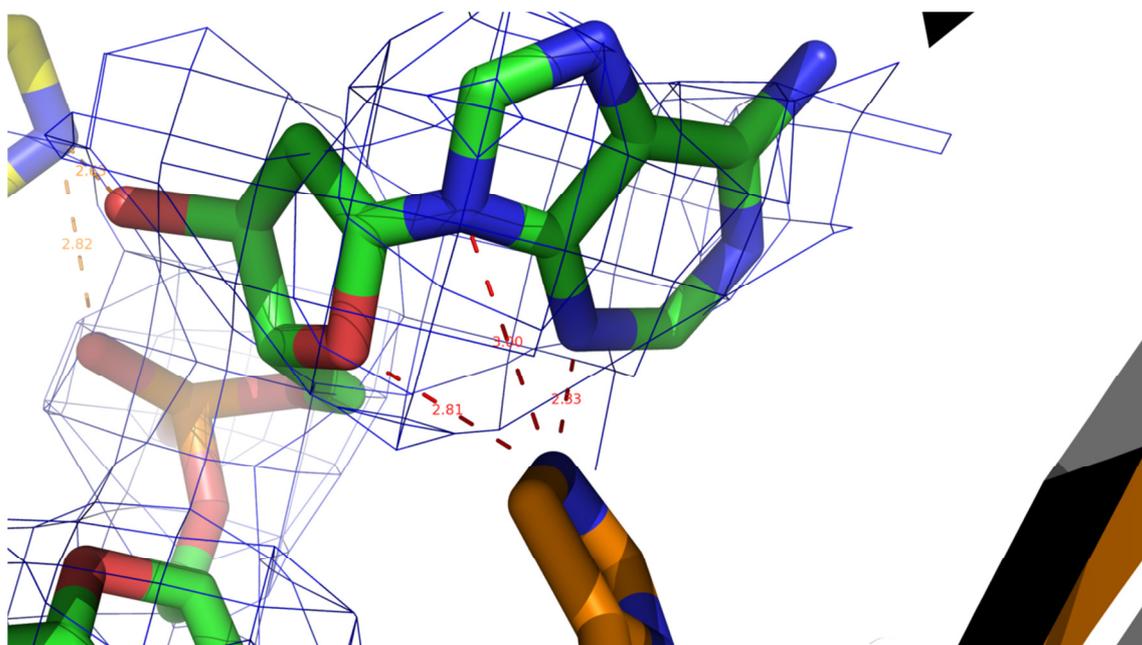


Figura 14. Interação da base nitrogenada com a HIS 127/E: Interação da outra base nitrogenada do dinucleotídeo com a HIS 127 da cadeia E, através dos átomos N3 e N9.

6. DISCUSSÃO

As lectinas apresentam pelo menos um domínio não catalítico que se liga reversivelmente a um mono ou oligossacarídeo específico (PEUMANS E VAN DAMME, 1995), as interações no sítio de ligação ao carboidrato das lectinas de Diocleinas, podem ser a resposta para explicar a correlação entre a sua estrutura e a sua função fisiológica (CAVADA et al, 2001), assim as lectinas de leguminosas, são também conhecidas por se ligarem a porções de carboidratos presentes na superfície celular (BREITWIESER, 2003). Uma proteína que apresenta uma habilidade de interagir fortemente com a molécula de DNA, não alterando os componentes dessa macromolécula, podendo ser recuperada intacta desse complexo, seria um carreador ideal para mediar a internalização das moléculas de DNA desejadas para dentro das células (BREITWIESER, 2003).

A ConM assume uma oligomerização tetramérica biológica e esse arranjo tetramérico das lectinas ConA-like são bem conhecidas e foram mostradas por cromatografia, eletroforeses e espectrometria de massa (DELATORRE et al, 2006). A presença do tetrâmero no cristal indica que a associação dos dímeros da ConM não é estericamente proibido e pode ocorrer sob condições adequadas, além disso, a habilidade das lectinas para formar tetrâmeros pode ser fisiologicamente relevante na ligação do receptor (GADELHA et al, 2005).

Várias lectinas de leguminosas como, *Concanavalina A* (ConA), *Canavalia bonariensis* (ConBn), *Canavalia brasiliensis* (ConBr), *Canavalia grandiflora* (ConG), *Dioclea violacea* (Dviol), *Dioclea virgata* (Dvirg), *Lens culinaris* lectin (LcA), *Phaseolus vulgaris* (PHA-E) e a própria ConM, são capazes de interagir com DNA e formar complexos chamados de Lectina-DNA. Entre elas, a ConA é capaz de se ligar muito bem ao DNA em condições opostas àquelas necessárias para a ligação ao açúcar (BREITWIESER, 2003). Testes com Cocristais de ConM complexada à fragmentos de DNA mostram que quando a ConM se liga ao DNA, a sua cavidade central fica aberta (Figura 15A), diferente do cristal na sua forma nativa, onde essa mesma cavidade se encontra fechada (Figura 15B). Em outro estudo da ConM complexada com o hormônio Ácido-3-Indol-Acético (AIA), foi mostrado que na sua cavidade central houve um empilhamento de quatro hormônios (AIA) (Figura 16 A e B), que é um empilhamento característico que ocorre com as bases do DNA. Estes são fortes indícios estruturais de

que as lectinas de leguminosas podem se ligar a oligonucleotídeos, através de uma junção tetramérica muito semelhante a um zíper de lisina.

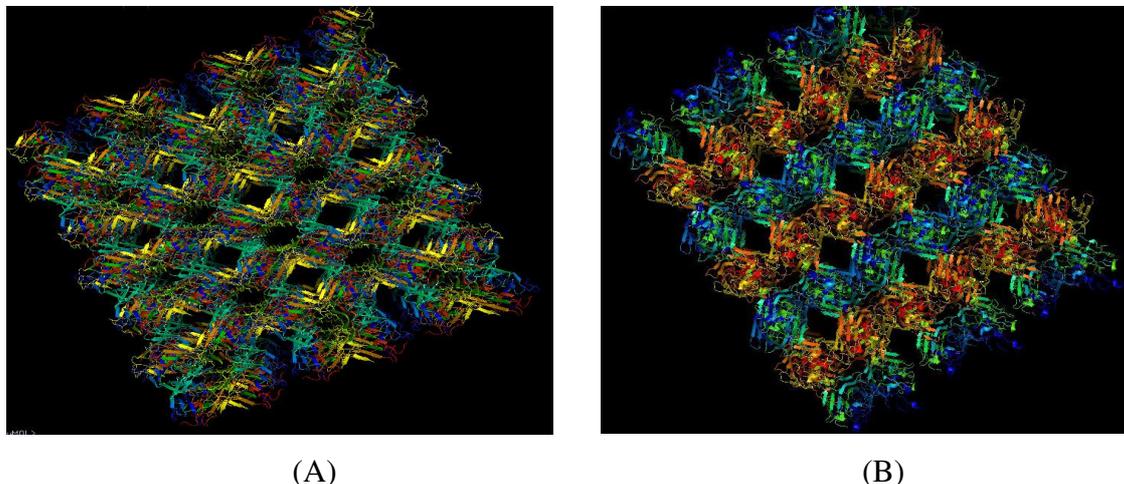


Figura 15. Cristais com cavidades abertas e fechadas: (A) Cristal da ConM com sua cavidade aberta e (B) cavidade da ConM complexada ao DNA com a sua cavidade fechada, evidenciado uma provável ligação dessa molécula à proteína (Dados não publicados).

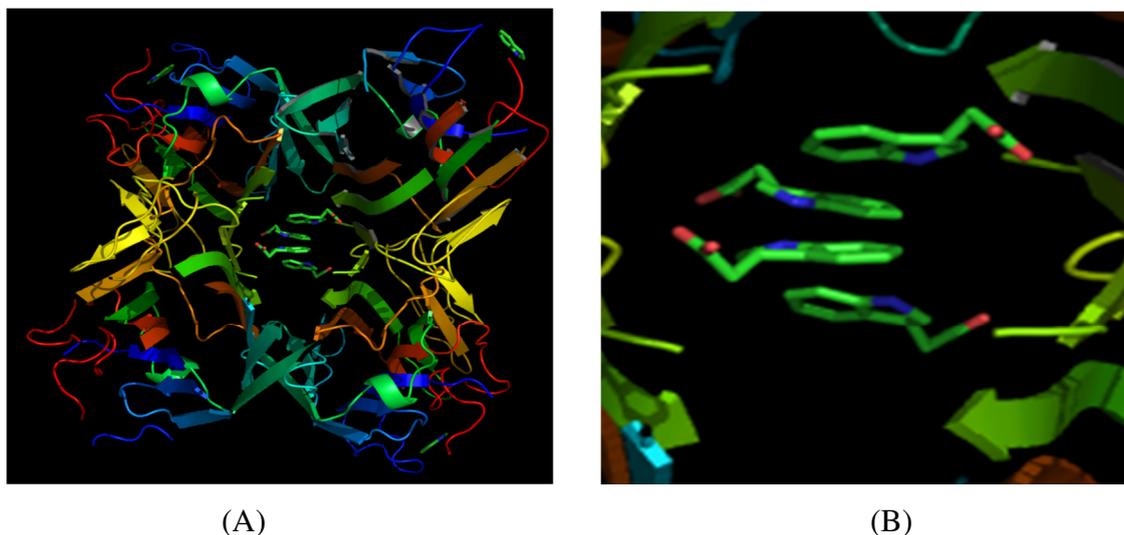


Figura 16. ConM complexada com AIA: (A) referente ao empilhamento de quatro moléculas de Ácido-3-Indol-Acético na cavidade central da ConM. (B) uma visão mais aproximada do empilhamento.

Existem lectinas de algumas leguminosas que apresentam um sítio de ligação para adenina (MALIARIK & GOLDSTEIN, 1988; HAMELRYCK et al., 1996), mas até então, nenhum sítio de ligação a adenina foi descrito para ConA ou ConM, então o sítio encontrado em grande parte das lectinas mencionadas, não seria o mesmo da formação do complexo Lectina-DNA, já que as lectinas que apresentam esse sítio, como por exemplo a PHA-L (phytohemaglutinina-L), lectina da semente de *Phaseolus vulgaris*, não são capazes de formar complexos de Lectina-DNA (BREITWIESER, 2003) e apresentam a sua estrutura quaternária diferente do tetrâmero da ConA (HAMELRYCK et al., 1996), sendo então provavelmente locais diferentes de ligação.

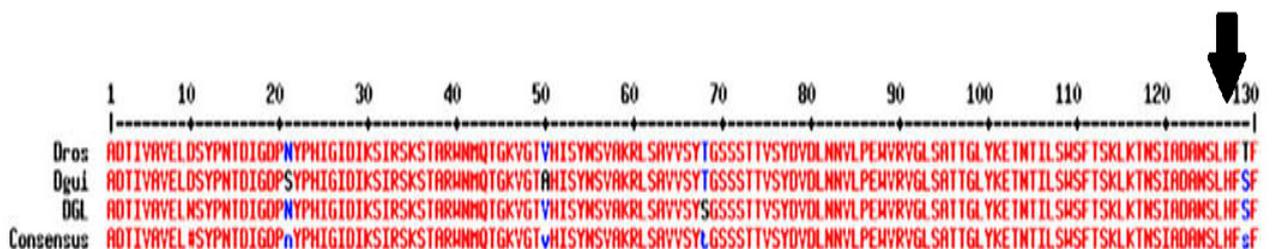
O reconhecimento de ácidos nucleicos envolvem interações específicas entre macromoléculas de propriedades eletrostáticas diferentes, para uma dada proteína os sítios de ligação são adaptados para essa complementariedade (DUCRUIX & GIEGÉ, 1999). A adenina expõe alguns grupos de hidrogênios doadores ou receptores, que podem estar envolvidos em uma série de interações de ligações (BLOOMFIELD et al., 2000). De acordo com Breitwieser (2003) bases e fosfatos do DNA podem ser considerados fortes candidatos para mediar a ligação entre a molécula e a lectina, e na presença do nucleotídeo ATP a inibição do complexo lectina-DNA ocorre fortemente, enquanto que na presença do açúcar 2-D-deoxyribose não ocorre, sendo esse efeito similar em lectinas da ConA, ConBr e ConBn. A não inibição do complexo pelo açúcar não quer dizer que não há participação do mesmo na ligação do DNA à lectina, pois levando em conta as características que o açúcar tem como componente de um nucleotídeo aumenta mais a possibilidade de que o mesmo esteja envolvido nessa interação (BREITWIESER, 2003).

As lectinas da tribo Diocleinae tem sido muito estudadas, e análises de sequências de aminoácidos mostram que essas lectinas apresentam similaridades (PEREZ, 1991). A sequência da ConM quando analisada corretamente, mostrou uma homologia de 98% dessa com a ConA (GADELHA et al, 2005). Apesar de algumas pequenas diferenças na sua sequência primária e na sua estrutura tridimensional, esse grupo de proteínas diverge em várias propriedades biológicas, o que os fazem um excelente modelo para as relações de funções relacionadas à estrutura (CAVADA et al, 2001; MORENO et al, 2004). Nas análises de sequência de aminoácidos das lectinas de Diocleínas (GADELHA et al, 2005; OLIVEIRA et al, 2008), os resíduos de His 127, que é o responsável pela ligação do fragmento de DNA à proteína, é conservada nessas lectinas (Figura 17 A e B), corroborando com a ideia de que várias lectinas de

leguminosas são capazes de ligar com DNA e formar complexos (BREITWIESER, 2003). Para o reconhecimento do DNA pelas proteínas, um determinado número de cadeias laterais de aminoácidos podem servir para efetuar as ligações de hidrogênios (SAUER et al, 1990), tendo um determinado número de aminoácidos que se envolvem nessas ligações na proteína-DNA com mais frequência, como a Gln, Glu, Ser, Lys, Asn, Arg, Thr, His e Cys (BLOOMFIELD et al, 2000).



(A)



(B)

Figura 17: Sequências de lectinas de Diocleínas: (A) Referente a um alinhamento de sequências de lectinas pertencentes à tribo Diocleinae, indicando o resíduo de aminoácido conservado, Histidina 127. Adaptado de GADELHA et al, 2005. (B) Referente à um múltiplo alinhamento de lectinas de Diocleínas. Adaptado de OLIVEIRA et al, 2008

Em fluidos biológicos, com concentrações de NaCl fisiológico, a formação dos complexos lectina-DNA é mais improvável que ocorra, pois esses complexos apresentam uma natureza iônica, indicando que a interação dessa ligação ocorre de maneira diferente (BREITWIESER, 2003), já que em uma solução que apresenta altas concentrações de íons, qualquer interação iônica entre o DNA e a macromolécula

carregada positivamente, não seria favorecida (BLOOMFIELD et al). No caso das células, essa força é muito mais variável e deve ser considerada dependendo do tipo de célula ou tecido (BREITWIESER, 2003).

Os estudos com várias lectinas de plantas, com testes *in vivo* e *in vitro* vem sendo reportado desde a década de setenta e tem demonstrado que essas proteínas possuem atividade antitumoral e atividade anticarcinogênica. Sugere-se que os efeitos antitumorais das lectinas esteja associada com a habilidade que essas proteínas tem para modular o crescimento, a diferenciação, a proliferação e a apoptose, mediadas por receptores de superfícies, onde a especificidade a determinados açúcares influencia na ação dessas proteínas em células cancerígenas. A nível metabólico, são descritas algumas sequências onde as lectinas podem atuar, sendo uma, a entrada das lectinas pelo trato digestivo, em outra a lectina sendo internalizada na célula, podendo afetar em todo o processo celular, e ainda um terceiro mecanismo que induziria a apoptose por outras vias diversas (CASTILLO-VILLANUEVA & ABDULLAEV, 2005).

O mecanismo que é proposto para a lectina como um agente antitumoral, ainda não é totalmente esclarecido, mas alguns estudos indicam que é possível um papel na indução do processo de apoptose e autofagia, induzida pela ligação das lectinas à receptores glicosilados na superfície das células tumorais. Barbosa et al, 2001 demonstrou que algumas lectinas estudadas como a ConBr, são capazes de estimular *in vivo*, células dos linfonodos poplíteos de ratos, e que esse evento ocorreria graças à apoptose, inflamação e em alguns casos, necrose de vênulas endoteliais. Sendo assim a ConBr seria um bom exemplo de lectina que pode ser internalizada, com a qual a ConM pode ser comparada, já que pertencem a mesma tribo, e o sítio de ligação ao DNA é conservado em ambas (Figura 17), além de se ter fortes indícios que quando internalizada para o núcleo celular, a ConBr pode atuar como fator de transcrição, mimetizando a p53, onde segundo Alberts et al, 2007 a p53 é uma das principais proteínas responsáveis pela inibição da proliferação celular, envolvidas no processo apoptótico, e os genes que a controlam, são controlados por estimuladores que vêm da superfície celular.

Uma hipótese para essa internalização seria através de um receptor relacionado à proteína LDL, chamado de LRP (receptor-related protein), um receptor importante que tem um papel fundamental na parte do metabolismo do colesterol através da captação do LDL do plasma para o interior das células (BEISIEGEL, 1989). Esse receptor é um membro da família de receptores-LDL que realiza a endocitose de um diversificado

leque de ligantes. Além disso, ele é identificado como uma proteína de membrana que tem um domínio de ligação para heparina.

Da mesma maneira que o receptor LRP, algumas lectinas de leguminosas, como a ConA, apresenta um domínio semelhante, chamado de Heparin-binding (MONGE et al, 1989), o qual também está contido na proteína Midkina (MK) (JONO & ANDO, 2010). Estudos indicam que a MK pode ser internalizada na célula através de receptores para LDL (LRP), com a participação das sindecans no processo de sinalização e reconhecimento da MK, além de integrinas e proteína tirosinofosfatase (PTP). No caso específico de células tumorais, a translocação para o núcleo é necessária para a sobrevivência da célula tumoral, uma vez que a MK possui atividade angiogênica e antiapoptótica (KADOMATSU & MURAMATSU, 2004). Essas proteínas são endocitadas até o núcleo citoplasmático (Figura 18) e de modo similar as lectinas ConBr e ConM seriam internalizadas.

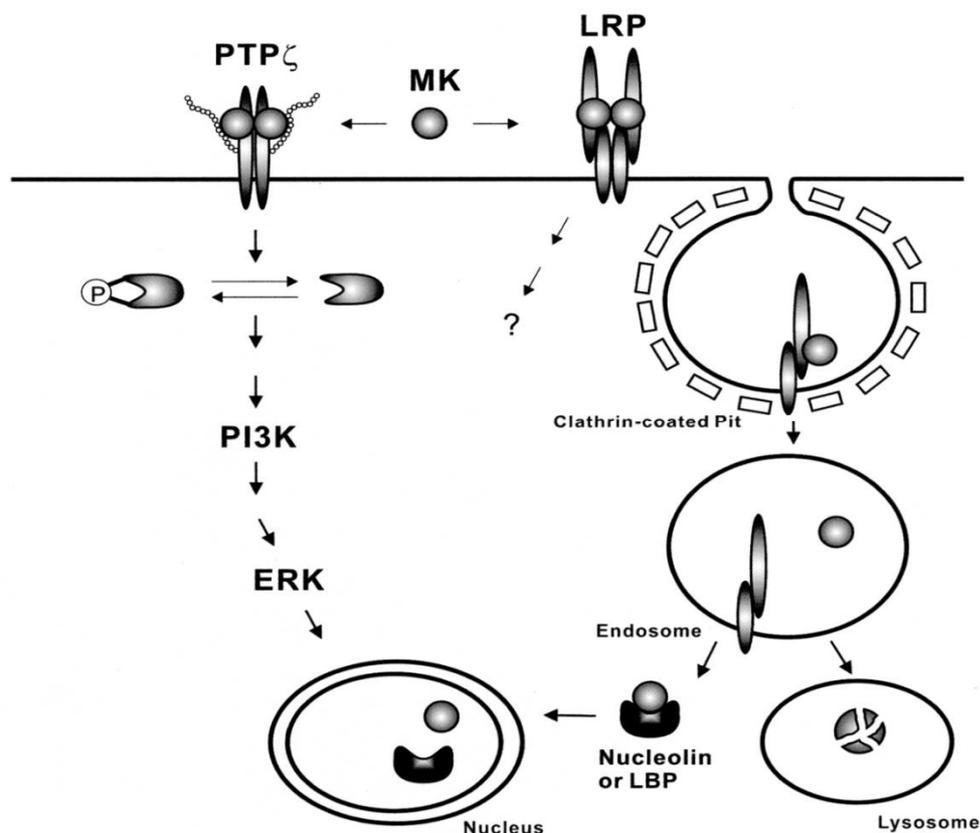


Figura 18. Internalização da Midkina: Referente ao esquema da endocitose da Midkina. Fonte: KADOMATSU & MURAMATSU, 2004

Sabendo então que as lectinas de leguminosas são conhecidas por se ligarem à carboidratos da superfície celular, a descoberta de que elas também são capazes de se ligar à molécula de DNA, mostrando estruturalmente o local de ligação desta molécula através da cristalografia de raios X, é um grande marco que ampliará os estudos nessa área. Com base nos dados obtidos é possível hipotetizar que a ConM atua intracelularmente, similar a ConBr, podendo ser internalizada através de receptores de LDL, mimetizar a p53 no núcleo citoplasmático, e corroborar com a ideia de que as lectinas funcionam como drogas antitumorais. Essas evidências serão analisadas e mais aprofundadas para poder explicar melhor essas novas rotas que o DNA pode ter, para que seja internalizado nas células. Com isso, essas novas descobertas serão uma ótima ferramenta para as investigações no que se diz respeito ao câncer.

7. CONCLUSÕES

- A lectina de *Canavalia maritima* complexada com fragmentos de DNA de *Bauhinia variegata* foi cristalizada na condição 44 do kit de cristalização Crystal Screen N°1 da Hampton Research, constituída por 0,2M de formato de magnésio, em aproximadamente 30 dias;
- Foi possível observar na cavidade central do tetrâmero da lectina uma densidade eletrônica de um dinucleotídeo, o qual interage com três, das quatro histidinas 127, sendo cada uma de uma subunidade tetramérica, presentes naquela região. Essa interação se dá por pontes de hidrogênio e interações de Van der Waals;
- Com base nesses dados foi possível hipotetizar que a ConM pode atuar intracelularmente, sendo internalizada no núcleo citoplasmático através de receptores de LDL, e lá mimetizando a p53, uma das proteínas que participam do processo apoptótico;
- Aprofundamento nos estudos dessa área são necessários, para melhor esclarecimento de como o DNA pode ser internalizado, através da interação lectina-DNA.

8. BIBLIOGRAFIA

ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 4ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

AZEVEDO JR, W. F. **Cristalização de Macromoléculas Biológicas**. São José do Rio Preto, São Paulo, 2004. Disponível em: <www.biocristalografia.df.ibilce.unesp.br> Acesso em: 28 maio. 2012.

BARBOSA, T. et al. **In Vivo Lymphocyte Activation and Apoptosis by Lectins of the Diocleinae Subtribe**. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v.95, p. 673-678, 2001.

BEISIEGEL, U. et al. **The LDL-Receptor-Related Protein, LRP, is an Apolipoprotein E-binding Protein**. Nature, v.341, p.162, 1989.

BITTIGER, H.P.; SCHNEBLI. **Concanavalin A as a Tool**. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1976.

BLEICHER, L.; SASAKI, J. M. **Introdução à Difração de Raios-X em Cristais**. Universidade Federal do Ceará, 2000. Disponível em: <<http://www.fisica.ufc.br/raiosx/download/apostila.pdf>> Acesso em: 02 Junho. 2012.

BLOOMFIELD, V.A.; CROTHERS, D.M.; TINOCO JR., I. **Nucleic Acids: Structure, Properties and Functions**. University Science Books-California-USA, 2000.

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

BREITWIESER, O.V. **Leguminous Lectins Bind Non-specifically to DNA**. 2000-2003. Dissertation (Doctorate in Mathematics and Natural Sciences) – Faculty of the University of Cologne, Cologne.

CALVETE, J. J. et al. **Molecular Characterization and Crystallization of Diocleinae lectins**. Biochimica et Biophysica Acta, v.1430, p 367-375, 1999.

CARTER, C. W. JR.; CARTER, C. W. **Protein Crystallization Using Incomplete Factorial Experiments**. J. Biol. Chem, v.254, p. 12219-12223, 1979.

CASTILLO-VILLANUEVA, A.; ABDULLAEV, F. **Lectinas Vegetales y sus Efectos em el Cáncer**. Revista de Investigación Clínica, v. 57, p.55-64, 2005.

CAVADA, B. S. et al. **Revisiting Proteus: Do Minor Changes in Lectin Structure Matter in Biological Activity? Lessons From and Potential Biotechnological Uses of the Diocleinae Subtribe Lectins**, Curr. Protein Pept. Sci, v. 2, p. 123–135, 2001.

COLLABORATIVE COMPUTACIONAL PROJECT, NUMBER 4. **The CCP4 Suite: Programs for Crystallography**. Acta Crystallogr. D50 p.760–763, 1994.

CHAYEN, N. E. **Methods for Separating Nucleation and Growth in Protein Crystallization**. Progress in Biophysics and Molecular Biology, v.88, p.329-337, 2005.

DALE, G.E.; OEFNER, C.; D'ARCY, A.; **The Protein as a Variable in Protein Crystallization**. Journal of Structural Biology v.142, p. 88-97, 2003.

DELANO, W.L. **The PyMol Molecular Graphics System**, Schrodinger, LLC, 2004.

DELATORRE, P.; FADEL, V.; AZEVEDO JUNIOR, W. F. **Simulação de Densidade Eletrônica para Cristais Unidimensionais e Bidimensionais**. Revista Brasileira de Ensino de Física, v.23, p.63-73, 2001.

DELATORRE, P. et al. **Crystal Structure of a Lectin From Canavalia maritima (ConM) in Complex with Trehalose and Maltose Reveals Relevant Mutation in ConA-like Lectins**. Journal of Structural Biology, v.154, p. 280-286, 2006.

DRENTH, J. **Principles of Protein X-ray Crystallography**: 3rd edition. Springer, New York, 2007.

DUCRUIX, A.; GIEGÉ, R. **Crystallization of Nucleic Acids and Proteins: A Practical Approach**, 2nd edition, New York, Oxford University Press, 1999.

EDELMAN, G.M. et al. **The Covalent and Three-dimensional Structure of Concanavalin A**. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., v. 69, p. 2580-2584, 1972.

EMSLEY, P.; COWTAN, K. **Coot: Model-building Tools for Molecular Graphics**. Acta Crystallogr. D60, p. 2126–2132, 2004.

FOSTER, G.D; TWELL, D. **Plant Gene Isolation: Principles and Practice**. England, John Wiley & Sons, 1996.

GADELHA, C.A.D.A. et al. **Native Crystal Structure of a Nitric Oxide-releasing Lectin from the Seeds of *Canavalia maritima***, J. Struct. Biol, v.152, p 185-194, 2005.

HAMELRYCK, T. W. et al. **The Crystallographic Structure of Phytohemagglutinin-L**. The Journal of Biological Chemistry, v. 271, p. 20479-20485, 1996.

JANCARIK, J.; KIM, S. H. **Sparse Matrix Sampling: A Screening Method for the Crystallization of Macromolecules**. J. Appl. Crystallogr. v.24 , p. 409-411, 1991.

JONO, H.; ANDO, Y. **Midkine: A Novel Prognostic Biomarker for Cancer**. Cancers, v.2, p. 624-641, 2010.

KADOMATSU, K.; MURAMATSU, T. **Midkine and Pleiotrophin in Neural Development and Cancer**. Cancer Letters, v. 204, p. 127–143, 2004.

LAM, S.K. NG, T.B. **Lectins: Production and Practical Applications**. Appl. Microbiol. Biotechnol, v.89, p. 45-55, 2011.

LEHNINGER, A.L. **Principios de Bioquímica**. David L. Nelson & Michael M. Cox; traduzido por Arnaldo Antonio Simoes & Wilson Roberto Navega Lodi. – 4. ed. – São Paulo: Sarvier, 2006.

LESLIE, A. G. W. **User Guide, MOSFLM Version 5.50**. MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, England, 1997.

LEWIN, B. **Genes IX**. 9ª edição. Porto Alegre. Artmed. 2009.

LIS, H.; SHARON, N. **Lectins: Carbohydrate-specific Proteins that Mediate Cellular Recognition**. Chem. Rev., v.98, p. 637-674, 1998.

LORIS, R. et al. **Legume Lectin Structure**. Biochimica et Biophysica Acta, v. 1383, p. 9–36, 1998.

MAHATO, R.I.; TAKAKURA, Y.; HASHIDA, M. **Development of Targeted Delivery Systems for Nucleic Acid Drugs**. J. of Drug Targeting, V.4, P. 337-357, 1997.

MALIARIK, M. J.; GOLDSTEIN, I. J. **Photoaffinity Labeling of the Adenine Binding Site of the Lectins from Lima Bean, *Phaseolus lunatus*, and the Kidney Bean, *Phaseolus vulgaris***. The Journal of Biological Chemistry, v. 263, p. 11274-11279, 1988.

MCPHERSON, A. **Introduction to Macromolecular Crystallography**. John Wiley & Sons, Hoboken, 2003.

MORENO, F.B.M.B. et al. **Crystallization and Preliminary X-ray diffraction Analysis of the Lectin from *Canavalia gladiata* Seeds**. Acta Cryst. D60, p.1493–1495, 2004.

MITRA, N.; SRINIVAS, V. R.; SUROLIA, A. **Legume Lectinas: A Paradigm in Quaternary Structure Variations Arising from Similar Tertiary Structural Fold**. Proc. Indian natn Sci Acad, v.2, p. 205-216, 2002.

MISQUITH, S.; RANI, P. G.; SUROLIA, A. **Carbohydrate Binding Specificity of the B-cell Maturation Mitogen from *Artocarpus integrifolia* Seeds**. The Journal of Biological Chemistry, v. 269, p 30393-30401, 1994.

MURSHUDOV, G.N. et al. **REFMAC5 For the Refinement of Macromolecular Crystal Structures**. Acta Cryst. D67, p. 355-367, 2011.

OCHI, T. et al. **Perspectives on Protein Crystallization**. Progress in Biophysics and Molecular Biology, v. 101, p. 56-63, 2009.

OLIVEIRA, T.M. et al. **Crystal Structure of *Dioclea rostrata* Lectin: Insights into Understanding the pH-dependent Dimer-tetramer Equilibrium and the Structural Basis for Carbohydrate Recognition in Diocleinae Lectins**. Journal of Structural Biology, v.168, p.177-182, 2008.

PEREZ, G. et al. **Comparison of the Amino Acid Sequences of the Lectins from Seeds of *Dioclea lehmanni* and *Canavalia maritima***. Phytochemistry, v.30, p. 2619-2621, 1991.

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

PRIVÉ, G.G.; YANAGI, K.; DICKERSON, R.D. **Structure of the B-DNA Decamer C-C-A-A-C-G-T-T-G-G and Comparison with Isomorphous Ddecamers C-C-A-A-G-A-T-T-G-G and C-C-A-G-G-C-C-T-G-G**. J. Mol. Biol., v.217, p. 177-199, 1991.

RAMOS, M.V. et al. **The Carbohydrate-binding Specificity and Molecular Modelling of *Canavalia maritima* and *Dioclea grandiflora* lectins**. Mem. Inst. Oswaldo Cruz v.97, 761–766, 1996.

RHODES, G. **Crystallography Made Crystal Clear: A Guide for Users of Macromolecular Models**. Academic Press, INC, San Diego, 1993.

ROUGÉ, P. et al. **Single-and Two-Chain Legume Lectins as Phylogenetic Markers of Speciation**. Biochemical Systematics and Ecology, v.15, p 341-348, 1987.

RUDIGER, H.; GABIUS, H. J. **Plant lectins: Occurrence, biochemistry, functions and applications**. Glycoconjugate Journal, v.18, p.589–613, 2001.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual** (3rd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SAUER, R.T.; JORDAN, S.R; PABO, C.O. **Lambda Repressor: A Model System for Understanding Protein-DNA Interactions and Protein Stability**. *Adv. Prot. Chem.* v.40, p.1-61, 1990.

SHARON, N.; LIS, H. **Lectins as Cell Recognition Molecules**. *Science*, v.246, p. 227-246, 1989.

SHARON, N., LIS, H. **Leguminous Lectins – A Large Family of Homologous Proteins**. *FASEB J*, v.4, p. 3198-3208, 1990.

SHARON, N.; LIS, H. **History of Lectins: From Hemagglutinins to Biological Recognition Molecules**. *Glycobiology*, v. 14, p. 53–62, 2004.

SUMNER, J.B. **The Isolation and Crystallization of the Enzyme Urease**. Preliminary paper from the Department of Physiology and Biochemistry, Cornell University Medical College, Ithaca, 1926.

TAN, S. et al. **Crystallization of the Yeast MAT α 2/MCM1/DNA Ternary Complex: General Methods and Principles for Protein/DNA Cocrystallization**. *J. Mol. Biol.*, v.297, p. 947-959, 2000.

VAN DAMME, E. J. M. et al. **Plant lectins: A Composite of Several Distinct Families of Structurally and Evolutionary Related Proteins with Diverse Biological Roles**. *Crit Rev Plant Sci*, v.17, p. 575–692, 1998.

VARGIN, A.; TEPLYAKOV, A. **MOLREP: An Automated Program for Molecular Replacement**. *J. Appl. Crystallogr.* v.30, p.1022–1025, 1997.

WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. **A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid**. *Nature* (London), v. 171, p.737-788, 1953

WIENHUES, U. et al. **Laboratory Methods: A Novel Method for Transfection and Expression of Reconstituted DNA-protein Complexes in Eukaryotic Cells.** DNA, v.6, p.81-89, 1987.

APÊNDICE 1

Validação do modelo no PDB Validation Report (www.rcsb.org)

wwPDB Validation Report

Summary of PDB Entry Validation

The results of the validation of this PDB entry are shown below. Some major issues were found.

Geometry Validation

1. Peptide Linkage

The C-N bonds listed below lie outside of the accepted range for the peptide bond (1.30-1.45). The main chain geometry needs to be corrected.

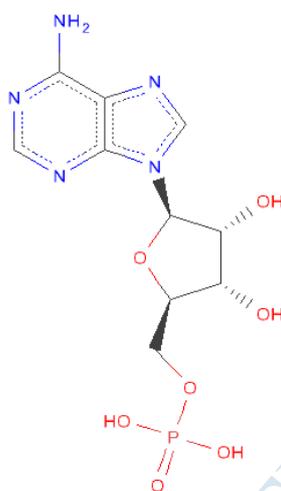
```
Residue A SER 117 and Residue A THR 123 are not properly linked:  
C-N bond distance is 6.52 A.  
Residue B SER 117 and Residue B THR 123 are not properly linked:  
C-N bond distance is 6.02 A.  
Residue C SER 117 and Residue C GLU 122 are not properly linked:  
C-N bond distance is 6.97 A.  
Residue D SER 117 and Residue D THR 123 are not properly linked:  
C-N bond distance is 6.85 A.  
Residue E SER 117 and Residue E THR 123 are not properly linked:  
C-N bond distance is 6.71 A.  
Residue F SER 117 and Residue F THR 123 are not properly linked:  
C-N bond distance is 6.76 A.
```

Ligand Chemistry

Identifier: AMP

Name: ADENOSINE MONOPHOSPHATE

Formula: C10 H14 N5 O7 P



| Type | Program | Version | Descriptor |
|------------------|--------------------|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| SMILES | ACDLabs | 12.01 | <chem>O=P(O)(O)OCC3OC(n2cnc1c(ncnc12)N)C(O)C3O</chem> |
| InChI | InChI | 1.03 | InChI=1S/C10H14N5O7P/c11-8-5-9(13-2-12-8)15(3-14-5)10-7(17)6(16)4(22-10)1-21-23(18,19)20/h2-4,6-7,10,16-17H,1H2,(H2,11,12,13)(H2,18,19,20)/t4-,6-,7-,10-/m1/s1 |
| InChIKey | InChI | 1.03 | UDMBCSSLTHHNCD-KQYNXXCUSA-N |
| SMILES CANONICAL | CACTVS | 3.370 | <chem>Nc1ncnc2n(cnc12)[C@@H]3O[C@H](CO[P](O)(O)=O)[C@@H](O)[C@H]3O</chem> |
| SMILES | CACTVS | 3.370 | <chem>Nc1ncnc2n(cnc12)[CH]3O[CH](CO[P](O)(O)=O)[CH](O)[CH]3O</chem> |
| SMILES CANONICAL | OpenEye OEToolkits | 1.7.6 | <chem>c1nc(c2c(n1)n(c2)[C@H]3[C@@H]([C@@H]([C@H](O3)COP(=O)(O)O)O)O)N</chem> |
| SMILES | OpenEye OEToolkits | 1.7.6 | <chem>c1nc(c2c(n1)n(c2)C3C(C(C(O3)COP(=O)(O)O)O)O)N</chem> |

Summary of Structure Factor Validation

| Structure quality | |
|---------------------------------------------------------------------------|--------|
| Average Real space R-factor (Calculated by MAPMAN, V7.8.5) | 0.1310 |
| Average Real-space correlation coefficient (Calculated by MAPMAN, V7.8.5) | 0.8548 |
| Average Occupancy-weighted avg temperature factor | 19.54 |

| Resolution | |
|---------------------------------------------------|--------|
| High Resolution (Author reported) | 3.25 |
| High Resolution (Calculated by REFMAC, V5.5.0109) | 3.247 |
| Low Resolution (Author reported) | 114.91 |
| Low Resolution (Calculated by REFMAC, V5.5.0109) | 38.301 |

| Crystal data | |
|-----------------------------|---------|
| Space group | I 2 2 2 |
| Total number of reflections | 29618 |
| Number of reflections used | 28058 |
| Completeness of data | 98.73 |

| R-factors | |
|-------------------------------------------------|---------|
| R-factor (Author reported) | 0.21617 |
| R-factor (Calculated by REFMAC, V5.5.0109) | 0.2174 |
| Free R-factor (Author reported) | 0.26706 |
| Free R-factor (Calculated by REFMAC, V5.5.0109) | 0.2722 |

| Wilson statistics (PHENIX, V1.6-289) | |
|---------------------------------------------|-------|
| Wilson B-factor | 35.92 |
| Wilson Scale | 0.58 |

| Padilla-Yeates statistics for twin detection (PHENIX, V1.6-289) | |
|------------------------------------------------------------------------|-------|
| Padilla-Yeates $\langle L \rangle$ | 0.423 |
| Padilla-Yeates $\langle L^*L \rangle$ | 0.244 |