

Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução

Isolamento e caracterização da lectina camptosemina
extraída das sementes de *Camptosema ellipticum*.

Fernanda Aparecida Heleno Batista

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Genética e Evolução, área de concentração: Genética e Evolução

São Carlos – SP
2007

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

B333ic

Batista, Fernanda Aparecida Heleno.

Isolamento e caracterização da lectina camptosemina extraída das sementes de *Camptosema ellipticum* / Fernanda Aparecida Heleno Batista. -- São Carlos : UFSCar, 2007.
71 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2007.

1. Proteínas - caracterização. 2. Lectinas. 3. Camptosemina. 4. *Camptosema ellipticum*. 5. Dicroísmo circular. 6. Fluorescência. I. Título.

CDD: 574.19296 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

**“ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DA LECTINA CAMPTOSEMINA
EXTRAÍDA DAS SEMENTES DE *Camptosema ellipticum*”.**

Dissertação de Mestrado de Fernanda Aparecida Heleno Batista

Banca Examinadora

Profa. Dra. Ana Paula Ulian de Araújo..... 
Prof. Dr. Júlio César Borges..... 
Profa. Dra. Leila Maria Beltramini..... 

Fernanda Aparecida Heleno Batista

Isolamento e caracterização da lectina
camptosemina extraída das sementes de
Camptosema ellipticum.

Dissertação de Mestrado para obtenção
do título de Mestre em Genética e
Evolução, área de concentração:
Genética e Evolução

Orientador: Prof^a Dra. Ana Paula Ulian
de Araújo

São Carlos, 2007.

Agradecimentos

Antes de tudo agradeço a Deus que me possibilitou chegar até aqui.

Agradeço imensamente a minha família pelo carinho e por ter me indicado o caminho a seguir, sem os quais eu não seria nada.

Ao meu querido amigo Rogério que enfrentou ao meu lado dias difíceis, eu agradeço do fundo do meu coração e digo que sem você este dia não teria sido possível.

Drê, obrigada por me ajudar a encontrar a proteína (hehehe) e por todo apoio e “mãozinhas” que você me deu ao longo do desenvolvimento deste trabalho. Bel, eu nem sei como poderia te agradecer, pois mais do que uma técnica, você foi minha mãe no laboratório. Serei grata para sempre e qualquer coisa que eu venha a escrever não será suficiente para expressar a minha gratidão.

Beto e João, obrigada por tornar menos difícil o meu convívio com aquela pecinha do laboratório : o computador!!!!

Ao meu amigo Wanesvaldo (Wânius) agradeço pela contribuição incomensurável a este trabalho mas, acima de tudo, obrigada pelas horas passadas tomando cerveja gelada e comendo amendoim, enquanto eu opinava sobre a mulherada que você paquerava.

A minha orientadora, professora Ana Paula, agradeço a orientação e atenção nestes anos. Ufa, conseguimos!

Agradeço aos professores do grupo de biofísica pelo carinho e por toda atenção nos momentos em que precisei.

Aos meus ADORADOS amigos do Grupo de Biofísica Molecular Sérgio Mascarenhas e do Grupo de Cristalografia, agradeço por todas as infundáveis discussões filosóficas, pelo incentivo constante quando até meu micro tinha vontade própria (MUHAAAAAA), por todas as vezes que vocês surgiam como a luz no fim do túnel com uma solução genial aos meus pepinos, por me ensinarem a pronunciar corretamente o inglês britânico (one bullet?) e por todas as horas de insanidade coletiva passadas na minha sala. Finalmente chegou o dia do churrasco, vamos embora tirar aquelas fotos que só nós conseguimos protagonizar! Muito obrigada! Ah, Sheila, agora é sua vez heim?!

Agradeço a Dona Graça por me salvar quando o café da minha caneca virava meio de cultura!

Resumo

Lectinas são (glico)proteínas de origem não imune capazes de causar aglutinação celular e/ou precipitação de glicoconjugados. O termo lectina de legume refere-se às lectinas de plantas que são encontradas exclusivamente em exemplares da família *Leguminosae*. Uma característica notável das lectinas de legumes é que todas as proteínas compartilham estrutura terciária constituída pelo motivo “jelly-roll”, que é basicamente composto por folhas- β , mas apresentam grande variabilidade nas formas de associação quaternária. Acredita-se que esta variabilidade seja responsável por conferir diferentes graus de estabilidade a estas lectinas. Este trabalho descreve o isolamento e a caracterização da camptosemina, uma proteína da família das lectinas de leguminosas, isolada a partir de sementes de *Camptosema ellipticum*, uma planta pertencente ao cerrado brasileiro.

Camptosemina mostrou-se como uma proteína tetramérica, cujos protômeros apresentam aproximadamente 26 kDa, capaz de hemoaglutinar todos os tipos sanguíneos do sistema ABO e com afinidade de ligação ao carboidrato N-acetilgalactosamina. Ensaio de estabilidade estrutural utilizando técnicas espectroscópicas demonstraram que camptosemina é uma proteína extremamente resistente a desnaturação térmica e química. Através da análise das curvas de desnaturação e dos ensaios de reenovelamento, foi proposto um modelo de dois estados para o processo de desnaturação da proteína, no qual, durante o equilíbrio, só existem tetrâmeros completamente enovelados e monômeros completamente desnaturados. Os valores de T_m e ΔG_{H_2O} obtidos estão em conformidade com os de outras lectinas, encontrados na literatura.

Abstract

Lectins are (glico) proteins of non immune origin able to cause cellular agglutination or precipitation of glycoconjugates. Legume lectin refers to plant lectins that are found exclusively in species of the Leguminosae family. A notable characteristic of legume lectins is that all their proteins share tertiary structure consisting of a jelly-roll motif, which is basically composed by β sheet, but present great variability the quaternary association. This variability is considered responsible for conferring different degrees of stability to the legume lectins. This work presents the isolation and characterization of the camptosemin, a protein of legume lectins family, isolated from seeds of *Camptosema ellipticum*, a plant that belongs to the Brazilian open pasture.

Camptosemin found to be a tetrameric protein, whose protomers exhibits approximately 26 kDa. It was able to agglutinate erythrocyte of all ABO sanguineous types and it was showed high affinity for N-acetylgalactosamin carbohydrate. Spectroscopic assays have demonstrated that camptosemin is an extremely resistant protein against the thermal and chemical unfolding. Through the analysis of the unfolding curves and the refolding assays, a model of two states for the unfolding of the protein was proposed. According to this model, at the equilibrium, only presents native tetramers and unfolded monomers. The obtained values of T_m and ΔG_{H_2O} are in agreement with the ones described for other lectins.

Lista de Figuras

FIGURA 1: A) REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA AGLUTINAÇÃO PROMOVIDA POR LECTINAS.	7
FIGURA 2: ESTRUTURA TERCIÁRIA DE LECTINA DE LEGUMINOSA.	9
FIGURA 3: REPRESENTAÇÕES ESQUEMÁTICAS DE DIFERENTES TIPOS DE INTERAÇÕES ENCONTRADAS EM LECTINAS DE LEGUMINOSAS.	11
FIGURA 4: FOTOGRAFIAS DE <i>CAMPTOSEMA ELLIPTICUM</i> EM SEU HABITAT NATIVO.	12
FIGURA 5: ETAPAS DA PURIFICAÇÃO DA CAMPTOSEMINA EM SUPERDEX 75.	31
FIGURA 6: CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA EM COLUNA MONO Q.	32
FIGURA 7: ANÁLISE DA PUREZA E ESTADO DE OLIGOMERIZAÇÃO DA CAMPTOSEMINA.	34
FIGURA 8: SEQÜÊNCIA N-TERMINAL DA CAMPTOSEMINA OBTIDA PELO SEQÜENCIAMENTO AUTOMÁTICO.	35
FIGURA 9: SEQÜÊNCIA PRIMÁRIA DE CAMPTOSEMINA MADURA.	35
FIGURA 10: ALINHAMENTO DA SEQÜÊNCIA PRIMÁRIA DA CAMPTOSEMINA COM DUAS LECTINAS DE <i>ROBINIA PSEUDOACACIA</i>	37
FIGURA 11: DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR APARENTE DA CAMPTOSEMINA.	38
FIGURA 12: CURVA EXPERIMENTAL DE ESPALHAMENTO DE RAIOS X DA CAMPTOSEMINA (■), CORRIGIDA PELO EFEITO DE “SMEARING”, E CURVAS DE ESPALHAMENTO DE RAIOS X SIMULADAS DE LOL 1 (-), POLIPEPTÍDEO A (-) E DAM (-). NO DETALHE, O GRÁFICO DE GUINIER.	40
FIGURA 13: FUNÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO DE DISTÂNCIAS.	41
FIGURA 14: SOBREPosição DO MODELO <i>AB INITIO</i> COM A ESTRUTURA QUATERNÁRIA DO POLIPEPTÍDEO A.	43
FIGURA 15: ENSAIO DE ESPECIFICIDADE UTILIZANDO RESINAS DE AFINIDADE.	48
FIGURA 16: ENSAIO DE N-DEGLICOSILAÇÃO.	49
FIGURA 17: A) DESNATURAÇÃO TÉRMICA DA CAMPTOSEMINA.	51
FIGURA 18: A) DESNATURAÇÃO TÉRMICA DA CAMPTOSEMINA EM PRESENÇA DE GUANIDINA.	52
FIGURA 19: DESNATURAÇÃO QUÍMICA DA CAMPTOSEMINA MONITORADA POR DICROÍSMO CIRCULAR.	54
FIGURA 20: DESNATURAÇÃO QUÍMICA DA CAMPTOSEMINA MONITORADA POR FLUORESCÊNCIA INTRÍNSECA.	55
FIGURA 21: CURVA DE REENOVAMENTO QUÍMICO DA CAMPTOSEMINA.	56
FIGURA 22: CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR DA CAMPTOSEMINA NATIVA E REENOVADA EM COLUNA SUPERDEX 200.	57
FIGURA 23: PERFIS DE DESNATURAÇÃO E REVERSIBILIDADE QUÍMICA DA CAMPTOSEMINA ACOMPANHADOS POR FLUORESCÊNCIA.	59
FIGURA 24: COMPARAÇÃO DAS CURVAS DE DESNATURAÇÃO QUÍMICA DE CAMPTOSEMINA POR DICROÍSMO CIRCULAR E FLUORESCÊNCIA.	60
FIGURA 25: FLUORESCÊNCIA EXTRÍNSECA.	63

Lista de Tabelas

TABELA 1: PORCENTAGEM DA RECUPERAÇÃO DE PROTEÍNA, A PARTIR DE SEMENTES DE <i>CAMPTOSEMA ELLIPTICUM</i> , DURANTE A PURIFICAÇÃO DE CAMPTOSEMINA.....	33
TABELA 2: PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS TEÓRICOS CALCULADOS A PARTIR DA SEQÜÊNCIA PRIMÁRIA DA CAMPTOSEMINA MADURA.	36
TABELA 3: PARÂMETROS ESTRUTURAIIS OBTIDOS DAS MEDIDAS DE SAXS, DO MODELOS E DAS SIMULAÇÕES.	41
TABELA 4: ATIVIDADE HEMOAGLUTINANTE DE CAMPTOSEMINA FRENTE HEMÁCIAS HUMANAS. ...	44
TABELA 5: INIBIÇÃO DA ATIVIDADE HEMOAGLUTINANTE DA CAMPTOSEMINA POR CARBOIDRATOS.	46
TABELA 6: TEMPERATURA DE <i>MELTING</i> DE CAMPTOSEMINA, NA PRESENÇA DE GDN-HCL, OBTIDA ATRAVÉS DA TÉCNICA DE DICROÍSMO CIRCULAR.	53
TABELA 7: DESCONVOLUÇÃO DOS ESPECTROS DA CAMPTOSEMINA NATIVA E REENOVELADA.	58
TABELA 8: PARÂMETROS TERMODINÂMICOS DO AJUSTE DOS DADOS DE DESNATURAÇÃO DA CAMPTOSEMINA EM UM MODELO DE DOIS ESTADOS.	62

Lista de Abreviaturas e Siglas

ANS: *1-Anilino-8-Naphthalene Sulfonate*

C. ellipticum: *Camptosema ellipticum*

Ca²⁺: Cálcio

ConA: Lectina de *Canavalia ensiformis*

ConBr: Lectina de *Canavalia brasiliensis*

DAM: Modelo de Átomos Dummy

DBL: Lectina de *Dolichos biflorus*

DGL: Lectina de *Dioclea grandiflora*

DIAB: Lectina de *Dolichos lablab*

ECorL: Lectina de *Erythrina corallodendron*

GDn-HCL: *Guanidina-HCl*

GLLa: Lectina de *Galactia lindenii*

kDa: Quilodalton

m/v: massa/volume

MAL: Lectina de *Maackia amurensis*

Mn²⁺: Manganês

NaCl: Cloreto de Sódio

NMR: *Nuclear Magnetic Resonance*

p.I.: Ponto isoelétrico.

PBS: *Phosphate Buffer Saline*

PDB: *Protein Data Bank*

PHA: Lectina de *Phaseolus vulgaris*

PHAL: Leuco-Lectina de *Phaseolus vulgaris*

PNA: Lectina de Peanut

RIPs: *Ribosome-Inactivating Protein*

SBA: Lectina de *Soy Bean*

SDS-PAGE: *Sodium Dodecylsulphate Polyacrilamide Gel Electrophoresis*

TxLCI: Superlectina isolada do bulbo de tulipas.

UEAII: Lectina de *Ulex europeaus II*

WBA: Lectina de *Winged Bean*

WGA: Lectina de *Wheat Germ*

Sumário

AGRADECIMENTOS.....	3
RESUMO.....	I
ABSTRACT.....	II
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 HISTÓRICO DO ESTUDO DAS LECTINAS.....	2
1.2 DEFINIÇÃO DE LECTINAS.....	3
1.3 DISTRIBUIÇÃO DAS LECTINAS VEGETAIS.....	4
1.4 USOS E FUNÇÕES.....	4
1.5 CLASSIFICAÇÃO DAS LECTINAS VEGETAIS.....	6
1.6 LECTINAS DE LEGUMINOSAS.....	8
1.7 O GÊNERO CAMPTOSEMA.....	11
2 OBJETIVOS.....	13
OBJETIVOS GERAIS.....	14
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
3 METODOLOGIA.....	15
3.1 OBTENÇÃO DA FARINHA E DO EXTRATO BRUTO DE SEMENTES DE CAMPTOSEMA ELLIPTICUM.....	16
3.2 ISOLAMENTO DA LECTINA DE SEMENTES DE CAMPTOSEMA ELLIPTICUM.....	16
3.3 QUANTIFICAÇÃO.....	17
3.4 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA.....	17
3.5 DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR APARENTE POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR.....	17
3.6 ESPALHAMENTO DE RAIOS-X A BAIXO ÂNGULO (SAXS).....	18
3.7. CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA.....	19
3.7.1 Determinação da Seqüência N-Terminal.....	19
3.7.2 Seqüência Primária de Camptosemina e Determinação de Parâmetros Físico-químicos Teóricos.....	20
3.7.3 Atividade Hemoaglutinante de Camptosemina.....	20
3.7.4 Avaliação da Atividade Hemoaglutinante após Desmetalização.....	20
3.7.5 Inibição da Hemoaglutinação por Carboidratos.....	21
3.7.6 Ensaio com Resinas de Afinidade.....	21
3.7.7 N-Deglicosilação.....	22
3.8 ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	22
3.8.1 Ensaio de Atividade Antifúngica.....	22
3.9 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL UTILIZANDO TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS.....	23
3.9.1 Estudos de Estabilidade Térmica.....	23
3.9.2 Estudos de Estabilidade Química.....	24
3.9.3 Ensaio de Reversibilidade Química.....	25
3.9.4 Estabilidade em função do pH analisada por Fluorescência Extrínseca.....	27

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
4.1 ISOLAMENTO DA CAMPTOSEMINA	30
4.2 RENDIMENTO	33
4.3 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA	33
4.4 DETERMINAÇÃO DA SEQÜÊNCIA N- TERMINAL E DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS TEÓRICOS.....	35
4.5 DETERMINAÇÃO DO ESTADO OLIGOMÉRICO.....	37
4.6 ATIVIDADE HEMOAGLUTINANTE DA CAMPTOSEMINA ANTES E APÓS DESMETALIZAÇÃO.....	43
4.7 INIBIÇÃO DA HEMOAGLUTINAÇÃO POR CARBOIDRATOS.....	45
4.8 LIGAÇÃO ÀS RESINAS DE AFINIDADE.....	47
4.9 VERIFICAÇÃO DA PRESENÇA DE CARBOIDRATOS NA ESTRUTURA DA CAMPTOSEMINA	48
4.10 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA.....	50
4.11 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL UTILIZANDO TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS.....	50
4.12 ESTABILIDADE EM FUNÇÃO DO pH ANALISADA POR FLUORESCÊNCIA EXTRÍNSECA.....	63
5 CONCLUSÕES.....	64
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
7 APÊNDICE.....	72

1 Introdução

1.1 Histórico do estudo das lectinas

No final do século XIX surgiram evidências da existência de proteínas capazes de aglutinar hemácias as quais ficaram conhecidas como hemoaglutininas ou fitoaglutininas, devido à origem vegetal (SHARON; LIS, 2004).

A primeira descrição de uma hemoaglutinina foi feita por Peter H. Stillmark em 1888 (STILLMARK, citado por SHARON; LIS, 2004), que isolou uma proteína tóxica de sementes de *Ricinus communis* denominada ricina. H. Hellin, logo após a descrição da ricina, demonstrou a existência de uma aglutinina tóxica em extratos de *Abrus precatorius*, a qual ele denominou abrina. A idéia de que a toxicidade era uma propriedade intrínseca das lectinas foi abandonada após Landsteiner e Ranbitschek (citado por VAN DAMME et al, 1998) demonstrarem pela primeira vez a existência de lectinas não tóxicas, que seguidos de outros relatos, comprovaram ser a toxicidade uma exceção e não uma regra (VAN DAMME et al, 1998).

Utilizando ricina e abrina em estudos imunológicos, Paul Ehrlich estabeleceu na década de 1890 os fundamentos da imunologia (EHRlich, citado por SHARON; LIS, 2004).

A primeira hemoaglutinina completamente purificada foi isolada em 1919 por James B. Sumner (SHARON; LIS, 2004) a partir *Canavalia ensiformis*, e foi denominada concanavalina A (con A). Em 1936 Sumner e Howell (citados por SHARON; LIS, 2004) reportaram que con A era capaz de aglutinar hemácias e fungos além de precipitar glicogênio em solução. Demonstraram ainda que a hemoaglutinação promovida por con A era inibida por sacarose, sendo este o primeiro relato que apontava especificidade desta classe de proteínas. Partiu deles a sugestão de que a reação de hemoaglutinação deveria ser conseqüência da interação da proteína com açúcares existentes na superfície das hemácias (SHARON; LIS, 2004).

Karl Landsteiner, na primeira década de 1900, demonstrou que a atividade hemoaglutinante de extratos de plantas era diferente quando testada frente hemácias de diferentes animais.

Na década de 1940, de maneira independente, Willian C. Boyd e Karl O. Renkonen apresentaram resultados mostrando que algumas hemoaglutininas exibiam preferência por eritrócitos de determinados grupos sanguíneos do sistema ABO (VAN DAMME et al, 1998).

Nos anos de 1950, Walter J. T. Morgan e Winifred M. Watkins demonstraram que a aglutinação de hemácias do tipo A era mais fortemente inibida por α -N-acetil-D-galactosamina enquanto que a hemoaglutinação do tipo O era fortemente inibida por α -L-fucose (WATKINS;

MORGAN, 1952). Com base nestes achados eles concluíram que α -N-acetil-D-galactosamina e α -L-fucose eram os açúcares responsáveis por conferir as especificidades A e O dos grupos sanguíneos, respectivamente (SHARON; LIS, 2004).

Esta foi uma das primeiras evidências da existência de açúcares na superfície das células e da demonstração de seu papel como marcadores celulares.

A habilidade deste conjunto de proteínas em distinguir entre hemácias de diferentes tipos sanguíneos levou Boyd e Shapleigh, em 1954, a denominar tais aglutininas como lectinas, cuja origem vem do Latin “legere” que significa escolher (BOYD; SHAPLEIGH, 1954). Embora o termo lectina tenha sido originalmente introduzido para enfatizar o comportamento de aglutinação seletiva de algumas hemoaglutininas, ele foi depois aplicado a todas as proteínas com atividade hemoaglutinante. Hemoaglutinina é certamente o termo mais apropriado porque se refere à capacidade da proteína aglutinar hemácias porém, não leva em conta o fato de que algumas lectinas são capazes de aglutinar outros tipos celulares. Assim sendo, o termo lectina é o mais comumente utilizado (VAN DAMME et al, 1998).

Em 1960 Peter C. Nowell demonstrou que a lectina PHA de *Phaseolus vulgaris* é mitogênica, ou seja, é capaz de levar linfócitos à mitose.

Aub et al (citado por SHARON; LIS, 2004) demonstraram que WGA (Lectina de *Wheat Germ*) preferencialmente aglutinava células malignas. Seguiram-se diversos outros relatos do mesmo tipo de atividade, presente em outras lectinas, que evidenciaram que mudanças nos açúcares da superfície das células estão associadas ao desenvolvimento de cânceres.

1.2 Definição de Lectinas

Segundo Rüdiger e Gabius (RÜDIGER; GABIUS, 2001), para ser considerada uma lectina, uma proteína precisa satisfazer três critérios:

- Uma lectina é uma (glico)proteína que liga carboidrato: desta forma ficam excluídas todas as outras moléculas capazes de interagir com carboidratos e causar aglutinação celular.
- Lectinas são distintas de imunoglobulinas: no início do estudo das lectinas, elas eram tidas como substâncias tipo anticorpo e isto fazia referência à aparente especificidade de ligação e não à similaridade estrutural. Embora os dois grupos de proteínas tenham

especificidade de ligação, as imunoglobulinas necessitam de estímulo antigênico para serem sintetizadas e isto pôde delimitar as duas classes de proteínas.

- As lectinas não modificam os açúcares aos quais se ligam: assim ficam excluídas todas as enzimas capazes de gerar modificações em carboidratos. Esta é uma importante ressalva uma vez que existem glicosidases capazes de causar aglutinação celular.

1.3 Distribuição das lectinas vegetais

As lectinas são amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em microorganismos, animais e plantas (KENNEDY et al, 1995).

Desde o início do estudo das lectinas, centenas de lectinas de plantas têm sido identificadas, isoladas, caracterizadas e graças a sua disponibilidade e diversidade de ligação a carboidratos, ajudaram a alavancar o campo da glicobiologia.

Embora possam ser encontradas em diversas partes das plantas, são geralmente encontradas em órgãos de estocagem, como por exemplo, em sementes, sendo que a concentração presente pode variar amplamente de uma espécie para outra (RÜDIGER; GABIUS, 2001). Nas células vegetais as lectinas podem ser encontradas em corpos protéicos (ou vacúolos de estocagem) que são pequenos vacúolos que sofreram diferenciação para serem capazes de estocar proteínas durante a maturação da semente e hidrolisá-las durante períodos de crescimento (CHRISPEELS, 1984). Ainda dentro das células, já foram identificadas lectinas que estão presentes no citoplasma, núcleo (VAN DAMME et al, 2004) além de também ocorrerem no espaço intercelular (ETZLER et al, 1984).

1.4 Usos e Funções

A disponibilidade de numerosas lectinas com grande diversidade de especificidade de ligação a carboidratos possibilitou o uso destas proteínas em diversos campos de pesquisa. Elas têm sido usadas na identificação de carboidratos presentes na superfície celular, na tipagem

sangüínea, como agentes mitogênicos, na detecção de alterações celulares durante transformação, na caracterização dos estágios de desenvolvimento de protozoários (KENNEDY et al, 1995).

Embora amplamente empregada em diversas técnicas, a função biológica das lectinas de plantas continua em aberto, existindo especulações sobre o papel fisiológico que elas desempenham na natureza.

A maioria das lectinas pode desempenhar funções no próprio vegetal que a produz como, por exemplo, servir de fator de reconhecimento, participar do estoque de nitrogênio, ter função de defesa, como ainda interagir com glicoconjugados de outros organismos (PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

A busca pelo papel fisiológico das lectinas vegetais está intimamente ligada à identificação de seus receptores naturais, que são definidos como glicoconjugados que apresentam um motivo com estrutura complementar àquela do sítio de ligação da lectina. Com exceção a algumas enzimas, as lectinas são as únicas proteínas de plantas capazes de se ligar à glicoconjugados presentes na superfície de microorganismos ou presentes no trato intestinal de insetos e de animais herbívoros. O fato das lectinas de planta serem capazes de se ligar à glicoconjugados de outros organismos, que não são comumente encontrados ou que estão totalmente ausentes nos vegetais, é o mais forte indício de que elas possuam função de proteção nas plantas que as produzem. Um exemplo a ser citado é o caso das lectinas ligantes de quitina que são capazes de interagir com este carboidrato que é tipicamente encontrado na parede celular de fungos e no exoesqueleto de invertebrados (PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

Outro argumento em favor do papel protetor das lectinas de plantas é sua extrema resistência a condições desfavoráveis tais como extremos de pH, variações térmicas e resistência às proteases animais, lembrando outras proteínas envolvidas em funções de defesa como as Rips, inibidores de proteases, α -Amilase, entre outras. É importante salientar que a presença das lectinas em regiões dos vegetais suscetíveis ao ataque de outros organismos (principalmente órgãos de estocagem e folhas), também contribui para a consolidação da idéia do papel protetor que as lectinas exercem nas plantas (PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

Diferentemente do que é observado com as lectinas de plantas, a maioria das lectinas animais interagem com glicoconjugados endógenos, podendo atuar nos espaços intra ou extracelular, agindo como moléculas sinalizadoras e receptores, sendo fundamentais em processos como o tráfico extracelular de proteínas, a adesão celular e a imunidade inata (VAN

DAMME et al, 2004). Embora só tenham sido encontradas duas lectinas animais homólogas em plantas (DODD; DRICCKAMER, 2001) sua multiplicidade de funções sugere que interações proteína-carboidrato mediadas por lectinas, também sejam fundamentais nos vegetais. O maior impecilho para o desenvolvimento desta teoria é que para a maioria das lectinas de plantas já isoladas, ainda não foram encontrados receptores endógenos. Além disso, ainda que apresentassem especificidade de ligação a glicoconjugados endógenos, dada à localização em corpos protéicos, a maioria das lectinas não tem contato com glicoconjugados presentes no citoplasma, no núcleo ou na superfície celular. Este panorama tem sido alterado com a descoberta da expressão citoplasmática e nuclear de lectinas em resposta a estímulos bióticos e abióticos. A localização e a regulação destas lectinas indicam que as mesmas podem estar envolvidas em processos endógenos das plantas (VAN DAMME et al, 2004).

A família das leguminosas é constituída por plantas capazes de estabelecer uma relação simbiótica em suas raízes, com bactérias do gênero *Rizobium*. Com isto o vegetal pode aproveitar a capacidade de fixação de nitrogênio promovida pela bactéria, na qual o nitrogênio atmosférico é convertido em formas que podem ser aproveitadas para o crescimento vegetal. Uma das possíveis funções fisiológicas atribuída às lectinas, é a de seu envolvimento na associação simbiótica entre as leguminosas e as bactérias responsáveis pela fixação de nitrogênio. Ela é baseada na observação de que as lectinas encontradas em uma determinada leguminosa ligam-se de forma específica e carboidrato dependente à superfície da bactéria do gênero *Rizobium* existente nesta leguminosa, mas não à bactéria simbiote de outra espécie de leguminosa (SHARON; LIS, 2004). Especula-se que as bactérias fixadoras de nitrogênio fixam-se às raízes através de interações entre os carboidratos presentes na superfície celular destas bactérias e lectinas presentes nas raízes das plantas. Esta teoria ficou conhecida como hipótese do reconhecimento por lectinas e ainda é muito controversa, necessitando de mais evidências que comprovem a real necessidade das lectinas para que a relação aconteça (SHARON; LIS, 2004).

1.5 Classificação das lectinas vegetais

Com base na estrutura da lectina madura, as lectinas podem ser divididas em quatro grandes grupos: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas (PEUMANS; VAN DAMME, 1995). As merolectinas apresentam apenas um domínio de ligação a carboidrato, sendo

consideradas monovalentes e não sendo capazes de causar aglutinação celular ou precipitação de glicoconjugados. A heveína, proteína de *Hevea brasiliensis*, é uma típica merolectina (VAN PARIJS et al, 1991). Hololectinas são proteínas que apresentam dois sítios de ligação a carboidratos, os quais são idênticos ou homólogos e capazes de ligar o mesmo carboidrato ou carboidratos estruturalmente similares. Por serem divalentes (dois sítios de ligação) são capazes de causar aglutinação celular ou precipitação de glicoconjugados. A maioria das lectinas de plantas pertence a este grupo. Quimerolectinas são constituídas por um ou mais domínios de ligação a carboidratos e um domínio de função distinta, capaz de agir de forma independente dos sítios de ligação a carboidratos. Dependendo do número de sítios ligantes de carboidratos, as quimerolectinas podem se comportar como merolectinas ou hololectinas. Um exemplo pertencente a esta classe são as Rips tipo 2. Superlectinas, assim como as hololectinas, apresentam ao menos dois sítios de ligação a carboidrato porém, cada sítio reconhece um tipo de carboidrato estruturalmente diferente do outro.

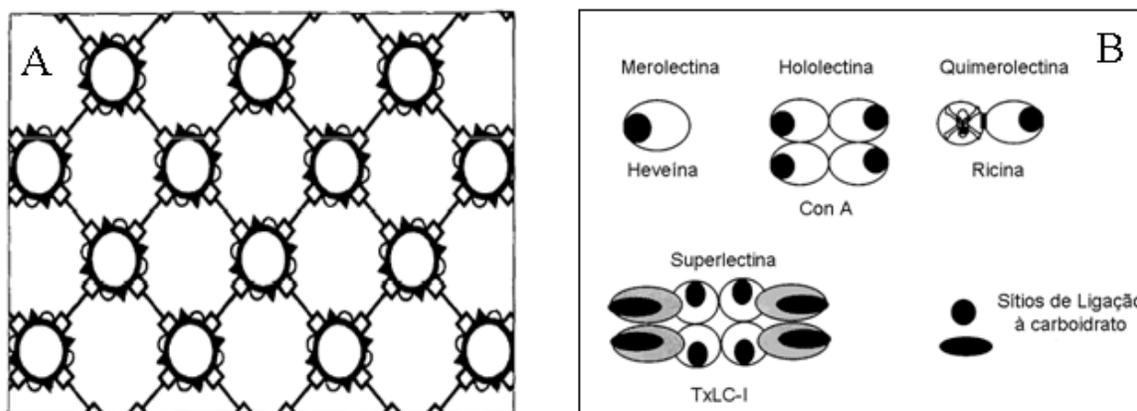


Figura 1: A) Representação esquemática da aglutinação promovida por lectinas. (□—□) lectinas e (□) ligante presente na superfície celular, modificado a partir de (KENNEDY et al, 1995). B) Representação esquemática dos quatro tipos de lectinas de plantas, modificado a partir de VAN DAMME et al, 1998.

De acordo com a especificidade de ligação a carboidratos, as lectinas podem ser divididas em sete classes distintas: lectinas ligantes de manose, manose/glicose, manose/maltose, galactose/N-acetilgalactosamina, N-acetilgalactosamina/ (N-acetilgalactosamina)_n, fucose e ácido siálico (GOLDSTEIN; PORETZ, 1986; VAN DAMME et al, 1998).

Com o progresso da análise estrutural de lectinas assim como da clonagem dos genes que as codificam, obteve-se o conhecimento da seqüência detalhada de dezenas de lectinas. A análise

destas seqüências permitiu a distinção de sete diferentes famílias de lectinas relacionadas evolutivamente. Entre elas, as famílias das lectinas de legumes, das monocotiledôneas ligantes de manose, das lectinas ligantes de quitina e das proteínas inativadoras de ribossomos tipo 2 apresentam o maior número de representantes das lectinas isoladas de plantas. Por outro lado as famílias das lectinas relacionada à jacalina, das amarantinas e das lectinas de floema de Curcubitáceas, são representadas por poucos exemplares.

1.6 Lectinas de Leguminosas

Segundo Sharon e Lis (1990) o termo lectina de legume refere-se às lectinas de plantas que são encontradas exclusivamente em exemplares da família *Leguminosae*. É importante salientar que nem todas as lectinas encontradas nas espécies desta família são denominadas lectinas de legume.

A maioria das lectinas de legume foi isolada de sementes, tendo sido encontradas também, em menor freqüência e concentração, em outros tecidos como folhas, raízes, cascas e nódulos existentes nas raízes. É comum a existência de mais de uma lectina de legume em um mesmo vegetal (VAN DAMME et al, 1998).

Todas as lectinas de legumes são formadas a partir de um monômero de aproximadamente 30 kDa, sendo a maioria deles constituídos por cerca de 250 aminoácidos. Cada subunidade das lectinas de legume apresenta os íons Mn^{2+} e Ca^{2+} , que são considerados essenciais para a atividade de ligação a carboidrato da lectina, sendo os sítios responsáveis pela ligação destes cátions, altamente conservados entres as lectinas de legumes. As lectinas pertencentes a esta classe podem ser glicosiladas, apresentando uma ou duas cadeias de açúcares covalentemente ligadas à cadeia lectínica (VAN DAMME et al, 1998).

Apesar das similaridades em suas características físico-químicas e seqüências primárias, as lectinas de legumes apresentam grande diversidade de especificidade de ligação a carboidratos, já tendo sido identificadas lectinas com especificidade para glicose, manose, galactose, N-acetil-D-glicosamina, N-acetil-D-galactosamina, fucose e oligossacarídeos complexos (DAM et al, 1998; RÜDIGER; GABIUS, 2001).

As lectinas de legume constituem uma grande família de proteínas homólogas, cujas seqüências determinadas mostram alto grau de homologia entre si. O alto grau de conservação da estrutura primária destas proteínas favorece também a conservação da estrutura terciária dos monômeros que constituem as lectinas de legume (LORIS et al, 1998).

As lectinas de legume são fundamentalmente constituídas por folhas β , sendo o monômero constituído por três folhas beta antiparalelas, conectadas por uma série de “loops”, formando uma estrutura conhecida como motivo “jelly roll”. Nesta estrutura, existe uma folha β composta por seis fitas antiparalelas estendidas, denominada de folha- β posterior; uma folha composta por sete fitas antiparalelas curvadas, denominada folha- β frontal; e uma pequena folha beta com cinco fitas antiparalelas que fica situada no topo da estrutura e que desempenha importante papel na união das outras duas folhas (CHANDRA; VIJAYAN, 1999; BRINDA et al, 2004). Os monômeros apresentam ainda resíduos hidrofóbicos conservados, responsáveis pela formação de uma cavidade hidrofóbica que é um possível sítio de interação com hormônio vegetal (VAN DAMME et al, 1998).

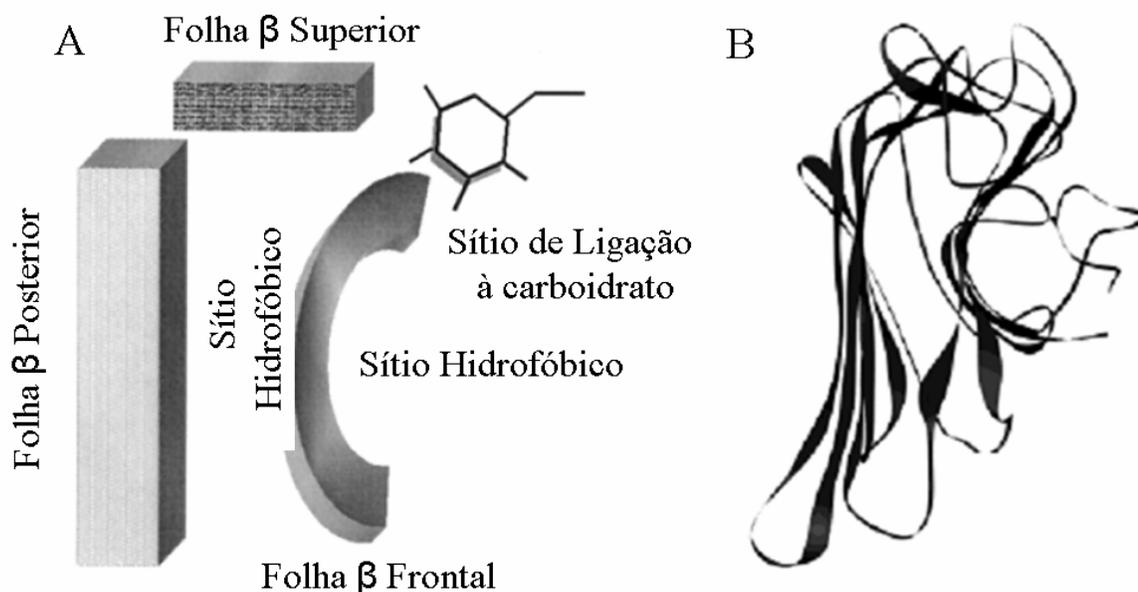


Figura 2: Estrutura Terciária de Lectina de Leguminosa. A) Representação esquemática do monômero de lectina de leguminosa em termos de folhas β (Modificado a partir de CHANDRA et al, 2001). B) Estrutura tridimensional do monômero de con A, mostrando o motivo “jelly-roll” (Modificado a partir de MITRA et al, 2002).

A maioria das lectinas de legume existe como homodímeros ou homotetrâmeros, sendo os últimos considerados dímeros de dímeros (BRINDA et al, 2004). Embora as lectinas de legume sejam constituídas por monômeros cuja estrutura terciária seja similar (caracterizada como motivo “jelly roll”), as formas de organização da estrutura quaternária são muito distintas (BRINDA et al, 2004).

Já foram descritos oito formas de associação quaternária em lectinas de legume que ocorrem através de associações variadas entre as folhas β estendidas da região posterior dos monômeros. Os modos denominados canônico, ECorL, GS4, DB58 são diméricos enquanto que os modos DBL, Con A, PNS, GS1 são tetraméricos (BRINDA et al, 2004). Os oito tipos de estruturas quaternárias são constituídas por sete tipos de interfaces diméricas, Tipo II, X1, X2, X3 (esta última conhecida como “hand-shake”), X4 (conhecida como “back to back”), PNA e GS1 (ambas encontradas apenas em suas respectivas lectinas e por isso consideradas incomuns). O modo de dimerização mais comum é denominado canônico e se dá através do arranjo das folhas β posteriores, formando uma estrutura contínua de doze folhas estendidas, enquanto que as outras formas de associação acontecem através da sobreposição das folhas β posteriores de cada monômero envolvido (BRINDA et al, 2004). Mais raramente, a associação pode se dar através das folhas β superiores dos monômeros, das regiões de “loops” ou através de hélices existentes entre dois monômeros (BRINDA et al, 2004).

As lectinas de legume podem interagir com carboidratos simples (monossacarídeos) ou complexos (WEIS; DRICKAMER, 1996). A interação com carboidratos simples e seus derivados, responsável pela especificidade de ligação da lectina, depende da existência de sítios de ligação na superfície do monômero da lectina (VAN DAMME et al, 1998). Estes sítios são formados por quatro “loops” existentes na região superior do monômero (VIJAYAN; CHANDRA, 1999). A interação com açúcares complexos permite que lectinas com mesma especificidade por açúcares simples sejam discriminadas. Os sítios responsáveis pela ligação a tais açúcares compreendem, além do sítio de ligação a monossacarídeos, um conjunto de resíduos adjacentes presentes na superfície da lectina capaz de interagir com os açúcares complexos (VAN DAMME et al, 1998).

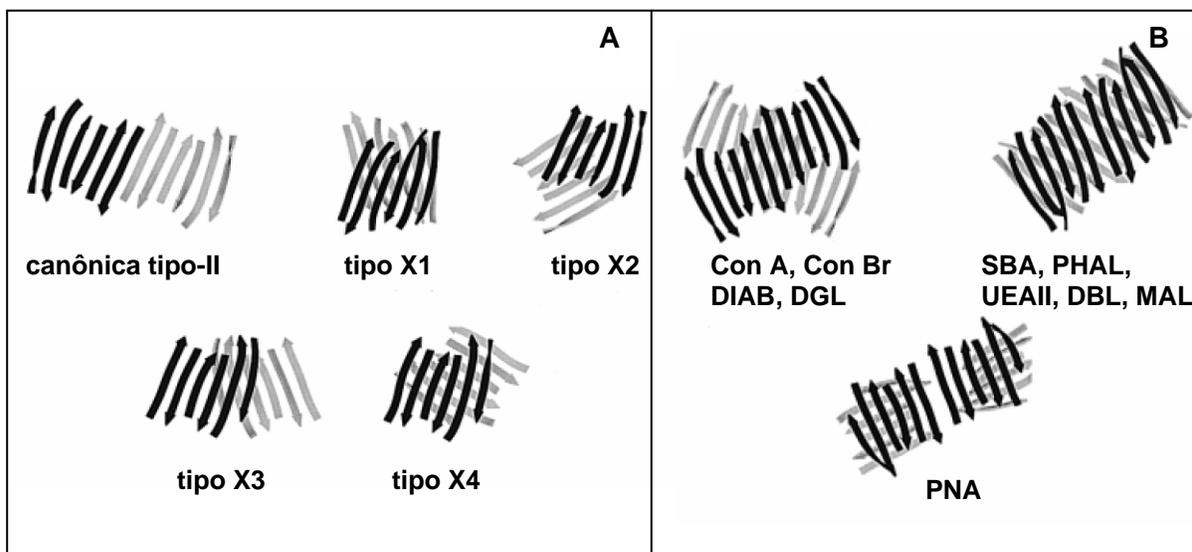


Figura 3: Representações esquemáticas de diferentes tipos de interações encontradas em lectinas de leguminosas. A) Representações das folhas- β das costas envolvidas nos diferentes tipos de interfaces diméricas das lectinas de leguminosas. A folha- β das costas de cada monômero é identificada por cores diferentes. B) Representações das folhas- β das costas em lectinas de leguminosas tetraméricas. Subunidades 1 e 2 que formam interfaces canônicas tipo-II, são mostradas em preto. Subunidades 3 e 4 estão em cinza. Lectinas tetraméricas esquematizadas: *Canavalia ensiformis* - concanavalina A (Con A), *C. brasiliensis* (Con Br), *Dolichos lablab* (DIAB), *Dioclea grandiflora* (DGL), *Glycine max* - Soy bean agglutinin (SBA), *Phaseolus vulgaris* (PHAL), *Ulex europaeus* (UEAI), *Dolichos biflorus* (DBL), *Maackia amurensis* (MAL), *Arachis hypogea* - Peanut Agglutinin (PNA). Modificado a partir de MANOJ; SUGUNA, 2001.

É importante salientar que uma característica que parece comum a todas as lectinas de legume é a capacidade intrínseca do monômero de ligar-se ao carboidrato, sendo que a oligomerização atribui à molécula o refinamento da especificidade, necessária para a atividade biológica, além de conferir estabilidade à macromolécula.

1.7 O gênero *Camptosema*

A família das leguminosas (Leguminosae) recebeu este nome devido o fruto presente na maioria das espécies que a representam, sendo considerada uma das maiores do reino vegetal, com ampla distribuição mundial, compreendendo 650 gêneros e mais de 18.000 espécies. A tribo Phaseoleae é a que apresenta o maior número de exemplares e a maior importância econômica, sendo dividida em oito subtribos, entre elas a Diocleinae, na qual o gênero *Camptosema* está inserido (VARELA et al, 2004).

A subtribo Diocleinae é representada, na sua maior parte, por plantas com hábito geralmente lenhoso, flores largas, com discos proeminentes ao redor do ovário, hilo geralmente longo e presença do aminoácido não-protéico canavanina (LACKEY, 1981).

A lectina em estudo neste trabalho foi isolada a partir de sementes extraídas de *Camptosema ellipticum* cujos exemplares foram obtidos em uma região de cerrado no município de São Carlos, estado de São Paulo (BR).



Figura 4: Fotografias de *Camptosema ellipticum* em seu habitat nativo.

Estudos prévios, realizados por Goto (2007) indicam que camptosemina é uma proteína extremamente resistente, capaz de promover adesão de células MDA-MB-231. Neste trabalho são apresentados o isolamento da camptosemina, sua caracterização bioquímica e com relação aos seus açúcares ligantes, além de estudos referentes ao estado de oligomerização e sua estabilidade estrutural frente à desnaturação térmica e química.

2 Objetivos

Objetivos gerais

O objetivo geral do presente trabalho foi caracterizar bioquímica e espectroscopicamente uma lectina de sementes de *Camptosema ellipticum*.

Objetivos específicos

- ✚ Extrair e purificar camptosemina a partir de sementes de *Camptosema ellipticum*;
- ✚ Caracterizar a camptosemina quanto a massa molecular, grau de oligomerização e ponto isoelétrico;
- ✚ Determinar seus açúcares ligantes;
- ✚ Avaliar sua potencial atividade antifúngica;
- ✚ Caracterizar a lectina purificada por técnicas de Dicroísmo Circular e Fluorescência, determinando os parâmetros termodinâmicos envolvidos no processo de desnaturação;
- ✚ Avaliar sua capacidade de reenovelamento após desnaturação química.

3 Metodologia

3.1 Obtenção da Farinha e do Extrato Bruto de Sementes de *Camptosema ellipticum*.

As sementes de *C. ellipticum* foram coletadas em uma região de cerrado no município de São Carlos (coordenadas geodésicas S 21°54'52.6' e W47°48'57.5''), estado de São Paulo, Brasil. A identificação botânica da espécie foi realizada no Instituto de Botânica estado de São Paulo, Brasil. A farinha foi obtida a partir da trituração com Nitrogênio líquido, em almofariz, das sementes livres do tegumento.

A extração das proteínas solúveis das sementes de *C. ellipticum* foi realizada através da suspensão da farinha em tampão PBS (NaCl 0,15 M, pH 7,4), na proporção 2:10 (m/v), sob agitação por 2 horas em geladeira. A suspensão obtida foi centrifugada a 12.000 xg por 20 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi então filtrado em papel de filtro comum e armazenado em frascos fechados a -20 °C.

3.2 Isolamento da Lectina de Sementes de *Camptosema ellipticum*.

A lectina de *C. ellipticum* foi obtida através de 4 etapas cromatográficas. O extrato bruto foi submetido à Cromatografia de Exclusão Molecular em coluna Superdex 75 10/300 GL (Amersham Biosciences) acoplada a um *ÄKTA purifier system* (Amersham Pharmacia Biotech), pré-equilibrada com tampão PBS (NaCl 0,15 M, pH 7,4). As frações 13 a 23 foram concentradas em Centriprep (10 kDa Amicon) e recromatografadas, nas mesmas condições, e foram coletadas as frações 16 a 22. Após concentração destas em Centriprep (10 kDa Amicon), as mesmas foram recromatografadas na mesma coluna equilibrada com tampão PBS-Lactose (NaCl 0,15 M, Lactose 0,2 M, pH 7,4) e as frações 11 a 16 foram coletadas. O sal e a lactose destas frações foram retirados através da lavagem das mesmas em Centriprep (10 kDa, Amicon) com Tampão Tris 20 mM, pH 8,0 e elas então foram submetidas à Cromatografia de Troca Iônica em coluna Mono Q 5/50 GL (Amersham Biosciences), equilibrada com tampão Tris 20 mM, pH 8,0. A eluição foi feita sob um gradiente crescente de sal formado pela mistura do tampão de Equilíbrio e de tampão Tris 20 mM, NaCl 0,5 M, pH 8,0. Foram coletadas as frações 9 à 13, contendo a lectina de interesse denominada camptosemina.

3.3 Quantificação

A determinação da concentração de proteínas, durante a purificação de camptosemina, foi feita utilizando o BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford). O método baseia-se na reação de Cu^{2+} com proteínas, em meio alcalino, produzindo Cu^{1+} , que reage com o BCA, formado um complexo de coloração roxa, que absorve fortemente na região de 562 nm. A curva de calibração foi construída utilizando a proteína BSA.

As demais determinações foram realizadas baseadas no $\epsilon_{280 \text{ nm}}$ teórico de camptosemina.

3.4 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

A eletroforese da camptosemina foi realizada de acordo com o método proposto por LAEMMLI (1970), utilizando um sistema *Gibco BRL Vertical Gel Electrophoresis Apparatus*. A 20 μL das amostras de camptosemina (38 μM) foram adicionados 10 μL de tampão contendo Tris-HCl 0,0625 M pH 6,8, Glicerol a 10 % e SDS a 2 % e corante Azul de Bromofenol a 0,003 %, na presença e ausência de β -mercaptoetanol, submetidas ou não à fervura por 10 minutos. O tampão de corrida foi preparado com Tris 0,025 M, Glicina 0,192 M e SDS 0,1 %, pH 8,3 sendo as corridas realizadas a 120 V, 44 mA por aproximadamente 2 horas. O gel foi corado com solução contendo Coomassie Brilliant Blue 250 R a 0,2 % em Metanol, Ácido Acético e água (5:1:4) e descorados em solução contendo Ácido Acético 7 %. Os marcadores de massa molecular utilizados foram Albumina Sérica Bovina (66 kDa), Ovalbumina (45 kDa), Anidrase Carbônica (30 kDa) Inibidor de Tripsina de Soja (20 kDa) e Citocromo C (12 kDa). (Sigma-Aldrich).

3.5 Determinação da Massa Molecular Aparente por Cromatografia de Exclusão Molecular.

A Massa Molecular Aparente da lectina foi determinada utilizando-se uma coluna Superdex 200 10/300 GL (Amersham Biosciences) acoplada a um *AKTA purifier system* (Amersham Pharmacia Biotech), equilibrada com tampão Tris 20 mM, 0,2 M Lactose, 0,3 M

NaCl pH 8,0. Camptosemina na concentração de 6,0 μM foi aplicada à coluna e seu volume de eluição foi comparado ao volume de eluição dos padrões de massa molecular.

Os padrões de Massa utilizados foram β - Amilase (200 kDa), Álcool Desidrogenase (150 kDa), Albumina Sérica Bovina (66 kDa), Anidrase Carbônica (30 kDa) e Citocromo C (12kDa) (Sigma-Aldrich), eluídos em mesmo tampão.

A construção da curva de calibração foi realizada através de um gráfico de log PM (dos padrões utilizados) x K_{av} , onde K_{av} foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o},$$

onde V_e = volume de eluição, V_o = volume correspondente ao *void* da coluna e V_t = volume total da coluna utilizada.

3.6 Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo (SAXS).

Amostras de camptosemina nas concentrações de 54 μM e 322 μM foram preparadas em tampão Tris 20 mM, NaCl 20 mM, pH 8,0.

Os dados de SAXS das amostras foram coletados na linha de SAXS do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas, Brasil) utilizando comprimento de onda $\lambda=1,488$ Å, detector unidimensional (1D) sensível à posição e distância amostra-detector de 1031,5 mm. Desta maneira foi possível cobrir um momento de transferência entre $0,36 \text{ nm}^{-1} < q < 2,3 \text{ nm}^{-1}$ ($q=4\pi\text{sen}\theta/\lambda$, onde 2θ é o ângulo entre o feixe incidente e espalhado).

As curvas de espalhamento da solução de proteína e do tampão foram coletadas em 20 medidas de 100 segundos para monitoramento dos possíveis danos causados pela radiação à amostra, além da estabilidade do feixe. A análise sistemática dos dados foi realizada normalizando-os pela intensidade do feixe incidente e multiplicando-os pela absorção da amostra. O espalhamento da solução tampão foi subtraído da curva de espalhamento da solução de proteína e a diferença foi normalizada pela concentração protéica e pela resposta não homogênea do detector. Utilizando o método de Transformada Inversa de Fourier implementado pelo programa GNOM (SVERGUN; SEMENYUK, 1991) se obteve a função de distribuição de distâncias ($p(r)$) e o raio de giro (R_g). O efeito de “*smearing*”, referente à altura de 8 mm da janela de entrada do detector também foi corrigido utilizando o programa.

A resolução da curva de espalhamento de raios-X resultante foi de aproximadamente 2,73 nm. O modelo de baixa resolução foi gerado utilizando procedimento *ab initio* implementado no programa Gasbor (SVERGUN; PETOUKHOV; KOCH, 2001). Neste programa um modelo de átomos *dummy* (DAM) é gerado com uma cadeia aleatória de C_{α} , o modelo é enovelado de forma a minimizar a discrepância χ entre a $p(r)$ calculada do modelo e a $p(r)$ dos dados experimentais. O programa simula a estrutura interna da proteína, não sendo necessário subtrair o valor de intensidade da constante de Porod (1982). Diversos parâmetros iniciais para a determinação de envelope *ab initio* levaram a resultados consistentes, com similaridades estruturais entre os modelos finais. O modelo final foi realizado utilizando 740 átomos *dummy* e 611 resíduos de água na parte assimétrica da molécula, assumindo simetria P22. Os valores de R_g , D_{max} , e a curva de espalhamento simulada do DAM, foram calculados utilizando o programa Crysol (SVERGUN; BARBERATO; KOCH, 1995). As discrepâncias entre o DAM e os dados experimentais foram calculadas também por este programa.

Os valores de R_g , D_{max} , e a curva de espalhamento simulada das coordenadas atômicas do Polipeptídeo A da RPbAI e de LOL I resolvidas através da cristalografia, também foram calculados utilizando o programa Crysol, assim como as discrepâncias entre os modelos cristalográficos e os dados experimentais.

3.7. Caracterização Bioquímica

3.7.1 Determinação da Seqüência N-Terminal.

Para a determinação da seqüência N-terminal, uma alíquota contendo entre 200 e 300 pmol da lectina purificada, foi ressuspensa em água e Sequa-Brene (Sigma-Aldrich) e aplicada em um disco de fibra de vidro especial (Wako, Osaka, Japão), tratado previamente com Sequa-Brene. A análise da seqüência N-terminal foi executada pela degradação de Edman automatizada em um seqüenciador de proteína Shimadzu PPSQ-23A, seguindo as recomendações do fabricante. Esse experimento foi realizado sob supervisão da Profa. Heloísa S. Selistre de Araújo, na UFSCar.

3.7.2 Seqüência Primária de Camptosemina e Determinação de Parâmetros Físico-químicos Teóricos.

Os parâmetros teóricos foram obtidos através do programa Prot Param (<<http://ca.expasy.org/tools/protparam.html>>), através da seqüência de aminoácidos deduzida da clonagem do cDNA, pelo Dr. Leandro Seiji Goto (GOTO, 2007), realizada com base na seqüência aminoterminal obtida neste trabalho.

3.7.3 Atividade Hemoaglutinante de Camptosemina.

A atividade hemoaglutinante da camptosemina foi testada, frente hemácias dos quatro tipos sangüíneos (O, A, B e AB), em placa de 96 poços com volume final por poço de 100 μ L, sendo 50 μ L de uma suspensão 2 % de hemácias humanas previamente lavadas 3 vezes em tampão PBS (NaCl 0,15 M, pH 7,4) e 50 μ L de uma diluição dupla seriada de camptosemina (concentração inicial de 4,5 μ M) em tampão PBS. A placa foi incubada à temperatura ambiente por 2 horas e a hemoaglutinação foi avaliada visualmente. Como controle negativo foram utilizados 50 μ L de uma suspensão 2 % de hemácias e 50 μ L de tampão PBS.

3.7.4 Avaliação da Atividade Hemoaglutinante após Desmetalização.

No intuito de observar a presença de metais na estrutura de camptosemina, a proteína purificada (24 μ M) foi dialisada durante 48 horas contra 10 mM de EGTA em tampão Glicina pH 3,0 para remoção dos possíveis metais ligados à mesma. A proteína obtida, denominada apo-camptosemina, foi então dialisada por 24 hs contra tampão Tris 20 mM, NaCl 50 mM, pH 8,0 e a atividade hemoaglutinante da proteína foi testada frente hemácias do tipo O (modificado a partir de SHERRY; BUCK; PETERSON, 1978). Para tal, 25 μ L da solução de apo-camptosemina e 25 μ L de uma suspensão 2 % de hemácias foram incubados, a temperatura ambiente por 2 horas, sendo a hemoaglutinação avaliada visualmente. Como controle positivo foram utilizados 25 μ L de camptosemina não-tratada com a solução de EGTA (em tampão Tris 20 mM, NaCl 50 mM,

pH 8,0) e 25 μ L de uma suspensão 2 % de hemácias. Como controle negativo foram utilizados 25 μ L de tampão PBS e 25 μ L de uma suspensão 2 % de hemácias. O mesmo ensaio foi realizado utilizando EDTA como agente quelante.

3.7.5 Inibição da Hemoaglutinação por Carboidratos.

A inibição da hemoaglutinação por diversos carboidratos (cujas concentrações iniciais foram: Sacarose 1,0 M, Maltose 1,0 M, Lactose 0,5 M, Galactose 1,0 M, Melibiose 0,5 M, Metil- α -D-galactopiranosídeo 1,0 M, N-acetil-D-Galactosamina 1,0 M) foi testada com a finalidade de determinar a especificidade da lectina. O ensaio foi realizado em placa de 96 poços com volume final por poço de 100 μ L, sendo 25 μ L de uma diluição dupla seriada do açúcar a ser testado, 25 μ L de camptosemina (3,0 μ M) incubados por 30 minutos com posterior adição de 50 μ L de uma suspensão 2 % de hemácias do tipo O. A placa foi incubada à temperatura ambiente por 2 horas e a inibição da hemoaglutinação foi avaliada visualmente. Como controle positivo foram utilizados 50 μ L de uma suspensão 2% de hemácias e 50 μ L de tampão PBS.

3.7.6 Ensaio com Resinas de Afinidade

A ligação da camptosemina a Lactose e N-Acetil-D-Galactosamina foi testada através da inibição da ligação da proteína a 2 resinas de afinidades contendo os carboidratos imobilizados (α -Lactose-Agarose e N-Acetil-D-Galactosamina-Agarose, respectivamente). A camptosemina foi aliqüotada em eppendorfs, cada um contendo 200 μ g de proteína, numerados de 1 a 4 sendo que o número 1 continha apenas a proteína (controle negativo de inibição), enquanto nos números 2, 3 e 4 foram acrescentados 2, 4 e 10 mM do carboidrato desejado, respectivamente. As amostras foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente sob agitação. Concomitantemente, cada resina foi aliqüotada, separadamente, em 4 eppendorfs (20 μ L/ eppendorf) e lavada 3 vezes com tampão Tris 20mM, NaCl 20mM, pH 8,0, o mesmo no qual a proteína e os carboidratos foram diluídos. Após a incubação das amostras, elas foram adicionadas às resinas e incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente sob agitação. As amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 16.000 xg e o sobrenadante foi separado da resina. As resinas

foram ressuspensas em 10 μ L de tampão contendo β -mercaptoetanol (Tris-HCl 0,0625 M pH 6,8, Glicerol a 10 % e SDS, 2 % e corante Azul de Bromofenol a 0,003 %), fervidas por 10 minutos e submetidas a SDS-PAGE. O gel foi corado com Nitrato de Prata.

3.7.7 N-Deglicosilação

Foi realizado um ensaio de N-Deglicosilação de camptosemina, utilizando o *GlycoProfile II, Enzymatic In-Solution N-Deglycosylation Kit* (Sigma), com o intuito de determinar a possível existência de carboidratos associados à proteína. Foram utilizados 29 μ M da camptosemina em tampão Tris 20 mM e NaCl 50 mM pH 8,0, tanto com a proteína desnaturada como nativa, seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante. A 20 μ L de cada amostra ou controle, foram adicionados 10 μ L tampão contendo β -mercaptoetanol (Tris-HCl 0,0625 M pH 6,8, Glicerol a 10 % e SDS a 2 % e corante Azul de Bromofenol a 0.003 %), com posterior fervura por 10 minutos, seguido de SDS-PAGE, sendo o gel corado com *Coomassie Brilliant Blue*.

3.8 Atividade Biológica

3.8.1 Ensaio de Atividade Antifúngica

Para avaliação da possível atividade antifúngica da lectina de *Camptosema ellipticum*, dois protocolos foram utilizados. O primeiro foi realizado em placas de Petri com meio Ágar-Batata sólido, cada uma possuindo no centro um pequeno fragmento de meio de cultura contendo o fungo desejado e três discos de papel de filtro estéreis, dispostos nas bordas da placa, contendo respectivamente tampão da solução da camptosemina (Tris 20 mM e NaCl 50 mM, pH 8,0), camptosemina 42 μ M e camptosemina 21 μ M. As placas foram incubadas a 37°C de 4 a 7 dias. As espécies utilizadas neste protocolo foram *Colletotrichum lindemuthianum*, *Colletotrichum musae*, *Colletotrichum truncatum*, *Aspergillus chevalier*, *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium pollidoroseum*, *Fusarium oxysporum*, *Mucor sp*, *Thielaviopsis paradoxa*, *Phomopsis sp*, *Phythium oligandrum*, *Lasiodiplodia theobromae* e *Rhizoetoria solani*.

O segundo protocolo foi realizado em placa de 96 poços com volume final por poço de 160 μL , sendo 100 μL de uma diluição dupla seriada de camptosemina (concentração inicial de 40 μM em tampão Tris 20 mM + 50 mM NaCl, pH 8.0), 50 μL de meio Ágar-Batata líquido e 10 μL de solução de esporos (contendo 4.10^6 esporos/mL em água). As espécies utilizadas neste protocolo foram: *Aspergillus niger*, *Thielaviopsis paradoxa* e *Colletotrichum truncatum*. Com a finalidade de testar uma concentração maior da proteína, o primeiro poço ensaiado para cada espécie apresentou volume final de 85 μL , sendo 50 μL da solução de camptosemina, 25 μL de meio Ágar-Batata líquido e 10 μL da solução de esporos. Foi utilizado um controle do crescimento dos fungos contendo 100 μL da solução tampão, 50 μL de meio de cultura e 10 μL da solução de esporos. Outro controle, utilizado para avaliar a atividade do tampão da proteína, continha 25 μL de meio de cultura, 10 μL da solução de esporos e 50 μL da solução de camptosemina desnaturada (por fervura por 15 minutos). A placa foi incubada a 37°C em estufa por 7 a 10 dias. Os ensaios foram realizados em duplicata.

3.9 Caracterização Estrutural utilizando Técnicas Espectroscópicas

Todos os ensaios abaixo descritos foram realizados com soluções de proteína e de Guanidina-HCl em tampão Tris 20 mM pH 8,0, contendo 20 mM NaCl.

3.9.1 Estudos de Estabilidade Térmica

Dois protocolos foram realizados a fim de determinar a estabilidade térmica de camptosemina.

No primeiro, 9 μM de solução de camptosemina foram submetidos a aquecimento. A desnaturação foi monitorada por far-UV CD em um espectropolarímetro Jasco J715 (JASCO Corporation, Japão) equipado com sistema de controle de temperatura (Peltier). Os espectros foram monitorados num intervalo de 250 a 200 nm, com média de 16 acumulações, largura da banda de 1 nm, tempo de resposta de 0,5 s, velocidade de varredura de 100 nm/min, utilizando-se uma cubeta retangular de quartzo de 1 mm de caminho óptico e aquecimento gradual de 5 em 5 °C no intervalo de 20 a 95 °C (293-368 K).

No segundo protocolo, a camptosemina foi diluída em 210 μL de solução de Guanidina-HCl 1,5 M para atingir concentrações finais após diluição de 4,5 μM , 9 μM e 19,5 μM . As misturas foram incubadas por 2 horas e submetidas a aquecimento. A desnaturação térmica foi monitorada como no protocolo anterior, utilizando aquecimento gradual de 5 em 5 $^{\circ}\text{C}$, de 20 a 95 $^{\circ}\text{C}$ (293-368 K), num intervalo de 250 a 208 nm. Tanto em presença como na ausência de Guanidina-HCl a desnaturação foi acompanhada pela mudança na elipsidade em 220 nm, induzida pelo aumento da temperatura. O branco foi subtraído em todas as medidas e os ensaios foram realizados em triplicata.

3.9.2 Estudos de Estabilidade Química

Os ensaios de estabilidade química utilizaram Guanidina-HCl, um agente caotrópico, como desnaturante.

3.9.2.1 Dicroísmo Circular

Nos ensaios de desnaturação química, camptosemina foi diluída com solução contendo Guanidina-HCl em concentrações finais que variaram de 0 a 8 M do agente caotrópico. Os ensaios foram realizados com camptosemina nas concentrações finais de 9 μM e 19,5 μM . As amostras foram incubadas por duas horas a temperatura ambiente e seus espectros foram monitorados, por far-UV CD, em um espectropolarímetro Jasco J715 (JASCO Corporation, em um intervalo de 250 a 195 nm, a 20 $^{\circ}\text{C}$, nas mesmas condições dos ensaios de estabilidade térmica. A fim de descontar a influência do meio no qual a proteína estava diluída, para cada concentração de Guanidina-HCl utilizada, foi preparado um branco correspondente com 40 μL de tampão da proteína e 210 μL de solução de Guanidina-HCl cujos espectros foram subtraídos daqueles realizados em presença da proteína. A desnaturação foi acompanhada pela mudança na elipsidade em 220 nm induzida pelo aumento na concentração da Guanidina-HCl. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.9.2.2 Fluorescência

Nos ensaios de desnaturação química, camptosemina foi diluída com solução contendo Guanidina-HCl em concentrações que variaram de 0 a 8 M do agente caotrópico. Os ensaios foram realizados com camptosemina nas concentrações finais de 4,5 μM e 10 μM . As amostras foram incubadas por duas horas a temperatura ambiente. Seus espectros de fluorescência intrínseca foram obtidos em um espectrofluorímetro ISS K2 (ISS, IL, USA), modo estático, equipado com sistema circulador refrigerado (Neslab RTE-210), a 22 °C, utilizando-se cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico, com comprimento de onda de excitação de 295 nm e intervalo de emissão de 300 a 400 nm. Nos ensaios foram utilizadas fendas de excitação e emissão de 2 mm e filtro WG 320 (para eliminar possíveis radiações espalhadas). A desnaturação foi monitorada através do centro de massa, expressa em termos da fração de proteínas desnaturadas, em função da concentração de Guanidina-HCl em mesmo tampão. O centro de massa (comprimento de onda de emissão médio, λ_{CM}) foi calculado de acordo com a seguinte equação (BOTELHO et al, 2003):

$$\lambda_{CM} = \sum \lambda I(\lambda) / \sum I(\lambda)$$

onde λ é o comprimento de onda de emissão e $I(\lambda)$ representa a intensidade da emissão no comprimento de onda λ .

Como nos ensaios de CD, para cada concentração de Guanidina-HCl utilizada, foi preparado um branco correspondente com 400 μL de solução de Guanidina-HCl cujos espectros foram subtraídos daqueles realizados em presença da proteína. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.9.3 Ensaios de Reversibilidade Química

3.9.3.1 Ensaio Preliminar

Soluções contendo camptosemina e 7 M de Guanidina-HCl, foram misturadas e incubadas por 30 minutos, à temperatura ambiente, para que ocorresse a desnaturação. As amostras

desnaturadas foram cuidadosamente diluídas, para uma concentração final de proteína de 5 μM , em tampão Tris 20 mM, 20 mM NaCl pH 8,0, de modo que as concentrações finais de Guanidina-HCl fossem entre 0,48 M e 6,64 M, permanecendo incubadas *overnight*. Os espectros de fluorescência intrínseca foram obtidos em um espectrofluorímetro ISS K2 (ISS, IL, USA), modo estático, equipado com sistema circulador refrigerado (Neslab RTE-210), a 22 °C, utilizando-se cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico, com comprimento de onda de excitação de 295 nm e intervalo de emissão de 300 a 400 nm. Nos ensaios foram utilizadas fendas de excitação e emissão de 2 mm e filtro WG 320. O branco foi subtraído em todas as medidas e os ensaios foram realizados em duplicata.

3.9.3.2 Cromatografia de Exclusão Molecular.

Para a observação do estado de oligomerização da proteína reenovada, após desnaturação química com Guanidina-HCl, 500 μL de uma solução de camptosemina 104,5 μM foram incubados com solução de Guanidina-HCl obtendo-se a concentração final do agente caotrópico de 6 M. A amostra foi então incubada por 30 minutos a temperatura ambiente, e diluída em tampão Tris 20 mM, 20 mM NaCl pH 8,0, atingindo o volume de 30 mL. A solução foi incubada *overnight*, a temperatura ambiente, e concentrada posteriormente em Centriprep (10 kDa Amicon) até atingir o mesmo volume inicial. A amostra foi submetida à Cromatografia de Exclusão Molecular em coluna Superdex 200 10/300 GL (Amersham Biosciences) acoplada a um *ÅKTA purifier system* (Amersham Pharmacia Biotech), equilibrada com tampão Tris 20 mM, 0,2 M Lactose, 0,3 M NaCl pH 8,0 mM. Foi eluída também uma amostra de 500 μL de camptosemina 150 μM em tampão Tris 20 mM, 20 mM NaCl pH 8,0, nas mesmas condições da proteína após reenovamento. As frações correspondentes a eluição da proteína reenovada foram divididas em *pools* denominados FR 11-13, FR 15-17 e FR 18-20, sendo que a eluição do pool FR 15-17 ocorreu na mesma posição da proteína nativa, sendo este denominado FR 15-17 nativa. Cada *pool* foi dividido em duas alíquotas sendo que uma foi dialisada contra tampão PBS (NaCl 0,15 M, pH 7,4) por 48 hs e posteriormente concentrada em Microcon (10 kDa Amicon) para realização de ensaios de atividade hemoaglutinante, enquanto a outra alíquota foi

concentrada até atingir densidade óptica de 0.2 em 280 nm (6,0 μ M), para realização das medidas espectroscópicas.

3.9.3.3 Dicroísmo Circular

O pool constituído pelas frações 15-17, assim como a proteína nativa, foram submetidos a medidas de dicroísmo circular, nas mesmas condições já descritas anteriormente.

3.9.3.4 Fluorescência Intrínseca

Assim como realizado para dicroísmo circular, o pool constituído pelas frações 15-17, assim como a proteína nativa, foram analisados por fluorescência intrínseca.

3.9.4 Estabilidade em função do pH analisada por Fluorescência Extrínseca

Os ensaios de fluorescência extrínseca foram realizados em tampão Acetato Fosfato Borato 20 mM, em pHs ajustados entre 2,0 e 13,0, e proteína em tampão Tris 20mM pH 8,0, contendo 20mM NaCl.

Para analisar possíveis mudanças conformacionais da camptosemina em função da mudança do pH do meio, o ANS foi utilizado como uma sonda para observação de exposição ou oclusão de regiões hidrofóbicas na estrutura da proteína. À uma solução de cerca de 380 μ M de camptosemina em cada um dos pHs ensaiados foi adicionado 0,145 mM de ANS. As misturas permaneceram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente e protegida da luz antes de cada medida. A fim de descontar a influência do meio onde a proteína estava diluída, para cada pH ensaiado, foi preparado um branco correspondente com tampão Acetato Fosfato Borato, tampão da proteína e ANS sendo os respectivos espectros subtraídos daqueles realizados em presença da proteína. As medidas foram realizadas em um espectrofluorímetro ISS K2 (ISS, IL, USA), modo estático, equipado com sistema circulador refrigerado (Neslab RTE-210), a 22 °C, utilizando-se cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico, com comprimento de onda de excitação de 360 nm e intervalo de emissão de 400 a 600 nm.

4 Resultados e Discussão

4.1 Isolamento da camptosemina

Na tentativa de identificar a presença de lectinas no extrato bruto de sementes de *Camptosema ellipticum*, o mesmo foi testado quanto a sua capacidade de promover a hemoaglutinação de hemácias humanas. Uma vez confirmada a hemoaglutinação, tornou-se necessária a purificação e identificação da (ou das) lectina(s) responsável(is) por esta atividade. Para isto, o extrato bruto foi submetido primeiramente à cromatografia de Exclusão Molecular em coluna Superdex 75 .

As frações que constituíram os picos obtidos na cromatografia do extrato bruto foram testadas quanto a sua capacidade de promover a hemoaglutinação de hemácias humanas. Observou-se que as frações 13 a 23 apresentavam atividade hemoaglutinante e elas foram concentradas em Centriprep e recromatografadas nas mesmas condições.

As frações que constituíram os picos da recromatografia das frações 13 a 23 foram coletadas e novamente testadas para observação da atividade hemoaglutinante, com resultado positivo para as frações 16 a 22. Estas frações foram concentradas em centriprep e submetidas novamente à cromatografia em coluna Superdex 75 na presença de lactose.

A figura 5 apresenta o resultado das três etapas cromatográficas realizadas em Superdex 75:

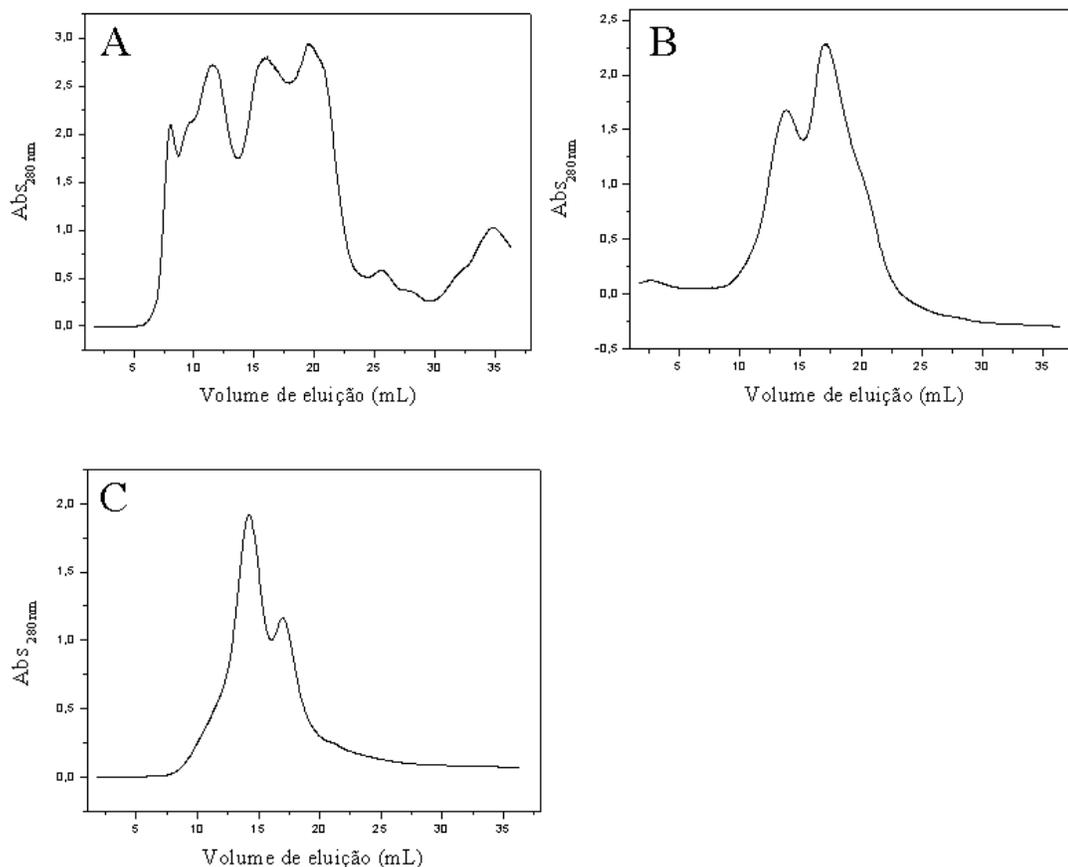


Figura 5: Etapas da purificação da camptosemina em Superdex 75 10/300 GL. Cada etapa foi realizada através de Cromatografia de Exclusão Molecular (CEM) em coluna Superdex 75, sob fluxo de 0,5 mL/min e com volume de cada fração de 1 mL. Os perfis de eluição foram monitorados através da leitura da absorbância em 280 nm. A) Extrato Bruto. O extrato bruto de sementes de *Camptosema ellipticum* foi submetido a CEM em coluna equilibrada com tampão PBS (NaCl 0,15 M, pH 7,4. B) Eluição da camptosemina nas frações 13-23. As frações 13-23, providas da cromatografia do extrato bruto, foram submetidas a CEM em coluna equilibrada com tampão PBS (NaCl 0,15 M, pH 7,4). C) Eluição da camptosemina nas frações 16-22. As frações 16-22, providas da eluição das frações 13-23, foram submetidas a CEM em coluna equilibrada com tampão PBS-Lactose (NaCl 0,15 M, 0,2M Lactose, pH 7,4).

Ao final da terceira etapa cromatográfica, as frações pertencentes a cada pico foram dessalinizadas e a lactose foi retirada através da lavagem das mesmas em Centriprep com Tampão Tris 20 mM, pH 8,0. A atividade hemoaglutinante foi testada, tendo sido positiva para as frações 11 a 16. Estas foram agrupadas e submetidas à Cromatografia de Troca Iônica em coluna Mono Q 5/50 GL, e a camptosemina foi eluída num gradiente crescente de NaCl.

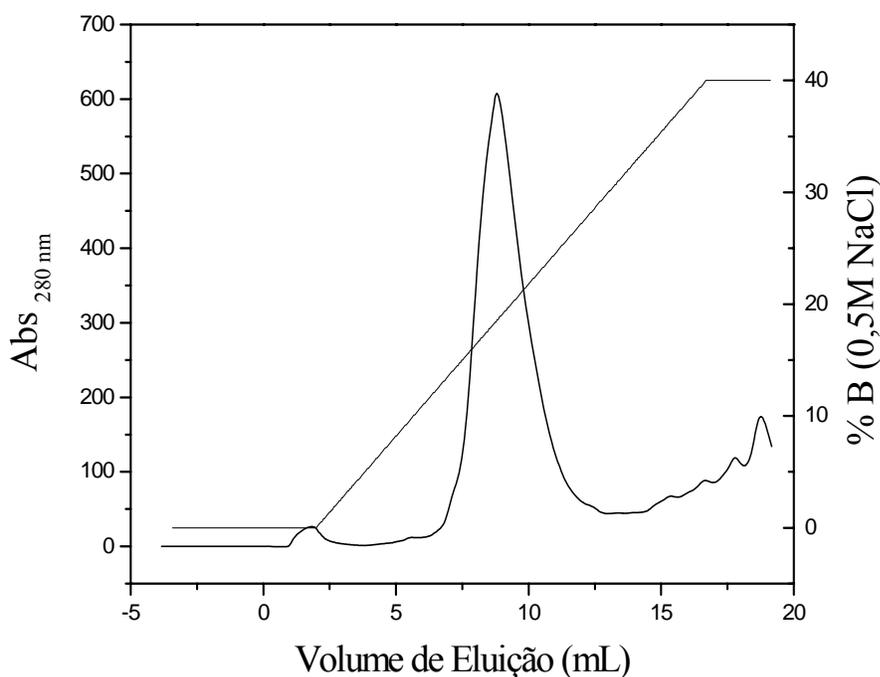


Figura 6: Cromatografia de troca iônica em coluna Mono Q 5/50 GL. As frações 11 a 16, providas da eluição das frações 16 a 22, foram dessalinizadas e concentradas em Centriprep (10 KDa Amicon) e 1 mL foi aplicado à coluna Mono Q, equilibrada com Tampão Tris 20 mM, pH 8,0 e eluída em gradiente crescente de sal formado pela mistura do Tampão de Equilíbrio e de Tampão Tris 20 mM, NaCl 0,5 M, pH 8,0. Frações de 1 mL foram coletadas a um fluxo constante 1 mL/min. O perfil de eluição foi monitorado através da leitura da absorvância em 280 nm.

O pico predominante obtido na última etapa cromatográfica (figura 6), constituído pelas frações 9-13, apresentou atividade hemoaglutinante e a lectina isolada foi denominada Camptosemina. O pequeno pico apresentado no início do gradiente foi constituído de amostra que não foi completamente dessalinizada antes de ser submetida à cromatografia. Isto pôde ser confirmado através de SDS-PAGE das frações constituintes deste pico, assim como também pela recromatografia das mesmas.

4.2 Rendimento

O rendimento de cada etapa foi calculado utilizando-se o *BCA Protein Assay Kit*. Para tanto, alíquotas de cada etapa foram recolhidas e posteriormente dosadas de acordo com as instruções do fabricante do Kit, sendo os resultados dispostos na tabela 1.

Tabela 1: Porcentagem da recuperação de proteína, a partir de sementes de *Camptosema ellipticum*, durante a purificação de camptosemina. O extrato bruto foi obtido a partir de 5 g de sementes de *Camptosema ellipticum*.

Etapa da Purificação	Concentração de			
	Proteína (mg/mL)	Volume (mL)	Proteína Total (mg)	Recuperação (%)
Extrato Bruto	34,90	16	558,5	100
Frações 13-23				
(CEM 1)	3,32	77	255,95	45,82
Frações 16-22				
(CEM 2)	1,39	35	48,6	8,70
Frações 11-16				
(CEM 3)	2,27	19	43,2	7,73
Frações 9-13				
(MONOQ)	0,21	39	8,55	1,53

A proteína obtida foi alíquotada e congelada em freezer (-20 °C) até o momento do uso.

4.3 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

Uma solução da camptosemina, a 38 μ M, foi submetida a SDS-PAGE em quatro diferentes condições: após fervura e em presença de β - Mercaptoetanol, após fervura mas sem β - Mercaptoetanol, sem fervura e em presença de β - Mercaptoetanol, sem fervura e sem β - Mercaptoetanol. Observou-se que após a fervura, a proteína comportava-se da mesma maneira, em presença ou ausência de β - Mercaptoetanol, com a formação de uma banda única em torno

de 30 kDa. Quando a amostra não foi fervida, a banda situou-se em posição que corresponde a uma massa superior a 66 kDa, em presença ou ausência de β - Mercaptoetanol. Com isto pôde-se constatar que o β - Mercaptoetanol não influencia no grau de oligomerização da proteína, mas que a fervura foi suficiente para que a proteína migrasse como um monômero, com a massa calculada em torno 24 kDa (relativamente próximo ao valor teórico obtido de 25,970 kDa).

Estes resultados indicam que o oligômero deve ser mantido, em parte, por interações não covalentes, as quais são desfeitas após a fervura.

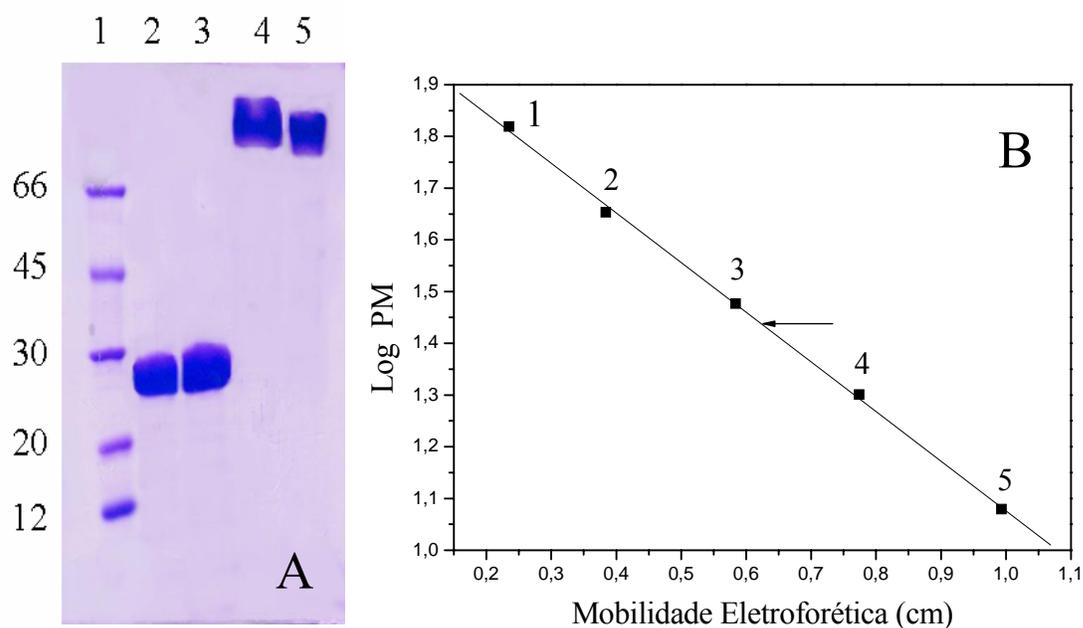


Figura 7: Análise da pureza e estado de oligomerização da camptosemina. A) SDS-PAGE 15% corado com azul de Coomassie: Camptosemina fervida, em presença de β - Mercaptoetanol (coluna 2) e sem β - Mercaptoetanol (coluna 3) e camptosemina sem ferver em presença de β - Mercaptoetanol (coluna 4) e sem β - Mercaptoetanol (coluna 5). A coluna 1 contém os marcadores cujas massas moleculares (kDa) estão indicadas à esquerda. B) Curva de Calibração do SDS-PAGE. Regressão linear baseada nas distâncias percorridas por camptosemina fervida, em presença de β - Mercaptoetanol e dos padrões Albumina Sérica Bovina (66 kDa), Ovalbumina (45 kDa), Anidrase Carbônica (30 kDa), Inibidor de Tripsina de Soja (20 kDa) e Citocromo C (12 kDa).

4.4 Determinação da Seqüência N- terminal e Determinação de Parâmetros Físico-químicos Teóricos.

A determinação da seqüência N-terminal foi realizada através da degradação de Edman automatizada. Com base na seqüência N- terminal obtida (figura 8), Goto (2007) desenhou um oligonucleotídeo degenerado que possibilitou a amplificação de um fragmento de cDNA parcial da camptosemina e conseqüente obtenção da estrutura primária da mesma (figura 9).

	10	20
Camptosemina	A I V T S F X Y T S F S X X X H I K	— L Q G N A A I Q G N
	T K	V E
	V	Q

Figura 8: Seqüência N-terminal da camptosemina obtida pelo seqüenciamento automático. Em amarelo estão destacadas as diferentes possibilidades de um dado resíduo dadas pela baixa confiabilidade do mesmo. X corresponde aos resíduos não identificados.

10	20	30	40	50
AIVTSFNYS	FSSSSHIKLQ	GNAAIQGNGL	LALTSCKNPS	SNIGRVLYSS
60	70	80	90	100
PVTIWDEATG	NVAGFVSSIT	FRLEDVSEYV	PADGIVFFLA	PQDTQIPSGS
110	120	130	140	150
TGGYLGVVNP	KDAFNDFVGV	EFDDYSNAWD	PSYPHIGIDV	NSLISLQTAK
160	170	180	190	200
WNRKSGSLVK	AAIMYDCHAK	TLSSVAVENDG	QIITVAQMVD	LKAVLPSKVV
210	220	230	240	
VGLSASTSSG	GIQRHDVYSW	AFNSRLDTDP	SNSKENMNMA	SSK

Figura 9: Seqüência primária de camptosemina madura, deduzida a partir do cDNA (GOTO, 2007).

A partir da seqüência obtida, utilizando o programa ProtParam (GASTEIGER ET AL, 2005), foi possível a obtenção dos parâmetros físico químicos listados a seguir:

Tabela 2: Parâmetros Físico-Químicos teóricos calculados a partir da seqüência primária da camptosemina madura.

<i>Parâmetro</i>	Valor Obtido
Peso Molecular	25,970 kDa
pI	5.09
Coefficiente de Extinção (280 nm)	33920 M ⁻¹ cm ⁻¹

É importante salientar que todas as concentrações apresentadas para camptosemina, neste trabalho, foram calculadas em termos de monômero, baseadas no peso molecular teórico de 25,970 kDa.

Através da análise do alinhamento da seqüência primária da camptosemina e de outras proteínas em bancos de dados, foi observada grande identidade entre camptosemina e lectinas encontradas em *Robinia pseudoacacia*. A maior identidade foi obtida com o polipeptídeo expresso pelo clone LECRPA4, isolado de uma biblioteca de cDNA de casca de *Robinia pseudoacacia*, o qual é uma subunidade do complexo lectínico RPbAII (YOSHIDA; KIYOSHI, 1999). A identidade apresentada foi de 58% (figura 10).

camptosemina	-----AIVTSFNYSFSSSS-HIKLQGNA	23
LECRPA4	MATPYSNPSTQKPYSVPLAIFISFFVLLASARKVNSAEGISDFTKFTQS--DITLQGSA	58
polipeptideoA	-----TGSLSFSPKFPAPNQPYLINQGDA	24
	: **...*: . : **.*	
camptosemina	AIQGNLLALTSKDN--PSS-NIGRVLYSSPVTIWDEATGNVAGFVSSITFRLEDVSEYV	80
LECRPA4	QILSNGILALTKHVN--PSW-SEGRALYTEPIPIWDASTGNVASFVTSFVSVVQDIPGRN	115
polipeptideoA	LVTSTGVQLTINVVNGVPSSKSLGRALYAAPFQIWDSTGNVASFVTSFTFIIQAPNPAT	84
	: ..*: * *. * ** . **.**: *. *** :*****.***::* ::	
camptosemina	PADGIVFFLAPQDTQIPSGSTGGYLGWVNP--KDAFNNFVGVVEFDDYSN-AWDPSYPHIG	137
LECRPA4	PADGIVFFLAPPDTEIPNNSGGKLGIVDG--NNAFNQFVGVVEFDSYIN-DWDADSAHIG	172
polipeptideoA	TADGLAFFLAPVDTQPLD--LGGMLGIFKDGYNKSNQIVAVEFDTFSSNGDWDPKGRHLG	142
	.***:.***** **: . ** **.. : *:*.***** : * **.. *:*	
camptosemina	IDVNSLISLQTAKWNRKSGSLVKAAIMYDCHAKTLSVAVEND--GQIITVAQMVDLKA	195
LECRPA4	IDVNSLISLKTVKWNRVSGSLVNVGIIYDSLTKTLSVAVTHAN-GQISTIAQVVDLKA	231
polipeptideoA	INVNSIESIKTVPWNTNGEVANVFISYEASTKSLTASLVYPSLETSFIIDAIVDVKIVL	202
	*:***: *:*.* ** .*...: * *.. :*:*::: : :***: * **	
camptosemina	PSKVVVGLSAST--SSGGIQRHDVYSWAFNSRLDTPSNSKENMNMASSK	243
LECRPA4	PEKVRVGFSAAT--TSGGQIHD IHSWSFTSNLETTVSVTSENINIKSYA	279
polipeptideoA	PEWVRFGFSATTGIDKGYVQTNDVLSWSFESNLPG-----	237
	*. * .*:***: * . * * :*: **:* *. *	

Figura 10: Alinhamento da seqüência primária da camptosemina com duas lectinas de *Robinia pseudoacacia*: LECRPA4 (AB012635) e polipeptídeo A (Q41159-1FNY). Os resíduos assinalados por * são conservados nas três seqüências. O seqüenciamento foi realizado pelo programa CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/>).

4.5 Determinação do Estado Oligomérico.

Com o intuito de conhecer a massa aparente e o estado oligomérico da proteína, a camptosemina foi submetida a cromatografia de Exclusão Molecular em coluna Superdex 200 na presença de Lactose e NaCl (figura 11). A presença da Lactose e NaCl teve o objetivo de impedir eventuais interações inespecíficas da lectina com a matriz cromatográfica.

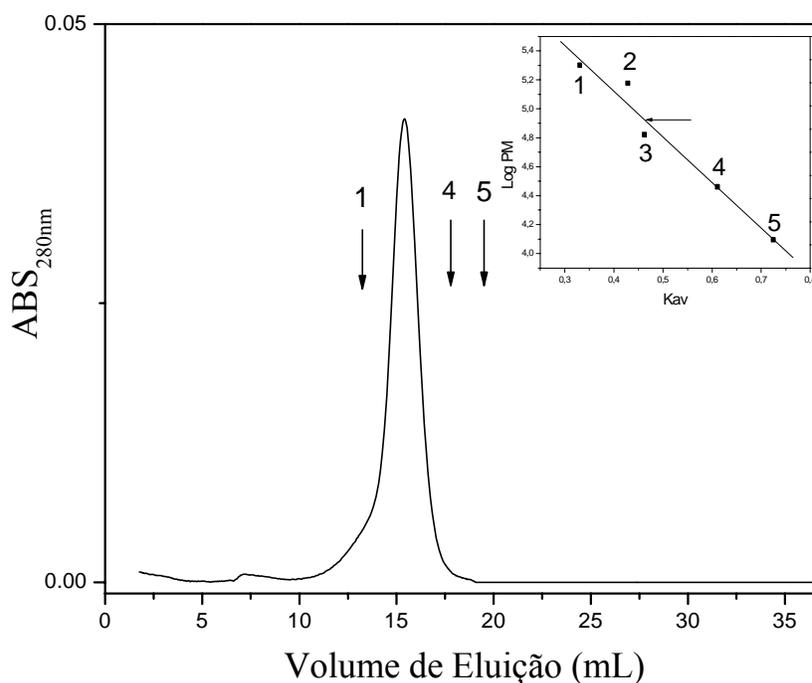


Figura 11: Determinação da Massa Molecular Aparente da camptosemina. Camptosemina purificada foi eluída em Coluna Superdex 200 equilibrada com tampão Tris 20 mM, 0,2 M Lactose, 0,3 M NaCl pH 8,0. Frações de 1 mL foram coletadas a um fluxo constante de 1 mL/min. O perfil de eluição foi monitorado através da leitura da absorbância em 280 nm. No detalhe a eluição de proteínas de massa conhecida usadas como padrões β - Amilase (200 kDa), Álcool Desidrogenase (150 kDa), Albumina Sérica Bovina (66 kDa), Anidrase Carbônica (30 kDa) e Citocromo C (12kDa).

Com base na curva de calibração, obtida através da eluição de proteínas de massas moleculares conhecidas, nas mesmas condições da eluição da camptosemina, a massa molecular aparente de camptosemina pôde ser determinada. A massa molecular aparente calculada do oligômero de camptosemina reside em torno de 81,600 kDa. Considerando-se 25,970 kDa a massa do monômero de camptosemina (estimado teoricamente), tem-se que o oligômero pode ser constituído por 3 ou 4 protômeros. Embora a massa apresentada pelo oligômero esteja dentro do limite de resolução da coluna, existem duas possíveis explicações para esta imprecisão na determinação do número de protômeros que constituem a proteína. É possível que proteína não se comporte como uma proteína globular e, desta forma, a calibração realizada com base em proteínas globulares não seria totalmente adequada. Porém, a explicação mais provável é que a

resolução não seja suficientemente alta para que seja notada com precisão a diferença de um trímero e um tetrâmero.

Como a informação a respeito do número de protômeros que constituem o oligômero ainda foi considerada inconclusiva, medidas de SAXS foram realizadas em colaboração com Mario de Oliveira Neto, aluno de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos-USP. Para isso foram obtidas as medidas de SAXS da camptosemina e simulações das curvas de espalhamento e das funções de distribuição de pares de outras duas lectinas baseadas em suas estruturas depositadas no PDB.

Apesar do polipeptídeo expresso pelo clone LECRPA4 ser a proteína com maior identidade com a camptosemina, não há até o momento estrutura cristalográfica resolvida. Sendo o Polipeptídeo A da RPbAI uma das lectinas tetraméricas de *Robinia pseudoacacia* que apresenta identidade com camptosemina (37 %), cuja estrutura cristalográfica já encontra-se resolvida, ela foi utilizada nas simulações de SAXS. A lectina LOL I, por sua vez, é uma representante dimérica da família de lectinas de legume. Sendo o intuito da utilização da técnica a observação do grau de oligomerização de camptosemina e sabendo-se que a maioria das lectinas de legume existe como homodímeros ou homotetrâmeros (BRINDA et al, 2004), comparou-se os resultados obtidos experimentalmente da camptosemina e as simulações do Polipeptídeo A da RPbAI (lectina tetramérica, PDB 1FNY) e LOL I (lectina dimérica, PDB 1LOC).

Devido ao espalhamento de Camptosemina apresentar o mesmo perfil nas duas concentrações medidas, utilizou-se nas análises, a solução de maior concentração a fim de obter maior resolução no modelo gerado.

Na figura 12 estão representadas as curvas de espalhamento experimental e simuladas, assim como o gráfico de Guinier.

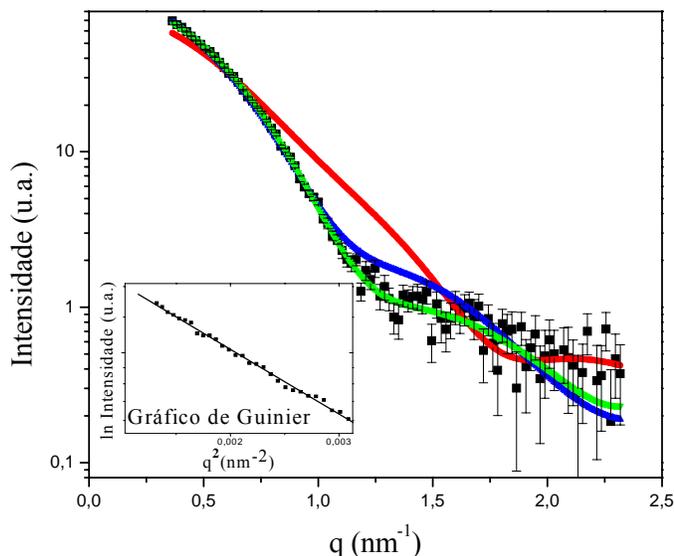


Figura 12: Curva Experimental de Espalhamento da Camptosemina (■), corrigida pelo efeito de “smearing”, e curvas de espalhamento simuladas de LOL 1 (—), Polipeptídeo A (—) e DAM (—). No detalhe, o gráfico de Guinier.

O Gráfico de Guinier possui uma relação direta entre o coeficiente angular da reta e o R_g da proteína. O valor de raio de giro obtido pelo método de Guinier foi 3,09 nm, valor este muito próximo do parâmetro obtido com o programa Gnom ($3,04 \pm 0,50$ nm e $3,00 \pm 0,50$ nm para os dados experimentais e 2,59 nm para o modelo DAM) o que nos garante que a curva obtida é confiável, assim como os parâmetros por ela obtidos. Além disto, a dispersão dos pontos no gráfico de Guinier ajusta-se muito bem a uma reta o que comprova a monodispersibilidade do sistema.

Utilizando o método de Transformada Inversa de Fourier implementado pelo programa GNOM, foi obtida a função de distribuição de distâncias $p(r)$ a partir das curvas de espalhamento.

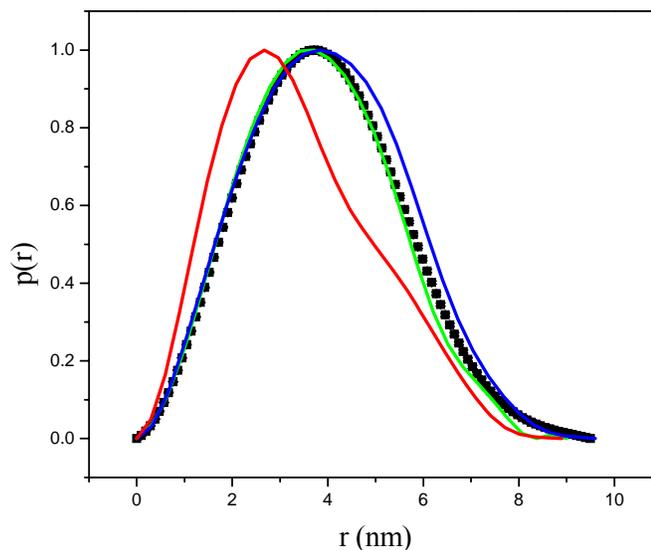


Figura 13: Função de distribuição de distâncias. As funções de distribuição de distâncias foram evoluídas a partir das curvas de espalhamento utilizando o programa GNOM. Comparação das distribuições de distâncias para camptosemina (■), LOL 1 (—), Polipeptídeo A (—) e DAM (—). Os valores de chi (discrepância) obtidos para LOL 1, Polipeptídeo A e DAM foram 10,70, 1,90 e 1,09 respectivamente.

Com a utilização do programa Crysol, foi possível a construção de uma tabela correspondente aos parâmetros estruturais obtidos dos experimentos de espalhamento, assim como, do modelo *ab initio* e das coordenadas atômicas do Polipeptídeo A e de LOL I.

Tabela 3: Parâmetros estruturais obtidos das medidas de SAXS, do modelo e das simulações.

Parâmetro	54 μM *	322 μM *	Dam [‡]	LOL I [†]	Polipep. A [†]
R _g (nm)	3,04 ± 0,50	3,00 ± 0,50	2,59	2,51	2,90
D _{max} (nm)	9,50 ± 1,00	9,50 ± 1,00	9,00	8,9	9,55
Discrepância χ	-	-	1,09 [¶]	10,70 [¶]	1,90
Resolução (nm)	3,18	2,73	-	-	-
	-	-	135,9	72,07	128,10

*Dados calculados a partir do experimento de espalhamento.

† parâmetros dos modelos cristalográficos de LOL I e Polipeptídeo A.

‡ Dam, parâmetros do modelo de átomos dummy, média de 10 modelos.

Os dados das simulações foram comparados com os dados experimentais obtidos com camptosemina 462 μM .

É possível medir o grau de confiança no modelo *ab initio*, em relação aos dados experimentais, através da discrepância apresentada entre ambos que é 1,09 (figura 13). Sabendo-se que uma discrepância de valor 1 significa que os dados obtidos são idênticos, é notável que o modelo apresentado está em grande conformidade com os dados obtidos experimentalmente e que ele é representativo das condições da camptosemina em solução. É possível ainda observar na figura 12 que a curva simulada do modelo se ajusta bem à curva de espalhamento da camptosemina.

Comparando-se os valores obtidos experimentalmente para camptosemina, assim como os valores relativos ao modelo *ab initio*, com aqueles obtidos para a lectina dimérica LOL 1, nota-se considerável diferença nos valores das variáveis analisadas. De acordo com a figura 13, a discrepância entre os dados experimentais e da lectina LOL I é de 10,70. Por outro lado, quando os valores relativos aos dados experimentais são comparados com os obtidos para o polipeptídeo A, a discrepância cai para 1,90. Isto significa que os valores experimentais são mais próximos aos obtidos para o polipeptídeo A.

Quando analisamos o volume obtido para o modelo *ab initio*, LOL I e polipeptídeo A, é notável que ele representa o parâmetro com maior variabilidade (135,9 nm³, 72,07 nm³ e 128,10 nm³, respectivamente). O volume apresentado pelo modelo é próximo ao obtido para o polipeptídeo A, mas muito distante do valor apresentado para LOL I.

Apesar dos parâmetros R_g e D_{max} não terem apresentado diferenças significativas entre os valores obtidos, fica evidente pelos demais parâmetros, pelas curvas de espalhamento (experimental e simulada), assim como pelas curvas obtidas através da função de distribuição de distâncias que a camptosemina tem estrutura tridimensional compatível àquela observada no polipeptídeo A. Desta forma, é possível afirmar que camptosemina é mais uma representante tetramérica da família das lectinas de legumes.

Para comprovar esta afirmação, realizou-se uma sobreposição do modelo *ab initio* gerado a partir dos dados experimentais de espalhamento de camptosemina e o tetrâmero do polipeptídeo A. Como é possível notar pela figura 14, o polipeptídeo A encaixa-se bem no envelope obtido para camptosemina, com mínimas regiões de discordância, confirmando assim, o grau de oligomerização tetramérica para de camptosemina.

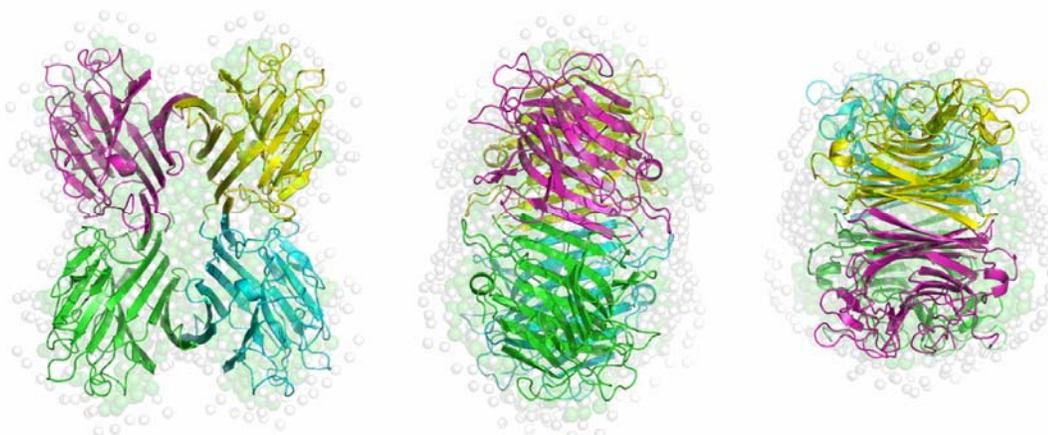


Figura 14: Sobreposição do modelo *ab initio* com a estrutura quaternária do polipeptídeo A. Visões frontal, lateral e superior da estrutura.

4.6 Atividade Hemoaglutinante da camptosemina antes e após Desmetalização.

Por definição, lectinas são proteínas capazes de causar aglutinação celular e precipitação de glicoconjugados (exceção feita apenas à classe das merolectinas que por apresentarem um único sítio de ligação a carboidratos, são incapazes de promover aglutinação). A capacidade hemoaglutinante de camptosemina já era conhecida, porém nada se sabia a respeito de sua especificidade de ligação. Esta informação foi conseguida testando-se a atividade hemoaglutinante da lectina, frente aos 4 tipos sanguíneos humanos, através da incubação de diferentes concentrações de camptosemina com suspensões de hemácias a 2 % em tampão PBS, seguida de visualização a olho nu.

Embora tenha sido capaz de hemoaglutinar os 4 tipos sanguíneos, o maior título foi obtido quando a reação foi feita com hemácias do tipo O (título 64), seguido da reação com o tipo AB (título 16). Provavelmente esta diferença observada deve-se a composição e/ou disponibilidade dos carboidratos de superfície em cada tipo sanguíneo.

A capacidade de ligação a carboidratos das lectinas de legumes depende da presença simultânea de cálcio e de um metal de transição. A presença destes metais é essencial para o correto enovelamento e arranjo dos sítios de ligação a carboidratos (RÜDIGER; GABIUS 2001). Os sítios de ligação de ambos metais mostram-se conservados em todas as estruturas de lectinas

de legumes (LORIS et al, 1998). Uma exceção a esta aparente regra é a existência de duas proteínas (a-AI e arcelin) pertencentes à mesma família que não se ligam à carboidratos e que não possuem sítios de ligação à metais (LORIS et al, 1998).

Tabela 4: Atividade hemoaglutinante de camptosemina frente hemácias humanas.

Diluição Tipo Sanguíneo	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
O	+	+	+	+	+	+	+	+/-
A	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-
B	+	+	+	+/-	-	-	-	-
AB	+	+	+	+	+	+/-	-	-

Concentração Inicial de camptosemina 4,5 μ M.

- Ausência de Hemoaglutinação visível a olho nú.

+ Hemoaglutinação visível a olho nú.

+/- Hemoaglutinação parcial.

Embora tenha sido capaz de hemoaglutinar os 4 tipos sangüíneos, o maior título foi obtido quando a reação foi feita com hemácias do tipo O (título 64), seguida da reação com o tipo AB (título 16). Provavelmente esta diferença observada deve-se a composição e/ou disponibilidade dos carboidratos de superfície em cada tipo sanguíneo.

Pelo ensaio de hemoaglutinação, é possível notar que a camptosemina é capaz de ligar-se à hemácias, causando a aglutinação das mesmas, o que certamente se dá através de sua ligação a carboidratos presentes na superfície celular. Desta forma, é esperado que ela apresente os metais necessários para que a ligação aos carboidratos se processe. Uma maneira indireta de comprovar a existência de metais na estrutura de camptosemina é quelar estes possíveis metais e testar sua capacidade hemoaglutinante. Para isto, a proteína purificada (24 μ M) foi dialisada durante 48 horas contra a solução do quelante EGTA para remoção dos possíveis metais ligados à mesma. A apo-camptosemina (lectina teoricamente sem metais), foi então dialisada por 24 hs contra tampão Tris 20 mM, NaCl 50 mM, pH 8,0 e a atividade hemoaglutinante da proteína foi testada frente hemácias do tipo O.

Contrariamente ao esperado, foi observado que a camptosemina continuou a apresentar atividade hemoaglutinante após o tratamento, quer ele tenha se dado com EGTA ou com EDTA. Sendo a camptosemina uma lectina pertencente à família das leguminosas, era esperado que após

o tratamento com o quelante, ela não fosse mais capaz de se ligar aos carboidratos da superfície das hemácias.

Uma das possíveis explicações para este comportamento inesperado pode ser que o tratamento não tenha sido capaz de retirar todas as moléculas de metais presentes na estrutura de camptosemina, ocasionando uma “atividade residual”. Assim, aquelas moléculas da lectina que ainda apresentavam metais foram capazes de exercer a atividade hemoaglutinante, levando ao resultado observado. Deve-se lembrar que o ensaio hemoaglutinante é meramente qualitativo.

Segundo Loris et al (1998), a concanavalina A pode apresentar-se em duas conformações diferentes dependendo da presença de metais. A conformação aberta existe após a desmetalização da lectina e é incapaz de reconhecer carboidratos enquanto a conformação fechada, considerada ativa, existe em presença de cálcio e de um metal de transição. Entretanto, estudos de NMR realizados com a apo concanavalina A demonstram que cerca de 10% das moléculas presentes em solução continuam a apresentar a conformação fechada (ativa) mesmo após a retirada dos metais. É possível que o tratamento com o quelante tenha sido eficaz e que os possíveis metais presentes na camptosemina tenham sido removidos. Porém, assim como acontece com a concanavalina A, uma fração das moléculas da camptosemina pode ter mantido a conformação adequada, sendo ainda capaz de exercer a atividade de ligação a carboidratos após a desmetalização.

Uma terceira explicação, menos provável, porém, é que camptosemina pode ser uma lectina de legume desprovida de metais ligados à sua estrutura, não existindo como holo-proteína. Estudos adicionais ainda precisam ser realizados para entender o comportamento observado para camptosemina.

4.7 Inibição da Hemoaglutinação por Carboidratos.

A atividade aglutinante das lectinas se dá através da ligação das mesmas à carboidratos presentes na superfície das células, as quais elas são capazes de aglutinar. Dependendo da classe as quais pertencem, as lectinas podem ligar-se especificamente a um tipo de carboidrato (merolectinas e hololectinas) ou a mais de um tipo (superlectinas e algumas quimerolectinas). Lectinas de legumes diferem fortemente umas das outras com relação à especificidade de ligação a carboidrato. É nesta família que são encontradas as maiores diversidades de ligação, sendo que

a maioria dos grupos classificados com base na ligação a carboidrato são representados por lectinas pertencentes a família das leguminosas (VAN DAMME et al, 1998).

Uma maneira simples de determinar o tipo de carboidrato ao qual a lectina liga-se com maior afinidade, foi verificar a inibição da hemoaglutinação pelo dado açúcar. Este ensaio foi realizado com camptosemina a 2,8 μM (concentração determinada através do título obtido no ensaio de hemoaglutinação) e com diferentes concentrações de diversos carboidratos. Os resultados podem ser observados na tabela 5.

Tabela 5: Inibição da atividade hemoaglutinante da camptosemina por carboidratos. Camptosemina (2,8 μM) foi previamente incubada, a temperatura ambiente, com soluções de açúcares por 30 min, após os quais foi adicionada uma suspensão 2% de hemácias tipo O. AI indica ausência de inibição na maior concentração utilizada do açúcar. A atividade inibitória da galactose foi considerada, arbitrariamente, como sendo 1.

<i>Carboidrato</i>	<i>CIM (M)</i>	Atividade relativa
Fucose	AI	-
Sacarose	0,125	2
Maltose	AI	-
Lactose	0,031	8,1
Manose	AI	-
Metil-Manosídeo	AI	-
Galactose	0,25	1
Metil- α -D-galactopiranosídeo	0,125	2
D-+-Rafinose	AI	-
N-acetil-D-Glicosamina	AI	-
Melibiose	0,125	2
L-Ramanose	AI	-
N-acetil-D-Galactosamina	0,015	16,7

A maior atividade relativa foi obtida com N-acetil-D-Galactosamina, sendo que a menor concentração usada ainda capaz de inibir a atividade hemoaglutinante de camptosemina foi de 0,015 M, indicando a maior afinidade da lectina por este carboidrato, entre todos os que foram testados.

4.8 Ligação às resinas de Afinidade.

Uma forma de comprovar os resultados obtidos no ensaio de inibição foi testar a ligação da lectina a resinas contendo o carboidrato de interesse imobilizado. O carboidrato que apresentou maior atividade relativa quando testado com camptosemina foi N-acetil-D-Galactosamina (16,7) seguido de Lactose (8,1).

Duzentos microgramas da camptosemina foram incubados com concentrações crescentes de N-acetil-D-Galactosamina e Lactose (separadamente) e posteriormente incubadas com 20 μ L das resinas α -Lactose-Agarose e N-Acetil-D-Galactosamina Agarose que apresentam imobilizados, respectivamente, os carboidratos N-acetil-D-Galactosamina e Lactose. Após o período de incubação e lavagem, as resinas foram ressuspensas, fervidas e submetidas a SDS-PAGE.

Observando-se a coluna 3 (figura 15) é possível notar que camptosemina é capaz de interagir e ligar-se à resina N-Acetil-D-Galactosamina Agarose. Ao incubar a proteína com concentrações crescentes do carboidrato N-acetil-D-Galactosamina (colunas 4 a 6), menos proteína foi capaz de ligar-se a resina. Esta inibição de ligação causada pelo carboidrato comprova a afinidade da proteína pelo mesmo, já que estando os sítios de ligação da proteína preenchidos pelo carboidrato em solução, a proteína não teria como interagir com a resina, não se ligando mais a ela. Observando-se a coluna 7 é possível notar que camptosemina é capaz de interagir e ligar-se à resina α -Lactose-Agarose, porém, ao se observar as colunas 8 à 10, que representam a incubação da proteína com concentrações crescentes do carboidrato lactose, pouca diferença pode ser notada com relação a quantidade de proteína que ainda era capaz de interagir e ligar-se a resina. Como camptosemina foi capaz de ligar-se a resina e sendo possível notar uma pequena redução na quantidade de proteína ligada à resina após a incubação com 10 μ M de Lactose, pode-se dizer que camptosemina é capaz de ligar-se à este carboidrato também, embora com menor afinidade do que com a N-acetil-D-Galactosamina.

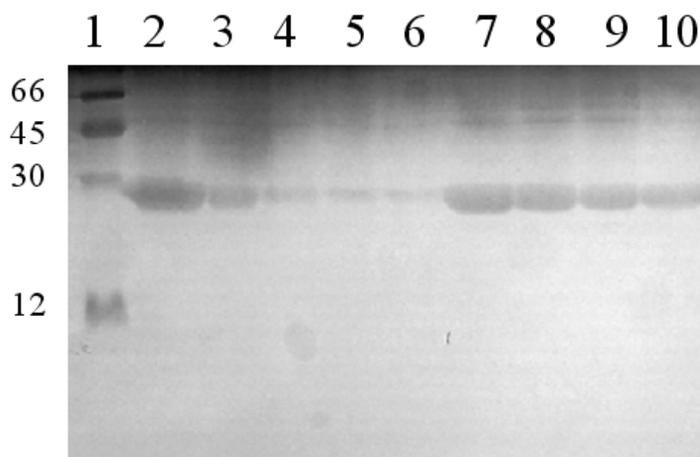


Figura 15: Ensaio de especificidade utilizando resina de afinidade. 1) Marcador de Massa Molecular, 2) 200 μ g da camptosemina na ausência de resina, 3) Controle negativo de inibição de N-acetil-D-Galactosamina, 4) 2 μ M N-acetil-D-Galactosamina, 5) 4 μ M N-acetil-D-Galactosamina, 6) 10 μ M N-acetil-D-Galactosamina, 7) Controle negativo de inibição de Lactose, 8) 2 μ M Lactose, 9) 4 μ M Lactose, 10) 10 μ M Lactose.

4.9 Verificação da presença de Carboidratos na Estrutura da camptosemina

A glicosilação é uma das modificações pós-traducionais mais comuns em proteínas eucarióticas. Carboidratos ligados ao esqueleto carbônico das proteínas através de N-ligações, o fazem por intermédio de uma ligação amida com resíduos de asparagina pertencentes a um motivo constituído por Asn-X-Ser/Thr, onde X pode ser qualquer aminoácido, exceto prolina.

Desde o local onde é sintetizada até o destino final, as lectinas podem passar por uma série de modificações que são comuns a proteínas que seguem sua rota de síntese, como a excisão do peptídeo sinal presente na porção N-terminal da proteína tão logo ela tenha adentrado no Retículo Endoplasmático. Outra possível reação que acontece em muitas lectinas é a N-glicosilação (embora algumas lectinas de Solanaceae apresentem O-glicosilação). As modificações continuam a acontecer mesmo depois que as lectinas atingem os corpos protéicos, como por exemplo, proteólise (RÜDIGER; GABIUS 2001).

Com a finalidade de determinar a presença de glicosilação através da ligação de carboidratos a resíduos de asparagina, na lectina madura, camptosemina foi submetida à reação de deglicosilação utilizando o *Kit GlycoProfile II, Enzymatic In-Solution N-Deglycosilation* (Sigma). A deglicosilação acontece através da hidrólise da ligação amida entre o resíduo de

asparagina o oligossacarídeo. Um tripeptídeo que apresente um oligossacarídeo ligado, tendo a asparagina como resíduo central, é o substrato mínimo da enzima. Oligossacarídeos que possuem fucose ligada a N-acetilglicosamina, N-ligada ao resíduo de asparagina, são resistentes a hidrólise com *PNGase F* (TECHNICAL BULLETIN Sigma P7367).

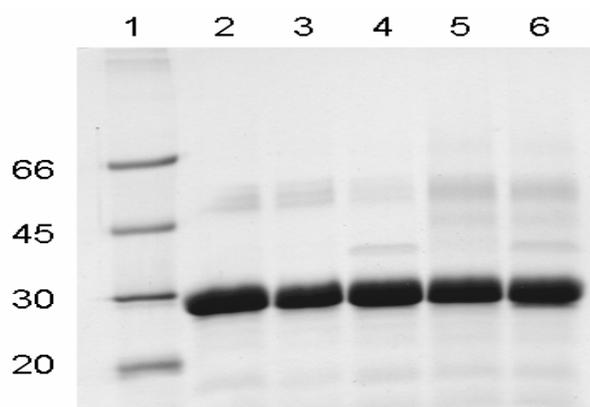


Figura 16: Ensaio de N-Deglicosilação. Camptosemina foi tratada com *PNGase F Enzyme Solution (GlycoProfile II, Enzymatic In-Solution N-Deglycosylation Kit, Sigma)*, em diferentes condições, fervida e submetida a SDS-PAGE 15% corado com azul de Coomassie. 1) Marcadores cujas massas (kDa) estão indicadas à esquerda; 2) camptosemina com β -mercaptoetanol fervida por 10 min.; 3) Controle: camptosemina sem β -mercaptoetanol; 4) camptosemina sem β -mercaptoetanol e sem ferver antes do tratamento; 5) camptosemina com β -mercaptoetanol; 6) camptosemina com β -mercaptoetanol e fervida antes do tratamento.

Na figura 16 é possível notar que não houve qualquer alteração no padrão de massa molecular da camptosemina após o tratamento com a enzima *PNGase F*, quer o tratamento tenha acontecido em condições desnaturantes ou “nativas”, sendo que o aparecimento de uma banda de massa aproximada de 35 kDa nas colunas 4 e 6 correspondem a presença da enzima. Isto é indicativo da ausência de oligossacarídeos N-ligados à camptosemina, ou ainda, a presença de um oligossacarídeo que apresenta fucose ligada a N-acetilglicosamina, que não é passível de hidrólise pela enzima.

4.10 Atividade Antifúngica.

Embora existam relatos demonstrando a atividade de lectinas contra fungos (YE, 2001; TRINDADE et al, 2005; NQAI; NQ, 2007), a camptosemina não foi eficiente nem como fungicida nem como fungistático nas condições testadas, uma vez que ela não eliminou ou inibiu o crescimento das espécies testadas.

4.11 Caracterização Estrutural utilizando Técnicas Espectroscópicas.

A fim de determinar a estabilidade da camptosemina, alterações da estrutura da proteína induzidas pelo tratamento térmico e/ou químico foram acompanhadas por meio das técnicas de espectroscopia de fluorescência e espectroscopia de dicroísmo circular.

A partir dos resultados de desnaturação obtidos por Far UV-CD e por Fluorescência Intrínseca, foram construídas curvas de desnaturação. Nelas a elipsidade ou a intensidade de fluorescência, expressa em termos da fração de proteína desnaturada, f_u , foi colocada no eixo das ordenadas e a variação da temperatura ou da concentração do agente desnaturante no eixo das abscissas. A fração de proteína desnaturada foi calculada pela relação:

$$f_u = \frac{\theta_n - \theta_{obs}}{\theta_n - \theta_u} \quad f_n + f_u = 1$$

em que θ_{obs} é o sinal da amostra em uma determinada condição, θ_u e θ_n são os valores do sinal para os estados desnaturado e nativo.

A camptosemina foi submetida à desnaturação térmica na ausência (figura 17) e na presença (figura 18) de concentrações crescentes de Guanidina-HCl, sendo seu desenovelamento monitorado pela técnica de dicroísmo circular.

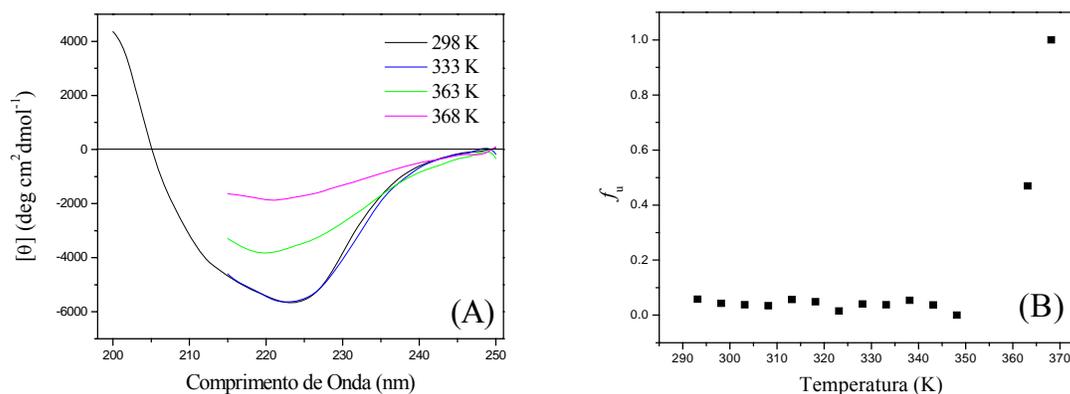


Figura 17: A) Desnaturação Térmica da camptosemina. Camptosemina a $9 \mu\text{M}$ em tampão Tris 20mM, NaCl 20 mM pH 8,0, submetida a desnaturação térmica. B) Monitoramento do mínimo em 220 nm como função da variação da temperatura.

As lectinas de legumes são compostas basicamente por folhas- β (CHANDRA; VIJAYAN, 1999; BRINDA et al, 2004). Esta afirmação é compatível com o espectro de CD apresentado pela camptosemina, que é característico de proteínas ricas em folhas β , com um mínimo em torno de 220-222 nm e um máximo em torno de 190 nm (Figura 17 A, espectro a 298 K).

Embora a análise da figura 17 A demonstre consecutiva perda de elipsidade nos espectros da camptosemina durante aumento da temperatura, o desenovelamento térmico da camptosemina, na ausência de desnaturante químico, não é total até 368,15 K. Isto é evidenciado pela ausência de um platô correspondente à forma completamente desnaturada da camptosemina, na figura 17 B. Isto ressalta a grande estabilidade da molécula frente a alterações de temperatura.

Sabe-se, por ensaios prévios apresentados adiante neste trabalho, que na presença de 1,5 M de Guanidina-HCl a camptosemina apresenta-se ainda enovelada. No intuito de obter o desenovelamento térmico completo da camptosemina, o aquecimento da proteína em três diferentes concentrações ($4,5 \mu\text{M}$, $9 \mu\text{M}$ e $19,5 \mu\text{M}$) foi realizado na presença de 1,5 M de Guanidina-HCl e os resultados são apresentados na figura 18.

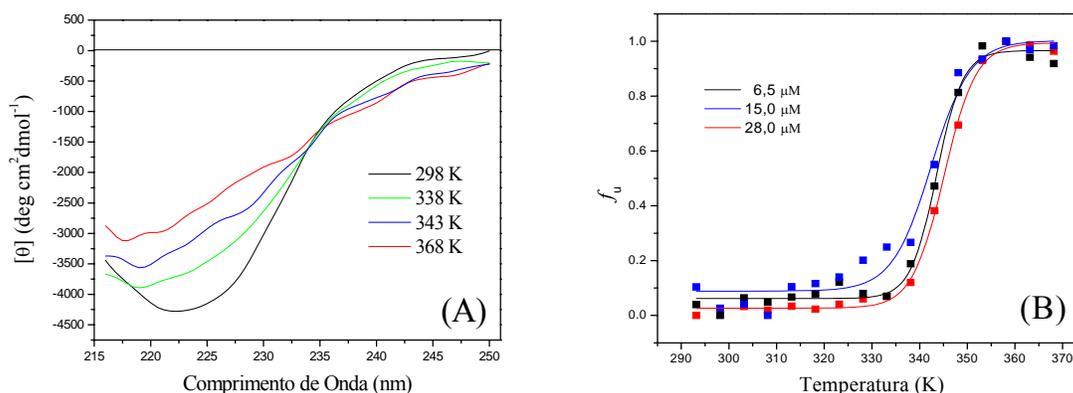


Figura 18: A) Desnaturação Térmica da camptosemina em presença de Guanidina. Camptosemina 13 μM em tampão Tris 20mM, NaCl 20 mM pH 8,0, foi submetida a desnaturação térmica em presença de 1,5M de Guanidina-HCl. As medidas foram realizadas num intervalo de 250 a 195 nm ou 250 a 208 nm, com média de 16 acumulações, largura da banda de 1 nm, tempo de resposta de 0,5 s, velocidade de varredura de 100 nm/min, utilizando-se uma cubeta retangular de quartzo de 1 mm de caminho óptico. B) Curva de Desnaturação Térmica da camptosemina em presença de Guanidina. Curva de desnaturação para três concentrações distintas de camptosemina (4,5 μM , 9 μM e 19,5 μM em tampão Tris 20mM, NaCl 20 mM, 1,5 M Gdn-HCl pH 8,0), monitorada em 220 nm, expressa em termos da fração de proteínas desnaturadas, em função da temperatura.

Embora Guanidina-HCl na concentração de 1,5 M não seja suficiente para causar a desnaturação da molécula de camptosemina, sua presença aliada ao aumento da temperatura foi eficiente para que fosse atingido um platô na curva de desnaturação da proteína.

Através da análise de curvas de desnaturação térmica é possível determinar o ponto, durante o processo, onde 50 % das moléculas encontram-se enoveladas e os 50 % restantes encontram-se desnaturadas. Este ponto é denominado temperatura média de transição ou temperatura de *melting* (T_m). De acordo com a figura 18 B e com a tabela 6, o T_m da camptosemina não sofre alteração dependente de concentração.

Tabela 6: Temperatura de *melting* de camptosemina, na presença de Gdn-HCl, obtida através da técnica de dicroísmo circular.

Concentração da camptosemina (μM)	T _m (K)
6,5	343,57 \pm 0,40
13	342,46 \pm 0,88
28	345,15 \pm 0,26

A temperatura de *melting* apresentada pelas três concentrações da camptosemina em presença de Guanidina-HCl e a impossibilidade de obter-se a completa desnaturação térmica na ausência do agente caotrópico, indicam que camptosemina é uma proteína muito estável. Segundo Srinivas et al (2001), as lectinas de legumes apresentam grande resistência à desnaturação térmica, com temperaturas de *melting* que variam entre 332 e 365 K. É sugerido que esta estabilidade é conferida, ao menos em parte, pela força das interações intersubunidades responsáveis pela manutenção da estrutura quaternária deste grupo de proteínas.

Além da estabilidade frente à variações térmicas, a camptosemina também foi submetida à desnaturação química com a finalidade de se analisar alguns parâmetros termodinâmicos envolvidos neste processo. Para isso, camptosemina em duas diferentes concentrações foi desnaturada com diversas concentrações de Guanidina-HCl (0 a 7,7 M).

Assim como é definido o T_m para as curvas de desnaturação térmica, é definido a $[D]_{50\%}$ que indica a concentração de desnaturante capaz de causar a desnaturação de 50% das moléculas de proteínas presentes em solução.

De acordo com a figura 19 A, é possível acompanhar a perda gradativa de elipsidade de camptosemina mediante aumento na concentração de Guanidina-HCl. Na figura 19 B é possível observar as curvas de desnaturação obtidas para as duas concentrações de proteína.

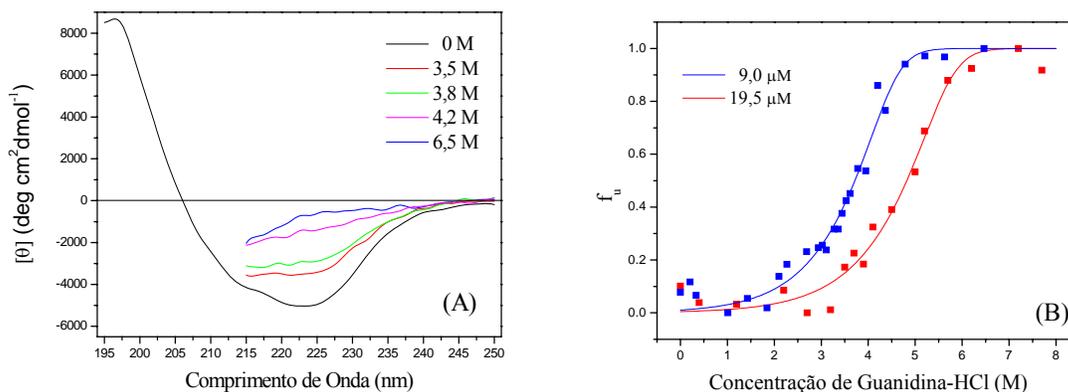


Figura 19: Desnaturação Química da camptosemina monitorada por dicroísmo circular. (A) Espectros de dicroísmo circular obtidos com 9 μM de proteína e concentrações crescentes de Guanidina-HCl. (B) Curvas de desnaturação para duas concentrações distintas da camptosemina (9 μM e 19,5 μM), ajustadas de acordo com a equação 7 apresentada no apêndice. Desnaturação monitorada em 220 nm, expressa em termos da fração de proteínas desnaturadas, em função da concentração de Guanidina-HCl.

O desenovelamento mostrou-se concentração dependente sendo que a $[D]_{50\%}$ apresentada para camptosemina 19,5 μM foi de 4,82 M de Guanidina-HCl, e 3,72 M de Guanidina-HCl para 9 μM de camptosemina.

A desnaturação química da camptosemina também foi monitorada por fluorescência intrínseca e pode ser visualizada na figura 20.

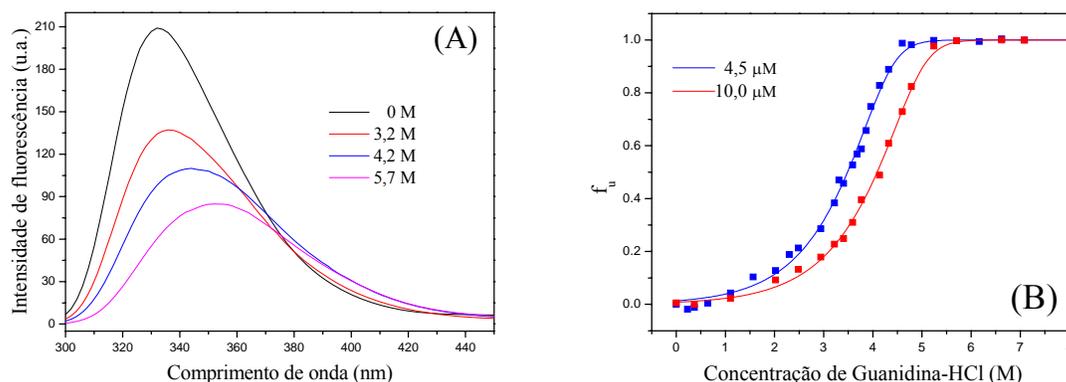


Figura 20: Desnaturação Química da camptosemina monitorada por Fluorescência Intrínseca. (A) Espectros de fluorescência obtidos com 4,5 μM de proteína e concentrações crescentes de Guanidina-HCl. (B) Curvas de desnaturação para duas concentrações distintas da camptosemina (4,5 μM e 10 μM), ajustadas de acordo com a equação 7 apresentada no apêndice. A desnaturação foi monitorada através do centro de massa, expressa em termos da fração de proteínas desnaturadas, em função da concentração de Guanidina-HCl em mesmo tampão.

Embora existam outros resíduos responsáveis pela emissão de fluorescência intrínseca pelas proteínas, o fluoróforo dominante é o grupamento indol do Triptofano. Para evitar a excitação de outros aminoácidos, nos ensaios realizados com camptosemina, a excitação se deu em 295 nm, comprimento onde a Fenilalanina e a Tirosina não absorvem luz (LAKOWICZ, 1999).

Quando excitada em 295 nm, camptosemina exibiu um máximo de emissão em torno de 332 nm, característico de resíduos de Triptofano em ambiente não polar (internalizados no cerne hidrofóbico da proteína).

O espectro de emissão mostrou progressivo deslocamento (*red shift*) conforme a concentração de Guanidina-HCl foi aumentada, atingindo 352 nm, o que indica que em concentrações de Guanidina-HCl superiores a 5,7 M os resíduos de Triptofano apresentam-se em ambiente polar, expostos ao solvente (Figura 20 A). O *red shift* é característico de proteínas que sofreram desnaturação, ou seja, os resíduos que estavam “enterrados” na estrutura da proteína ficaram expostos quando a proteína perde sua estrutura terciária.

Assim como foi observado por dicroísmo circular, a desnaturação química monitorada por fluorescência mostrou-se dependente de concentração. Na concentração de 4,5 μM da camptosemina a $[D]_{50\%}$ obtida foi de 3,48 M de Guanidina-HCl. Já para camptosemina 10,0 μM , a $[D]_{50\%}$ foi de 4,09 M de Guanidina-HCl.

Reenovelamento ou reversibilidade refere-se à reaquisição da estrutura nativa da proteína após a desnaturação (JAENICKE; RUDOLPH, 1986). Para que fossem possíveis estudos relativos à estabilidade da camptosemina, fez-se necessário elucidar se a desnaturação química da proteína era reversível.

Para isso foi realizado um ensaio preliminar no qual amostras da camptosemina foram incubadas com uma solução 7 M de Guanidina-HCl e posteriormente diluídas para uma concentração final de Guanidina-HCl variando entre 0,48 M e 6,64 M. As amostras permaneceram incubadas *overnight* e então seus espectros de fluorescência foram obtidos.

De acordo com a figura 21, construída com base nos espectros de fluorescência obtidos, o reenovelamento foi possível após a desnaturação química não sendo observada a presença de intermediários durante o processo.

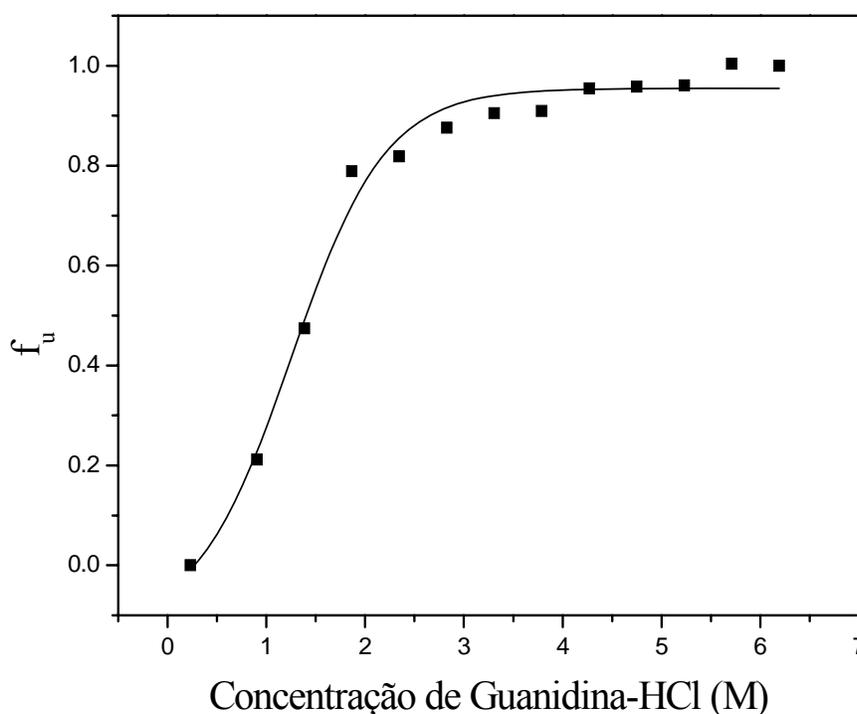


Figura 21: Curva de Reenovelamento Químico da camptosemina. Curva de reenovelamento da camptosemina (4,5 μ M em tampão Tris 20mM, NaCl 20 mM pH 8,0), monitorada através do centro de massa, expressa em termos da fração de proteínas desnaturadas, em função da concentração de Guanidina-HCl em mesmo tampão. Os espectros foram obtidos em um espectrofluorímetro ISS K2 (ISS, IL, USA), modo estático, a 22 °C, utilizando-se cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico, com comprimento de onda de excitação de 295 nm e intervalo de emissão de 300 a 400 nm.

A proteína reenovada foi submetida à cromatografia de exclusão molecular e o pico de eluição foi comparado ao da eluição da proteína nativa (figura 22).

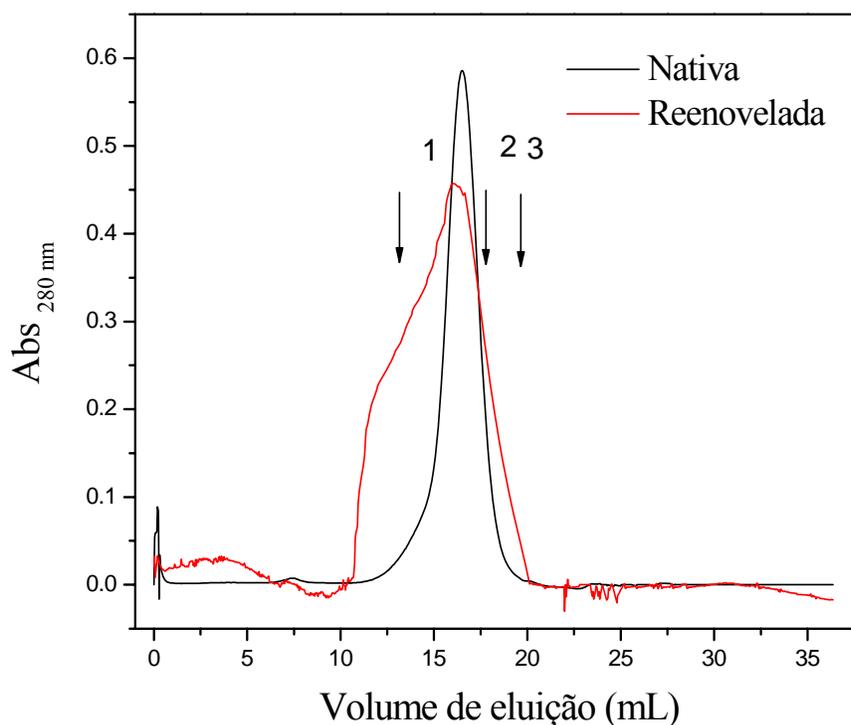


Figura 22: Cromatografia de Exclusão Molecular da camptosemina nativa e reenovada. em coluna Superdex 200. 500 μ L da camptosemina nativa (104,5 μ M) e equivalente concentração da camptosemina reenovada, ambos em tampão Tris 20 mM, 20 mM NaCl pH 8,0 foram submetidos à Cromatografia de Exclusão Molecular em coluna Superdex 200 equilibrada com tampão Tris 20 mM, 0,2 M Lactose, 0,3 M NaCl pH 8,0 mM, onde frações de 1 mL foram coletadas a um fluxo constante 1 mL/min. O perfil de eluição foi monitorado através da leitura da absorbância em 280 nm. As setas indicam a eluição dos padrões: 1) β - Amilase (200 kDa), 2) Anidrase Carbônica (30 kDa) e 3) Citocromo C (12 kDa).

O pico obtido para camptosemina reenovada é compatível ao obtido para a camptosemina nativa. Como produtos de reenovamento não são amostras homogêneas, o pico obtido com a proteína após o reenovamento não é simétrico, contendo prováveis agregados.

O *pool* constituído pelas frações de 15 a 17, que eluíram na mesma posição da proteína nativa, foi então submetido à dicroísmo circular com subsequente desconvolução do espectro obtido utilizando os programas CDSSTR e CONTINLL do pacote CD Pro (JOHNSON et al, 1986; KEIDERLING et al, 1991; YANG et al, 1986; SREERAMA et al, 1999). O programa

SELCON 3 não foi capaz de determinar uma solução para nenhuma das duas formas da proteína. Foi realizada ainda a desconvolução do espectro obtido para a camptosemina nativa. A média dos resultados obtidos pode ser observada na tabela 7.

Tabela 7: Desconvolução dos espectros da camptosemina nativa e reenovelada.

<i>Estrutura</i>	<i>Camptosemina Nativa (%)</i> ($\pm 0,04$)	<i>Camptosemina Reenovelada (%)</i> ($\pm 0,05$)
α - hélices	4,10	4,40
Folhas β	45,00	48,00
Voltas	23,00	23,00
Desordenadas	31,00	30,00

Os espectros obtidos foram analisados com os programas do pacote CDPPro, CDSSTR e CONTINLL para a análise de frações de estruturas secundárias.

Analisando a contribuição de cada elemento de estrutura secundária nas proteínas nativa e reenovelada, fica evidente que a proteína reenovelada apresenta conteúdo de estrutura secundária compatível ao da nativa, indicando que este nível de organização foi readquirido após o reenovelamento.

O reenovelamento de camptosemina também foi acompanhado por emissão de fluorescência intrínseca da proteína. Na figura 23 estão apresentados os perfis de emissão da proteína nativa, desnaturada e reenovelada.

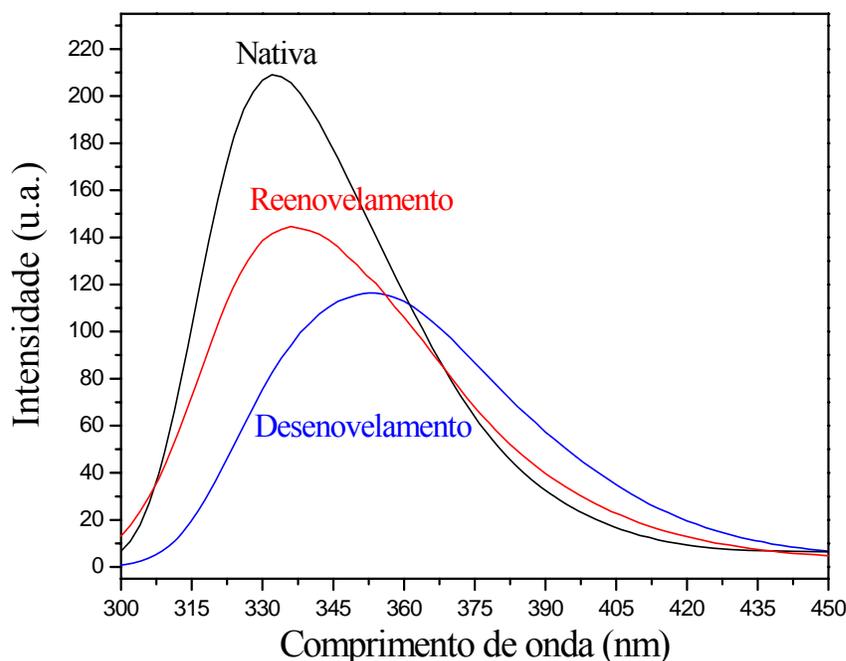


Figura 23: Perfis de Desnaturação e Reversibilidade Química da camptosemina acompanhados por Fluorescência. Os espectros de fluorescência da proteína nativa e reenovelada foram obtidos utilizando-se 200 μ L do *pool* constituído pelas frações 15-17 da eluição em Superdex 200 (DO_{280} de 0,2) e 200 μ L de tampão Tris 20 mM, 0,2 M Lactose, 0,3 M NaCl pH 8,0, em um espectrofluorímetro ISS K2 (ISS, IL, USA), modo estático, a 22 $^{\circ}$ C, utilizando-se cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico, com comprimento de onda de excitação de 295 nm e intervalo de emissão de 300 a 400 nm.

Com o desenovelamento, o máximo de emissão foi deslocado de 332 nm para 352 nm. Após o reenovelamento, o máximo de emissão retornou (*blue shift*) para 336 nm, o qual foi característico de proteína enovelada. Embora a intensidade apresentada após o reenovelamento tenha se mostrado inferior àquela da proteína nativa, os máximos de emissão observados, sugerem que o ambiente dos Triptofanos na lectina reenovelada coincide com o dos Triptofanos da lectina nativa. A diminuição na intensidade significa que o reenovelamento não foi total, ou seja, que a desnaturação não foi 100% reversível. Os resultados obtidos são compatíveis com uma reversibilidade de aproximadamente 60%.

Apesar da camptosemina readquirir a estrutura secundária, terciária e apresentar volume de eluição semelhante à proteína nativa após o reenovelamento, ainda era necessário obter informações sobre a atividade biológica. Desta forma, o *pool* constituído pelas frações de 15 a

17, relativo à eluição da proteína reenovelada, foi testado quanto a sua capacidade hemoaglutinante. Apesar de se tratar de um ensaio qualitativo, foi possível notar que a atividade hemoaglutinante de camptosemina foi restaurada após o reenovelamento. Isto indica que camptosemina readquiriu também sua atividade biológica e, provavelmente, sua estrutura nativa. Assim, os resultados somados sugerem que a reconstituição da camptosemina foi alcançada em termos de estrutura e atividade.

Transições que ocorrem com a formação de intermediários são associadas à curvas de desnaturação bifásicas ou não sobreponíveis quando diferentes técnicas espectroscópicas são usadas, monitorando diferentes propriedades da proteína (SINHA et al, 2005).

Quando observadas separadamente, as curvas de desnaturação de camptosemina obtidas por Dicroísmo Circular e por Fluorescência, não apresentam evidências da presença de intermediários de transição. Quando observadas em conjunto, é possível notar grande conformidade entre os resultados das duas técnicas, sendo as duas curvas quase que totalmente sobreponíveis (figura 24). A sobreposição dos dados obtidos pelas duas técnicas demonstra que camptosemina perde as estruturas secundária e terciária concomitantemente.

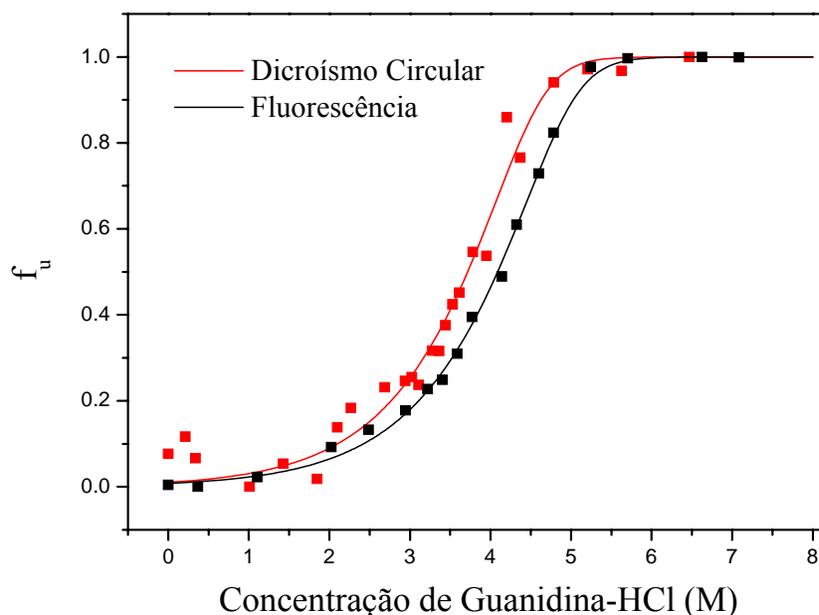


Figura 24: Comparação das curvas de desnaturação química de camptosemina por dicroísmo circular e fluorescência. Os espectros de CD e fluorescência apresentados foram obtidos com camptosemina 9 μ M e 10 μ M, respectivamente.

Segundo Mitra et al (2002), a ausência de intermediários enovelados sugere que as interações intersubunidades têm papel fundamental na estabilidade de proteínas oligoméricas onde uma significativa porcentagem da estabilidade conformacional do oligômero dá-se através de interações quaternárias. Desta forma, os protômeros isolados são menos estáveis ou completamente instáveis e por isso não são detectados.

A análise dos resultados obtidos com concentrações diferentes de proteína mostra que a desnaturação da camptosemina é dependente da concentração. No modelo de dois estados a $[D]_{50\%}$ é definida como a concentração de desnaturante na qual a fração de tetrâmeros enovelados é igual à fração de monômeros desnaturados. É nesta concentração que $K = 0,5Pt^3$ e desta forma, a concentração de desnaturante $[D]_{50\%}$ é dependente da concentração de proteína sendo esperada a alteração do valor de $[D]_{50\%}$ com a concentração de proteína. .

A inexistência de intermediários de transição e sobreposição das curvas de desnaturação analisadas por técnicas diferentes aliadas à reversibilidade apresentada pela proteína após desnaturação, permite tratar camptosemina como uma proteína que segue uma dinâmica de dois estados. Desta forma, apenas são observadas duas espécies no equilíbrio: tetrâmeros completamente enovelados (N_4) e monômeros completamente desenovelados (U).

Os dados obtidos na desnaturação da camptosemina, acompanhados por CD e Fluorescência foram ajustados separadamente de acordo com o modelo de dois estados, sendo as curvas para cada concentração de proteína traçadas individualmente de acordo com a equação 7 apresentada no apêndice (figuras 19 e 20). Os parâmetros termodinâmicos associados a estes ajustes são apresentados na tabela 8.

O $\Delta G_{H_2O}^{N_4 \leftrightarrow 4D}$ é a diferença entre a energia livre de 1 mol de tetrâmeros e 4 moles de monômeros na ausência de desnaturante. Caso o modelo de desnaturação esteja sendo corretamente utilizado, os valores de $\Delta G_{H_2O}^{N_4 \leftrightarrow 4D}$ devem ser constantes em todas as concentrações de proteínas (MALLAM; JACKSON, 2005). Ainda segundo os mesmos autores os valores de m , que mede a variação da energia livre de acordo com a variação da concentração de Guanidina-HCl, também devem ser mantidos constantes.

Tabela 8: Parâmetros termodinâmicos do ajuste dos dados de desnaturação química da camptosemina em um modelo de dois estados.

<i>Far-UV CD</i>				Fluorescência			
<i>Pt</i> (μ M)	$[D]_{50\%}$ (M Gdn-HCl)	$m_{n_4 \leftrightarrow 4D}$ (KJ mol ⁻¹ M ⁻¹)	$\Delta G_{H_2O}^{N_4 \leftrightarrow 4D}$ (KJ mol ⁻¹)	<i>Pt</i> (μ M)	$[D]_{50\%}$ (M Gdn-HCl)	$m_{n_4 \leftrightarrow 4D}$ (KJ mol ⁻¹ M ⁻¹)	$\Delta G_{H_2O}^{N_4 \leftrightarrow 4D}$ (KJ mol ⁻¹)
9,0	3,72±0,05	10,60 ±0,6	125,99 ±0,03	4,5	3,49±0,02	10,70 ±0,3	129,716 ±0,006
19,5	4,82±0,07	9,80 ±0,7	128,6 ±0,05	10,0	4,09±0,02	10,30 ±0,2	128,718 ±0,004

Parâmetros calculados em termos da concentração de monômeros.

Assim como acontece com a lectina de *Erythrina indica* (GHOSH; MANDAL, 2006) camptosemina apresenta diferença de aproximadamente 1 M nas $[D]_{50\%}$ obtidas na desnaturação das duas concentrações de proteína utilizadas. Apesar disto, os valores obtidos para m e $\Delta G_{H_2O}^{N_4 \leftrightarrow 4D}$ se mantêm praticamente constantes, como esperado para o modelo de dois estados e em conformidade com os obtidos para concanavalina A quando analisados na mesma faixa de temperatura e mediante mesmo modelo (SINHA et al, 2005).

Embora a forma de associação da camptosemina não seja conhecida, sabe-se que a estabilidade das lectinas de legume está ao menos em parte relacionada aos modos de oligomerização apresentados por estas proteínas (SRINIVAS et al, 2001). Além disso, a ausência de intermediários de desnaturação detectáveis apontam para fortes interações intersubunidades. Estes dois fatores podem ajudar a elucidar a grande estabilidade apresentada por camptosemina quando submetida à desnaturação térmica e química.

4.12 Estabilidade em função do pH analisada por Fluorescência Extrínseca.

A fim de se analisar possíveis mudanças conformacionais da camptosemina, devida a mudança do pH do meio, o ANS foi utilizado como uma sonda para observação de exposição ou oclusão de regiões hidrofóbicas na estrutura da proteína (figura 25).

O *1-Anilino-8-Naphthalene Sulfonate* (ANS) é uma sonda hidrofóbica utilizada quando se deseja obter informações à respeito das alterações conformacionais que ocorrem nas proteínas (SCHÖNBRUNN et al, 2000). Em meio aquoso, o rendimento quântico do ANS é extremamente baixo porém um considerável aumento acontece quando o mesmo interage de forma inespecífica com regiões hidrofóbicas de proteínas (ENGELHARD; EVANS, 1995). Ao se ligar ocorre aumento na intensidade de fluorescência emitida acompanhada por um deslocamento do máximo de emissão (*blue shift*) de 520 nm para 470 nm (CHATTERJEE; MANDAL, 2003).

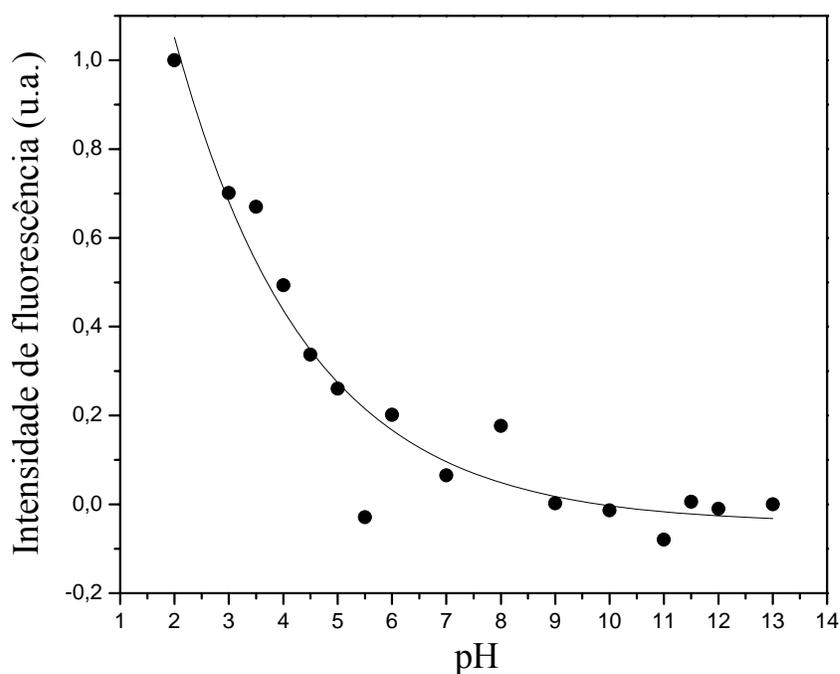


Figura 25: Fluorescência Extrínseca As medidas foram realizadas em um espectrofluorímetro ISS K2 (ISS, IL, USA), modo estático, a 22 °C, em cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico, com comprimento de onda de excitação de 360 nm e intervalo de emissão de 400 a 600 nm. Utilizou-se 395 µL de tampão Acetato Fosfato Borato 20 mM, em cada um dos pHs desejados, 5 µL da camptosemina 264,8 µM em tampão Tris 20 mM, 20 mM NaCl pH 8,0 e 1 µL de solução de ANS 57,5 mM em água.

Embora demonstrado por Goto (2007) que a camptosemina apresenta-se enovelada em toda faixa de pH testada, é possível observar pelo ensaio de ligação que a afinidade de ligação do ANS pela proteína decresce conforme o pH varia de ácido para básico. Isto significa que ocorre exposição de regiões hidrofóbicas na superfície da proteína conforme o pH se torna ácido.

Acredita-se que o perfeito balanço entre exposição e oclusão de regiões hidrofóbicas se dê em torno do pH fisiológico (pH 7-8) e que em pHs ácidos pode estar acontecendo relativa abertura da estrutura tetramérica com conseqüente exposição de regiões hidrofóbicas presentes nas interfaces de ligação dos protômeros da proteína. Por outro lado, em pHs básicos, a estrutura quaternária pode se tornar levemente mais compacta ocluindo regiões normalmente expostas quando a lectina encontra-se em condições fisiológicas.

5 Conclusões

Este trabalho relata o êxito obtido no isolamento de uma nova lectina a partir das sementes de *Camptosema ellipticum*, utilizando-se Cromatografia de Exclusão Molecular e Cromatografia de Troca Iônica.

Camptosemina é uma proteína constituída por quatro protômeros de aproximadamente 26 kDa, com afinidade de ligação a N-acetilgalactosamina e cuja estrutura primária apresenta 58 % de identidade com a seqüência de aminoácidos de uma lectina presente na casca de *Robinia pseudoacacia*, expressa pelo clone LECRPA4.

Ao contrário do que acontece com a maioria das lectinas da família das leguminosas, camptosemina foi capaz de causar hemoaglutinação após ter sido submetida à desmetalização porém, mais estudos precisam ser realizados para a elucidação deste resultado.

Os ensaios de desnaturação-reenovelamento apontam para um modelo de desnaturação reversível de dois estados onde o tetrâmero completamente enovelado dá origem a 4 monômeros completamente desnaturados, sem a observação de intermediários. Através do T_m e do $\Delta G_{H_2O}^{N_4 \leftrightarrow 4D}$ obtidos, nota-se que camptosemina é uma proteína muito resistente à desnaturação provocada por temperatura e por agente caotrópico, como é demonstrado também para outras lectinas pertencentes à mesma família.

6 Referências Bibliográficas

- BOTELHO, M. G. et al. Folding and stability of the extracellular domain of the human amyloid precursor protein. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 36, p. 34259–34267, 2003.
- BOYD, W. C.; SHAPLEIGH, E. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins), **Science**, v. 119, p. 419, 1954.
- BRINDA, K. V. et al. Determinants of quaternary association in legume lectins. **Protein Sci.**, v. 13, p. 1735–1749, 2004.
- CHANDRA, N. R. et al. Structural similarity and functional diversity in proteins containing the legume lectin fold. **Protein Eng.**, v. 14, n.11, p. 857-866, 2001.
- CHATTERJEE, A.; MANDAL, D.K. Denaturant-induced equilibrium unfolding of concanavalin A is expressed by a three-state mechanism and provides an estimate of its protein stability. **BBA**, v. 1648, p. 174-183, 2003.
- CHRISPEELS, M. J. Biosynthesis, processing and transport of storage proteins and lectins in cotyledons of developing legume seeds. **Phil.Trans.R.Soc.Lond.B**, v. 304, p. 309-322, 1984.
- DAM, T. K. et al. Diocleinae lectins are a group of proteins with conserved binding sites for the core trimannoside of asparagine-linked oligosaccharides and differential specificities for complex carbohydrates. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 20, p. 12082–12088, 1998.
- DEMCHENKO, A. P. Concepts and misconcepts in the analysis of simple kinetics of protein folding. **Curr. Protein Pept. Sci.**, v. 2, p. 73-98, 2001.
- DILL, K. A.; CHAN, H. S. From Levinthal to pathways to funnels. **Nat. Struct. Biol.**, v. 4, p.10-19, 1997.
- DODD, R. B.; DRICCKAMER, K. Lectin-like proteins in model organisms: implications for evolution of carbohydrate-binding activity. **Glycobiology**. v.11, p. 71-79, 2001.
- ENGELHARD, M.; EVANS, P. A. Kinetics of interaction of partially folded proteins with a hydrophobic dye: Evidence that molten globule character is maximal in early folding intermediates. **Protein Sci.**, v. 4, p. 1553-1562, 1995.
- ETZLER, M. E. et al. Subcellular localization of two Dolichos biflorus lectins, **Plant Physiol.**, v. 76, p. 871-8, 1984.
- FREIFELDER, D. **Physical Biochemistry**: applications to biochemistry and molecular biology. 2nd ed. s.l.: Freeman and Company.1999.
- GASTEIGER, E. et al. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. (In) WALKER, J. M. **The proteomics protocols handbook**, Humana Press, 2005, p. 571-607.

GHOSH, S.; MANDAL, D. K. Kinetic stability plays a dominant role in the denaturant-induced unfolding of *Erythrina indica* lectin. **BBA**, v. 1976, p. 1021-1028, 2006.

GOLDSTEIN, I. J.; PORETZ, R. D. Isolation, physicochemical characterization, and carbohydrate-binding specificity of lectins. In: LIENER, I. E.; SHARON, N.; GOLDESTINE, I. J. **The Lectins, Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine**. Orlando, FL: Academic Press, 1986, p. 33–247.

GOTO, L. S. Estudos estruturais e funcionais da cadeia B recombinante da pulchellina e camptosemina. 2007. 182 p. Tese (Doutorado Física Biomolecular) – Grupo de Ciências Biomoleculares Sérgio Mascarenhas, IFSC, São Carlos, 2007.

GREENE, R. F.; PACE, C.N. Urea and guanidine hydrochloride denaturation of ribonuclease, lysozyme, α -chymotrypsin, and β -lactoglobulin. **J. Biol. Chem.**, v. 249, p. 5388-5393, 1974.

JAENICKE, R.; RUDOLPH, R. Refolding and association of oligomeric proteins. **Methods Enzymol.**, v. 131, p. 218-250, 1986.

JOHNSON, A. E. Fluorescence approaches for determining protein conformations, interactions and mechanisms at membranes. **Traffic**, v.6, p. 1078–1092, 2005.

JOHNSON, C. R. ET AL. Thermodynamic analysis of the structural stability of the tetrameric oligomerization domain of p53 tumor suppressor. **Biochem.**, v. 24, p. 5309-5316, 1995.

JOHNSON, W. C. Jr. et al. Analysis of protein circular dichroism spectra for secondary structures using a simple matrix. Multiplication. **Anal. Biochem.**, v.155, p. 155-167, 1986.

KEIDERLING et al. Systematic comparison of statistical analysis of electronic and vibrational circular dichroism for secondary structure prediction of selected proteins. **Biochemistry**, v. 30, p. 6885-6895, 1991.

KELLY, S. M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. **BBA**, v. 1751, p. 119-139, 2005

KELLY, S. M.; PRICE, N. C. The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding. **BBA**, v. 1338, p. 161-185, 1997.

KELLY, S. M.; PRICE, N. C. The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. **Curr. Protein Pept. Sci.**, v. 1, p. 349-384, 2000.

KENNEDY, J. F. et al. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydr. Polym.**, v. 26, p. 219-230, 1995.

LACKEY, J. A. Tribe 19. Phaseoleae DC. In: POLHILL, R. M.; RAVEN, P. H. **Advances in legume systematics**, Kew: Royal Botanic Gardens, 1981, p. 301-327.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 2nd. New York: Plenum Publishers, 1999.

LEVINTHAL, C. Are there pathways for protein folding?. **J. Chim. Phys. PCB**, v. 65, p. 44–5, 1968.

LORIS, R. et al.. Legume lectin structure. **BBA**, v. 1383, p. 9-36,1998.

MALLAM, A. L.; JACKSON, S. E. Folding studies on a knotted protein. **J. Mol. Biol.**, v. 346, p. 1409–1421, 2005.

MANOJ, N.; SUGUNA, K. Signature of quaternary structure in the sequences of legume lectins. **Protein Eng.**, v. 14, n. 10, p. 735-745, 2001.

MITRA, N. et al. Conformational stability of legume lectins reflect their different modes of quaternary association: solvent denaturation studies on concanavalin A and winged bean acidic agglutinin. **Biochemistry**, v. 41, p. 9256-9263, 2002.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger**: Principles of biochemistry. 4 th., New York: W. H. Freeman and Company, 2005 .

NGAI, P. H.; NG, T. B. A lectin with antifungal and mitogenic activities from red cluster pepper (*Capsicum frutescens*) seeds. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 74, n. 2, p. 366-71, 2007. Epub 2006.

ONUCHIC, J. N.; LUTHEY-SCHULTEN, Z.; WOLYNES, P. G. Theory of protein folding: The energy landscape perspective. **Annu. Rev. Phys. Chem.**, v. 48, p. 545–600, 1997.

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

POROD, G. General theory. *In* **O. Glatter and O. Kratky hexadecyltrimethylammonium-exchanged Small-angle x-ray scattering**. New York: Academic Press, 1982, p. 17–51.

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

SCHARNAGL, C.; REIF, M.; FRIEDRICH, J. Stability of proteins: Temperature, pressure and the role of the solvent. **BBA**, v. 1749, p. 187– 213, 2005.

SCHÖNBRUNN, E. et al. Structural basis for the interaction of the fluorescence probe 8-anilino-1-naphthalene sulfonate (ANS) with the antibiotic target MurA. **Proc. Natl Acad. Sci.**, v. 97, n. 12, p. 6345-6349, 2000.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14, n.11, p. 53-62, 2004.

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

SHERRY, A. D.; BUCK, A. D.; PETERSON, C. A. Sugar binding properties of various metal ion induced conformations in concanavalin A. **Biochemistry.** v. 17, n. 11, p. 2169 – 2173, 1978.

SINHA S. et al. Unfolding studies on soybean agglutinin and concanavalin A tetramers: A comparative account. **Biophys. J.**, v. 88, p. 1300–1311, 2005.

SREERAMA, N. et al. Estimation of the number of α -helical and β -strand segments in proteins using CD spectroscopy. **Protein Sci.**, v. 8, p. 370-380, 1999.

SRINIVAS, V. R. et al. Legume lectin family, the 'natural mutants of the quaternary state', provide insights into the relationship between protein stability and oligomerization. **BBA**, v.1527, p. 102-111, 2001.

SVERGUN, D. I.; BARBERATO C.; KOCH, M. H. J. Crysol - A program to Evaluate X-ray Solution Scattering of Biological Macromolecules from Atomic Coordinates. **J. Appl. Cryst.**, v. 28, p. 768 – 773, 1995.

SVERGUN, D. I.; KOCH, M. H. J. Small angle scattering studies of biological macromolecules in solution. **Rep. Prog. Phys.**, v. 66, p. 1735-1782, 2003.

SVERGUN, D. I.; PETOUKHOV, M. V.; KOCH, M. H. J. Determination of domain structure of proteins from X-Ray solution scattering. **Biophys. J.**, v. 80, p. 2946-2953, 2001.

SVERGUN, D. I.; SEMENYUK, A. V. Gnom – A program package for small angle scattering data processing. **J. Appl. Cryst.**, v. 24, p. 537-540, 1991.

TECHNICAL BULLETIN: Sigma P7367. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/sigma/bulletin/P7367bul.pdf>>. Acesso em: 05/2007.

TRINDADE, M. B. et al. Structural characterization of novel chitin-binding lectins from the genus *Artocarpus* and their antifungal activity. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1764, n. 1, p. 146-52, 2006. Epub 2005.

VAN DAMME, E. J. M. et al. Cytoplasmatic/nuclear plant lectins: a new story. **Trends Plant Sci.**, v. 9, p. 10, 2004.

VAN DAMME, E. J. M. et al. **Handbook of Plant Lectins: Properties and Biomedical Applications.** Chichester , UK: John Wiley & Sons, 1998.

VAN PARIJS, J. et al. Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. **Planta**, v. 183, p. 258–262, 2006.

VARELA, E.D. et.al. Relationships in subtribe Diocleinae (Leguminosae; Papilionoideae) inferred from internal transcribed spacer sequences from nuclear ribosomal DNA. **Phytochemistry**, v. 65, p. 59-69, 2004.

VIJAYAN, M.; CHANDRA, N. Lectins. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 9, n. 6, p. 707-714, 1999.

WATKINS, W. M.; MORGAN, W. T. J. Neutralization of the anti-H agglutinin in eel serum by simple sugars. **Nature**, v. 169, p. 825-826, 1952.

WEIS, W. I.; DRICKAMER, K. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 65, p. 441-473, 1996.

YANG, J. T. et al. Calculation of protein conformation from circular dichroism. **Meth. Enzymol.** v. 130, p. 208-269, 1986.

YE, X. Y. et al. Isolation of a homodimeric lectin with antifungal and antiviral activities from red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. **J. Protein. Chem.**, v. 20, n. 5, p. 367-75, 2001.

YON, J. M. Protein folding: concepts and perspectives. **CMLS.**, v. 53, p. 557-567, 1997.

YOSHIDA, K.; TAZAKI, K. Expression patterns of the genes that encode lectin or lectin-related polypeptides in *Robinia pseudoacacia*. **Aust. J. Plant Physiol.**, v. 26, p. 495-502, 1999.

7 Apêndice

Apêndice

- Cálculo das energias livres de desnaturação da camptosemina.

Os dados de desnaturação foram ajustados de acordo com um modelo de dois estados, onde o tetrâmero nativo (N_4) está em equilíbrio com o monômero desnaturado (D) (JOHNSON et al, 1995; MALLAM; JACKSON, 2005):



sendo a constante de equilíbrio de desnaturação definida por:

$$K = [U]^4 / [N_4] \quad (2)$$

A concentração total da proteína em termos de monômero (Pt) é descrita por:

$$Pt = 4[N_4] + [U] \quad (3)$$

As frações de proteína nativa (Fn) e desnaturada (Fu) são dadas, respectivamente, por:

$$Fn = 4[N_4] / Pt \quad (4)$$

$$Fu = [U] / Pt \quad (5)$$

O rearranjo das equações 2 à 5 resultam na seguinte equação de 4ª ordem:

$$Fu^4 + (FuK / 4Pt^3) - (K / 4Pt^3) = 0 \quad (7)$$

K pode ser definido de acordo com o modelo de energia livre linear (GREENE; PACE, 1974), no qual a energia livre de desnaturação varia linearmente com a concentração do desnaturante:

$$\Delta G_u = -RT \ln(K) = \Delta G_{H_2O} - m[D] \quad (8)$$

na qual [D] corresponde à concentração do desnaturante.

ΔG_{H_2O} é a energia livre de desnaturação na ausência de desnaturante e m é uma constante de proporcionalidade da mudança da energia livre em função da concentração de desnaturante.

$[D]_{50\%}$ é definida como a concentração de desnaturante na qual $Fn=Fu=0,5$. Nesta concentração:

$$[U] = 0,5Pt \quad \text{e} \quad 4[N_4] = 0,5Pt$$

$$K = [U]^4 / [N_4] \Rightarrow K = 0,5Pt^3$$

Substituindo K em 8:

$$\Delta G_{H_2O} = -RT \ln(0,5Pt^3) + m[D]_{50\%} \quad (9)$$

Apêndice

Desta forma:

$$K = \exp\left\{\left[RT \ln(0,5Pt^3)\right] / RT - m([D]_{50\%} - [D]) / RT\right\}$$

Os dados obtidos nos ensaios de CD e Fluorescência foram ajustados de acordo com a solução adequada extraída da equação 7, utilizando o programa MATHEMATICA®.