

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**Estrutura Cristalográfica da Lectina de Sementes da *Canavalia*
maritima Aub. em Complexo com o Ácido Gama-Aminobutírico
(GABA) e a Adenina Revela Novas Características Estruturais e
Prediz Mecanismo Anti-Herbivoria**

José Caetano da Silva Filho

João Pessoa – PB

2013

José Caetano da Silva Filho

Estrutura Cristalográfica da Lectina de Sementes da *Canavalia maritima* Aub. em Complexo com o Ácido Gama-Aminobutírico (GABA) e a Adenina Revela Novas Características Estruturais e Prediz Mecanismo Anti-Herbivoria

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Ciências Exatas e da Natureza da Universidade Federal da Paraíba como um dos requisitos para a obtenção do título de **Mestre em Biologia Celular e Molecular.**

Orientador: Prof. Dr. Plínio Delatorre

João Pessoa - PB

2013

S586e Silva Filho, José Caetano da
Estrutura cristalográfica da lectina de sementes da
Canavalia maritima Aub, em complexo com o ácido gama-
aminobutírico (GABA) e a adenina revela novas características
estruturais e prediz mecanismo anti-herbivoria / José Caetano
da Silva Filho.- João Pessoa, 2013.
108f. : il.
Orientador: Plínio Delatorre
Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCEN
1. Biologia celular e molecular. 2. Lectina. 3. GABA.
4. Adenina. 5. Estrutura cristalográfica. 6. Atividade inseticida.

UFPB/BC

CDU: 576+577.2(043)

José Caetano da Silva Filho

Dissertação de Mestrado avaliada em 16/08/2013

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Plínio Delatorre

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – Universidade Federal da Paraíba
Orientador

Prof. Dr. Clayton Zambeli Oliveria

Universidade Federal da Paraíba
Examinador Externo

Profa. Dra. Tatiane Santi-Gadelha

Universidade Federal da Paraíba
Examinadora Interna

Prof. Dr. Eleonidas Moura Lima

Universidade Federal da Paraíba
Suplente Interno

AGRADECIMENTOS

- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa disponibilizada, permitindo que me dedicasse integralmente ao Programa;
- À Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, pela oportunidade concedida de aprofundar e adquirir novos conhecimentos;
- Ao Prof. Dr. Plínio Delatorre, que vem me orientando desde o início de minha graduação e quem tem me ensinado de forma direta e indireta a me apaixonar mais ainda pelo estudo estrutural de proteínas;
- A todos os professores do Programa com os quais tive oportunidade de ter contato durante as aulas pelos aprendizados e ensinamentos repassados;
- À Anne Ludmilla, secretária do Programa, por sempre estar disposta e solícita a resolver os problemas “burocráticos” dos alunos;
- Ao mestre Raphael Batista da Nóbrega, pela troca de conhecimentos;
- À minha esposa, Adlane Florentino, companheira e amiga incondicional que tem estado ao meu lado desde minha entrada na graduação, dando força e estimulando minha vida acadêmica. A ela todo meu agradecimento;
- Aos meus pais, José Caetano e Maria Salomé, por tudo o que fizeram por mim durante todos estes anos e principalmente por tudo o que passaram para que eu pudesse estudar aqui em João Pessoa;
- E aos meus companheiros da turma 2012.1 do Programa, pela troca de conhecimentos e pelos momentos divertidos.

RESUMO

Plantas são organismos sésseis que encontram-se susceptíveis a estresses bióticos e abióticos. O ataque de insetos herbívoros é um fator que afeta sua sobrevivência e seu desenvolvimento. Como defesa, estes organismos são capazes de produzir e liberar compostos químicos, como aminoácidos não proteicos, que interferem no desenvolvimento dos insetos agressores, e utilizam fitohormônios para regular suas respostas de defesa. No presente trabalho, buscamos entender o papel inseticida da ConM, uma lectina isolada de sementes do feijão-de-praia (*Canavalia maritima* Aub.), a partir da análise de sua estrutura tridimensional em complexo com o aminoácido não proteico GABA (ácido gama-aminobutírico) e com a base nitrogenada adenina, precursora das citocininas, fitohormônios envolvidos com processos de defesa contra insetos herbívoros. Para tanto, resolvemos a estrutura cristalográfica da ConM co-cristalizada com o GABA e *soaked* com a adenina 5mM. O modelo monomérico da lectina mostrou que o GABA encontra-se coordenado por interações com resíduos de aminoácidos previamente reportados como sendo participantes da estabilização do ácido alfa-aminobutírico (Abu). A adenina, por outro lado, é estabilizada por interações com resíduos constituintes do domínio de reconhecimento a carboidrato da ConM, o que pode ser explicado pela presença de uma região hidrofóbica adjacente a este sítio, formada por uma estrutura secundária não repetitiva do tipo β -*bulge*. Um modelo dimérico da ConM revela que a atividade inseticida de lectinas está relacionada com mudanças conformacionais da Gln132, permitindo que o GABA seja liberado sem alteração da estrutura quaternária. Assim, os resultados aqui apresentados podem contribuir para um maior entendimento acerca da capacidade de interação de lectinas vegetais com diferentes tipos de ligantes, facilitando sua utilização como ferramenta biotecnológica.

Palavras-chave: lectina, GABA, adenina, estrutura cristalográfica, atividade inseticida

ABSTRACT

Plants are sessile organisms susceptible to biotic and abiotic stresses. Insect herbivore attacks are factors that affect their survival and development. To defend themselves, plants produce and release chemical compounds, such as non protein amino acids, that negatively affect the development processes of their attackers, as well as use phytohormones that regulate defense responses against herbivory. In the present work, we seek to understand in depth the insecticidal activity related to ConM, a lectin isolated from beach bean seeds (*Canavalia maritima* Aub.), through their crystal structure analysis in complex with the non protein amino acid GABA (gamma-aminobutyric acid) and adenine, a nitrogen base-precursor of cytokinins, phytohormones involved in defense responses against insect herbivores. In this way, we co-crystallized ConM with GABA and soaked the derived crystals into an adenine 5mM solution. It was viewed through ConM monomeric model that GABA stabilization occurs through interactions displayed with amino acid residues that participate in the coordination of its isomer alpha-aminobutyric acid (Abu). In the other hand, adenine molecule displays interactions with amino acid residues from ConM Carbohydrate Recognition Domain due a hydrophobic pocket adjacently localized to this ligand-binding site and formed from a secondary non repetitive structure of β -bulge. A dimeric model of ConM reveals that lectin insecticidal activity is related to conformational changes of Gln132, resulting in GABA release without quaternary structure change. Hence, the presented results might contribute to greater understanding of lectins interactions with different chemical ligands, helping their application as biotechnological tools.

Key words: lectin, GABA, adenine, crystal structure, insecticidal activity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Esquematização da ação aglutinante das lectinas.....	4
Figura 2 Maturação da ConA através do processo de permutação circular	7
Figura 3 Coordenação dos íons Ca^{2+} e Mn^{2+}	9
Figura 4 Características gerais do arranjo tridimensional das lectinas Diocleinae	11
Figura 5 Estruturas quaternárias de lectinas de leguminosas	11
Figura 6 Alinhamento das estruturas primárias de lectinas Diocleinae	13
Figura 7 Domínio de Reconhecimento a Carboidrato (CRD)	14
Figura 8 Sobreposição do CRD da ConM e da DBL	14
Figura 9 Ilustração de um poço da placa de cristalização	19
Figura 10 Padrão de difração de raios X	20
Figura 11 Esquematização do processo de modelagem molecular.....	23
Figura 12 Coordenação dos íons divalentes Ca^{2+} e Mn^{2+}	27
Figura 13 Representações esquemáticas de estruturas secundárias não repetitivas.....	29
Figura 14 Pseudohélices identificadas no monômero da ConM.....	32
Figura 15 β - <i>bulges</i> identificadas na estrutura tridimensional da ConM	34
Figura 16 Estabilização do GABA no bolsão hidrofóbico da ConM.....	36
Figura 17 Modelo em superfície do sítio de ligação ao GABA	38
Figura 18 Bolsão hidrofóbico em “L”	40
Figura 19 Modelo de arranjo biológico para o complexo ConM/GABA	41
Figura 20 Ligação da adenina ao CRD da ConM.....	43
Figura 21 Estruturas moleculares de citocininas.....	44
Figura 22 <i>Docking</i> molecular da ConM com as citocininas tZEA e KIN	46
Figura 23 <i>Docking</i> molecular da ConM com a citocinina ZIP	47
Figura 24 <i>Docking</i> molecular do complexo ConM/adenina com dissacarídeos.....	52
Figura 25 <i>Docking</i> molecular do complexo ConM/tZEA com dissacarídeos.....	53
Figura 26 <i>Docking</i> molecular dos complexos ConM/trelose e ConM/MAN13 com a tZEA	54
Figura 27 Padrões de hélices mais comuns em proteínas globulares	56
Figura 28 Alinhamento das estruturas primárias de lectinas Diocleinae com estruturas tridimensionais resolvidas	59
Figura 29 CRD da ConM complexada com a adenina e o grupo indol.....	60

Figura 30 Gráficos de Ramachandran para os três resíduos de aminoácidos que constituem a βB2	61
Figura 31 Região hidrofóbica adjacente ao CRD da ConM.....	63
Figura 32 Estruturas cristalográficas de lectinas <i>Canavalia</i> spp. em complexo com aminoácidos não proteicos.....	66
Figura 33 Loop Ser117-Glu122 nas estruturas cristalográficas de lectinas <i>Canavalia</i> spp. em complexo com aminoácidos não proteicos.....	67
Figura 34 Disposição da Gln132 em relação ao Glu183	74
Figura 35 Estrutura cristalográfica da ConBr em complexo com o GABA	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Dados estatísticos da estrutura cristalográfica do complexo ConM/GABA/adenina	26
Tabela 2 Classificação das β-turns.....	30
Tabela 3 <i>Tight-turns</i> identificadas na estrutura terciária da ConM	31
Tabela 4 β-turns identificadas na estrutura terciária da ConM.....	32
Tabela 5 Interações hidrofóbicas que estabilizam a molécula de GABA.....	37
Tabela 6 Interações hidrofóbicas que estabilizam a adenina	43
Tabela 7 Interações hidrofóbicas que estabilizam a tZEA	48
Tabela 8 Interações hidrofóbicas que estabilizam a KIN.....	49
Tabela 9 Interações hidrofóbicas que estabilizam a ZIP.....	50
Tabela 10 Interações hidrofóbicas que formam o sítio hidrofóbico adjacente ao CRD da ConM.....	63

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	I
RESUMO	II
ABSTRACT	III
LISTA DE FIGURAS	IV
LISTA DE TABELAS	VI
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	4
2.1 LECTINAS	4
2.2 LECTINAS VEGETAIS.....	5
2.2.1 Lectinas de Leguminosas	6
2.2.1.1 ConM ₁ uma Lectina Extraída das Sementes da <i>Canavalia maritima</i> Aub.	8
2.2.2 Estrutura das Lectinas.....	8
2.2.3 Domínio de Reconhecimento a Carboidrato	12
2.2.4 Sítios Hidrofóbicos	15
3. OBJETIVOS	17
4. MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1 CRISTALIZAÇÃO	18
4.2 COLETA DE DADOS DE DIFRAÇÃO DE RAIOS X	20
4.3 RESOLUÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA ConM COMPLEXADA COM O GABA E A ADENINA	21
4.3.1 Integração das Imagens	21
4.3.2 Escalonamento	22
4.3.3 Substituição Molecular	22
4.3.4 Modelagem Molecular e Refinamento.....	23
4.4. DOCKING MOLECULAR.....	24
5. RESULTADOS	25
5.1 CRISTALIZAÇÃO E DIFRAÇÃO DE RAIOS X	25
5.2 ESTRUTURA GERAL.....	25
5.3 COORDENAÇÃO DO GABA	35
5.4 COORDENAÇÃO DA ADENINA.....	42

5.5 DOCKING MOLECULAR.....	44
5.5.1 Complexos entre Lectinas e Citocininas.....	44
5.5.2 Complexos entre Lectinas, Açúcares, Adenina e Citocininas.....	51
6. DISCUSSÃO	55
6.1 ESTRUTURAS SECUNDÁRIAS NÃO REPETITIVAS.....	55
6.2 DOMÍNIO DE LIGAÇÃO A AMINOÁCIDOS NÃO PROTEICOS	65
6.3 LIGAÇÃO DA ConM A CITOCININAS	68
6.4 LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO NÃO CONVENCIONAIS	70
6.5 RELAÇÃO ESTRUTURA-FUNÇÃO: UM MODELO DE MECANISMO PARA A ATIVIDADE INSETICIDA DE LECTINA.....	71
7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	81
8. REFERÊNCIAS.....	83

1. INTRODUÇÃO

Plantas são organismos autótrofos que desempenham funções vitais nos ecossistemas onde estão presentes, não só por prover a atmosfera com oxigênio como também por servir de fonte alimentícia para diversos outros seres vivos. Para o homem, além destes fatores, são economicamente importantes devido à agricultura e por proverem matéria prima utilizada em diversos segmentos industriais.

Sendo sésseis, as plantas encontram-se mais susceptíveis a estresses ambientais e biológicos. No primeiro caso, a seca, salinidade do solo e da água, temperatura e hipoxia, por exemplo, são fatores que afetam o crescimento e o desenvolvimento destes organismos. No segundo, infecção por diferentes tipos de patógenos (MANDADI; SCHOLTHOF, 2013) e ataque de insetos e mamíferos herbívoros (KESSLER; BALDWIN, 2002) contribuem para que sua sobrevivência fique comprometida. Entretanto, devido à disponibilidade limitada de nutrientes, é necessário que as plantas discriminem uma simples injúria, como rompimento de folhas devido ação de ventos, daquela provocada, por exemplo, por um inseto herbívoro, visto que um balanço entre crescimento e defesa deve existir para a alocação de suas reservas energéticas (HERMS; MATTSON, 1992; NEILSON et al., 2013). Neste sentido, estes organismos foram capazes de desenvolver, durante seu processo evolutivo, mecanismos de percepção de substâncias provenientes de seus agressores, como, por exemplo, conjugados de ácidos graxos e aminoácidos presentes nas secreções orais de muitas larvas de insetos (DINH; BALDWIN; GALIS, 2013) que desencadeiam respostas de defesa que dependem de moléculas sinalizadoras como cAMP (JIANG; FAN; WU, 2005; MA et al., 2009) e açúcares (SHIBUYA; MINAMI, 2001; HODGE et al., 2013). Além disso, as plantas utilizam fitohormônios envolvidos com o crescimento e desenvolvimento, como ácido abscísico, auxinas, citocininas e giberelinas, como moléculas com atividade de defesa em adição àqueles que atuam especificamente neste contexto imunológico, como jasmonatos, ácido salicílico e etileno (VAN HUIJSDUIJNEN et al., 1986; PIETERSE; DICKE, 2007; ROBERT-SEILANIAN et al., 2007; ERB et al., 2008; ERB; MELDAU; HOWE, 2012).

Para minimizar e contra-atacar os efeitos deletérios promovidos, por exemplo, por processos de herbivoria, as plantas são capazes de desenvolver diferentes estratégias de defesa. Estes mecanismos podem envolver a formação de espinhos, tricomas e o fortalecimento da parede celular, que são barreiras físicas que tornam as plantas menos atrativas para seus consumidores. Por outro lado, são capazes também de produzir e liberar

compostos químicos, incluindo enzimas, inibidores enzimáticos e pequenas moléculas denominadas metabólitos secundários, os quais apresentam ações diretas ou indiretas sobre seus agressores (HOWE; JANDER, 2008; HUFFAKER et al., 2013). Diretamente, a atividade destes metabólitos está relacionada com a alteração de processos bioquímicos envolvidos com a captação de nutrientes, sobrevivência, crescimento, desenvolvimento e reprodução de, por exemplo, insetos herbívoros que ingerem tais substâncias. Do contrário, sua ação indireta refere-se à produção e liberação de compostos orgânicos voláteis que atraem inimigos naturais destes herbívoros como parasitoides e predadores (PARÉ; TUMLINSON, 1999; VAN POECKE; DICKE, 2004; RASMANN et al., 2005; UNSICKER; KUNERT; GERSHENZON, 2009; McCORMICK; UNSICKER; GERSHENZON, 2012).

Metabólitos secundários incluem diferentes classes de compostos químicos como alcaloides, terpenoides, flavonoides, glicosinolatos e aminoácidos não proteicos (WINK, 1988). Estes últimos são compostos que apresentam em sua estrutura pelo menos um grupamento amino e um carboxílico, não estando envolvidos diretamente, entretanto, com a síntese proteica. Em plantas existem mais de 250 moléculas deste tipo, as quais desempenham diferentes funções, como defesa, resposta a estresses, desenvolvimento, floração e morfogênese (VRANOVA et al., 2011). Destes podem-se destacar os ácidos butíricos, os quais contem quatro átomos de carbono e apresentam-se em três isoformas (α , β e γ) de acordo com a posição de seu grupo amino.

Muito pouco se sabe acerca da real função do isômero α (Abu) nas plantas, embora seja especulado que o mesmo apresente atuação sobre processos de defesa, uma vez que o mesmo é capaz de induzir a síntese de etileno (GARCÍA-MUNIZ; MARTÍNEZ-IZQUIERDO; PUIGDOMÈNECH, 1998). Apesar desta atividade de defesa ser bem caracterizada para os isômeros β (BABA) e γ (GABA), parece haver uma separação quanto ao contexto onde um ou outro é utilizado. Estudos indicam que enquanto o ácido β -aminobutírico aumenta a resistência das plantas contra infecção por fungos, bactérias e vírus, o isômero γ é praticamente inativo nesta situação (COHEN et al., 1994; SIEGRIST; OROBER; BUCHENAUER, 2000; COHEN, 2002; TON et al., 2005; ŠAŠEK et al., 2012), apresentando maior atividade como um agente antiherbivoria, onde promove redução do crescimento e da sobrevivência de larvas de insetos (RAMPUTH; BOWN, 1996).

O GABA é mais conhecido por seu papel como principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central de vertebrados (SIVILOTTI; NISTRI, 1991). Em plantas, sua ação

em resposta a estresses bióticos e abióticos é bem conhecida (BOWN; MACGREGOR; SHELP, 2006; AKÇAY et al., 2012), embora, recentemente, trabalhos venham sugerindo sua participação como molécula sinalizadora em processos de direcionamento para crescimento do tubo polínico (PALANIVELU et al., 2003) e comunicação entre plantas e outros organismos (SHELP; BOWN; FAURE, 2006) bem como um regulador do metabolismo de carbono e nitrogênio (BOUCHÉ; FROMM, 2004).

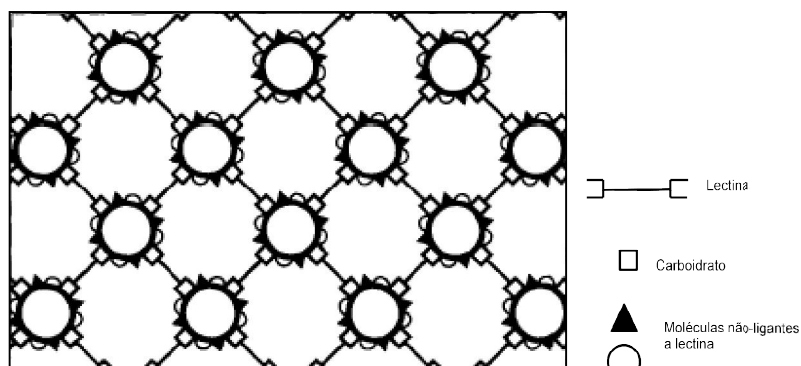
Neste sentido, o presente trabalho procura dar maior entendimento acerca do mecanismo molecular envolvido com a atividade de uma classe de proteínas ligantes a carboidratos, denominada lectina, a qual, historicamente, tem sido reportada como apresentando participação em processos de defesa vegetal contra vírus, fungos, bactérias e insetos (PEUMANS; VAN DAMME, 1995; MURDOCK; SHADE, 2002). Assim, desenvolvemos um estudo estrutural para investigar se a lectina extraída de sementes da leguminosa *Canavalia maritima*, conhecida como feijão-de-praia, exerce sua atividade de defesa mediante interação com o GABA e com a adenina, base nitrogenada que dá origem aos fitohormônios citocininas.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 LECTINAS

Segundo Lis e Sharon (1998), lectinas são proteínas de origem não imune que possuem pelo menos um sítio não-catalítico de ligação reversível a mono- e oligossacarídeos específicos. Apesar dessa ser a definição mais aceita para essas proteínas e das mesmas terem a recebido na segunda metade do século passado, elas vem sendo estudadas desde o final do século XIX, quando Stillmark, em 1888, isolou a primeira dessas proteínas, a qual foi denominada de ricina devido à planta da qual foi extraída, *Ricinus communis*. Devido sua propriedade de aglutinar eritrócitos (Figura 1), essa proteína, bem como todas aquelas de origem vegetal que apresentavam a mesma característica, foi denominada de fitohemaglutinina. Entretanto, sabe-se hoje que a ricina apresenta uma atividade hemaglutinante relativamente baixa, sendo caracterizada pela sua alta toxicidade devido à sua capacidade de inibir a síntese proteica (PEUMANS; HAO; VAN DAMME, 2001).

Figura 1 Esquematisação da ação aglutinante das lectinas, mostrando que proteínas com mais de um domínio de ligação podem interagir com os carboidratos na superfície de duas células adjacentes. Adaptado de Kennedy e colaboradores (1995).



A partir de seus estudos com o sistema sanguíneo ABO, Boyd e Shapleigh (1954), corroborando diversos trabalhos que demonstraram que aglutininas oriundas de diferentes leguminosas reagem de modo específico com células sanguíneas (revisado por SHARON; LIS, 2004), passaram a utilizar o termo lectina (do latim *legere* – selecionar, escolher) para

nomear essas proteínas que ligavam-se com especificidade aos glicoconjugados da superfície dos eritrócitos que caracterizavam cada um destes no sistema ABO.

As lectinas constituem um grupo de proteínas presente em todas as formas de vida, desde vírus até os mamíferos (KENNEDY et al., 1995). Cada tipo de organismo apresenta lectinas com a propriedade comum de reconhecer carboidratos, embora suas sequências de resíduos de aminoácidos bem como suas estruturas terciárias e quaternárias sejam bastante particulares, criando um espectro de arranjos biológicos altamente diverso.

Devido à sua ampla distribuição, bem como aos seus aspectos estruturais e de especificidade a sacarídeos, as lectinas podem ser classificadas de diversas formas. Neste contexto, Vasconcelos e Oliveira (2004) revisaram essa temática, destacando que as lectinas podem ser agrupadas levando-se em consideração três parâmetros: (1) estrutura tridimensional; (2) relação estrutural e evolutiva e (3) afinidade a monossacarídeos.

Sendo sua principal característica a capacidade de se ligar com especificidade a carboidratos, as lectinas podem ser utilizadas, por exemplo, como ferramentas para a detecção, o isolamento e a caracterização de glicoconjugados, sendo essenciais para o entendimento de mudanças nas superfícies celulares em processos fisiológicos e patológicos, bem como nos estudos imunológicos e oncológicos (ETZLER, 1985; KOMATH; KAVITHA; SWAMY, 2006; SHARON; LIS, 2004).

2.2 LECTINAS VEGETAIS

Lectinas estão presentes em virtualmente todos os grupos taxonômicos do reino Plantae, desde as mais basais até aquelas caracterizadas pelo desenvolvimento de flores (ETZLER, 1985).

Suas especificidades a carboidratos, bem como suas estruturas, tem sido estudadas para uma grande variedade de espécies vegetais, onde se percebe que lectinas de um determinado grupo taxonômico apresentam características únicas que as distingue de outras categorias.

2.2.1 Lectinas de Leguminosas

As sementes dos legumes são particularmente ricas em lectinas, embora estas proteínas possam também ser encontradas em outros órgãos e tecidos. A família botânica a qual pertence os legumes, Fabaceae (Leguminosae), é muito estudada com relação a essa classe de proteínas, uma vez que diversos estudos indicam grande homologia sequencial e estrutural das lectinas, especialmente se as mesmas são encontradas em espécies de uma mesma tribo ou subtribo (ETZLER, 1985).

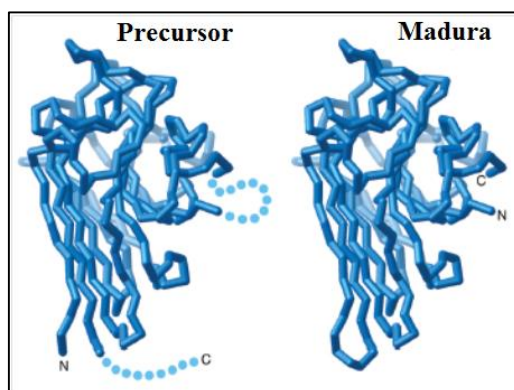
É interessante destacar que o estudo de lectinas extraídas de leguminosas sempre leva em consideração suas homologias com a Concanavalina A (ConA), extraída de sementes da *Canavalia ensiformis* e que é a lectina desse grupo taxonômico mais bem estudada com relação à sua estrutura e suas atividades biológicas (LIS; SHARON, 1998). A partir de estudos comparativos, constatou-se grande conservação de sequência e estrutura nos domínios de reconhecimento a carboidrato e nos sítios hidrofóbicos. Devido a essa grande homologia, as demais lectinas dessa família são denominadas de ConA-like.

A ConA e todas as demais lectinas ConA-like são extraídas de plantas pertencentes à família Fabaceae, subfamília Papilionoidae e tribo Phaseolae, a qual agrupa oito subtribos (Cajaninae, Clitoriae, Diocleinae, Erythrinae, Glycininae, Kennediinae, Ophrestiinae e Phaseolinae). Destas, há especial interesse nos estudos direcionados às lectinas da subtribo Diocleinae, principalmente com relação aos gêneros *Canavalia* e *Dioclea*, uma vez que as mesmas apresentam grande homologia em suas sequências e estruturas. Além destes dois gêneros, a subtribo inclui *Cymbosema* spp., *Cleobulia* spp., *Macropsycanthus* spp., *Luzonia* spp., *Camptosema* spp., *Cratylia* spp., *Collaea* spp. e *Galactia* spp. (Varela et al., 2004). Devido a essa grande homologia, que reflete a baixa modificação genética sofrida durante a evolução, as lectinas podem ser utilizadas como marcadores moleculares em estudos e investigações quimiotaxonômicas e filogenéticas (MOREIRA et al., 1995).

Nas leguminosas, as lectinas são, de maneira geral, sintetizadas em uma forma imatura, com posterior processamento pós-traducional para a formação de uma proteína madura, onde há a remoção de um peptídeo sinal na região N-terminal (LORIS et al., 1998). As etapas desse processamento envolvem clivagem proteolítica do peptídeo sinal (HIGGINS et al., 1983), *trimming* do C-terminal (ETZLER, 1994; MANDAL et al., 1994; YOUNG et

al., 1995), remoção de carboidratos ligados covalentemente (MIN et al., 1992; SHELDON; BOWLES, 1992), e ligação enzimática das extremidades C- e N-terminais originais (BOWLES et al., 1986; CARRINGTON; AUFFRET; HANKE, 1985). É interessante destacar que, apesar das moléculas precursoras serem similares nas diferentes lectinas de leguminosas, há variações nos processos pós-traducionais que fazem com que essas proteínas sejam reunidas em três grupos distintos (LORIS et al., 1998; REEKE; BECKER, 1986): o primeiro contem a ConA, que é um homotetrâmero com 237 resíduos em cada cadeia; no segundo encontra-se a favina, uma proteína dimérica composta por uma cadeia α e uma β que juntas se assemelham a um monômero da ConA; e no terceiro grupo encontra-se proteínas de cadeia única, como aquelas derivadas da *Dolichos biflorus*. Todos os três grupos apresentam um processo denominado de permutação circular, onde as extremidades N- e C-terminais da molécula precursora, que estão espacialmente próximas uma da outra, após a liberação do peptídeo sinal, são unidas covalentemente para formar, temporariamente, uma proteína circular. Posteriormente, há a clivagem enzimática dessa molécula em uma região distinta, criando-se assim novas extremidades (GOODSELL, 2010) (Figura 2). Entretanto, outras etapas diferem de uma lectina para outra. Por exemplo, enquanto na favina há, após a remoção do peptídeo sinal, a adição covalente de uma molécula glicídica ao resíduo Asn168 e a clivagem enzimática da cadeia remanescente para a formação das subunidades α e β (HEMPERLY; MOSTOV; CUNNINGHAM, 1982), na ConA, após a remoção do peptídeo sinal, a cadeia remanescente é clivada em diversas subunidades menores que, pelo processo de permutação circular, dão origem à proteína madura (BOWLES et al., 1986).

Figura 2 Maturação da ConA através do processo de permutação circular. A molécula precursora (PDB ID 3CNA) possui uma extremidade C-terminal, a qual se encontra próximo ao N-terminal, e um *loop* extras, ambas as estruturas representadas pelo pontilhado azul claro. No processamento, a cauda C-terminal extra é clivada enzimaticamente e a nova extremidade é unida ao N-terminal para formar uma proteína circular. Posteriormente, o *loop* extra também é clivado para dá origem às novas extremidades da, agora, proteína madura. Adaptado de Goodsell (2010).



2.2.1.1 ConM, uma Lectina Extraída das Sementes da *Canavalia maritima* Aub.

A ConM é uma lectina extraída de sementes da *Canavalia maritima* Aub., uma leguminosa presente em regiões tropicais e que é conhecida popularmente como “feijão-de-praia”. Sua lectina foi purificada inicialmente por Perez e colaboradores (1991), os quais a caracterizaram como sendo uma proteína com 25 kDa e 237 resíduos de aminoácidos por monômero, assim como as demais lectinas Diocleinae. Gadelha e colaboradores a cristalizaram (2005a) e resolveram sua estrutura tridimensional nativa (2005b), destacando sua capacidade de induzir a produção de óxido nítrico. Este trabalho demonstrou ainda que a ConM apresenta 98% de similaridade em sua estrutura primária quando comparada com a ConA, onde apenas cinco resíduos diferem de uma proteína para outra (D58G, A70G, M129S, E192D e P202S – as primeiras letras referem-se à ConA e as segundas à ConM). Delatorre e colaboradores (2006) resolveram a estrutura tridimensional da ConM complexada com maltose e trealose, observando que a afinidade dessa lectina por dissacarídeos, previamente reportada por Ramos e colaboradores (1996), era ocasionada pela interação entre a Tyr12 e o segundo anel dessas moléculas. Recentemente, foi proposto que a capacidade da ConM interagir com o ácido indole-3-acético, uma auxina, estaria relacionada com uma atividade de inibição da disponibilidade deste fitohormônio durante os processos finais da germinação (DELATORRE et al., 2013).

2.2.2 Estrutura das Lectinas

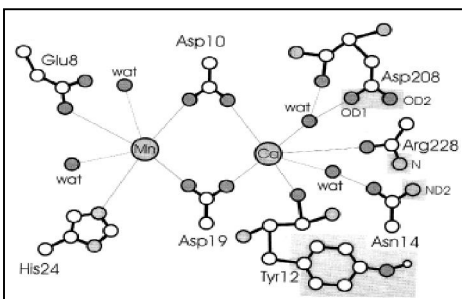
As lectinas provenientes de vegetais e microrganismos são as proteínas dessa classe mais conhecidas e estudadas. Lectinas de origem animal, classificadas como tipo C, galectinas (ou tipo S) e tipo P, vem sendo estudadas desde a década de 80 e suas estruturas cristalográficas vem sendo resolvidas a relativamente pouco tempo. Estudos indicam que lectinas do grupo das galectinas apresentam uma estrutura tridimensional muito semelhante àquela de lectinas de leguminosas (DODD; DRICKAMER, 2001).

De acordo com suas características estruturais, as lectinas são proteínas ligadoras de carboidrato que se enquadram no grupo II dessa classe, não possuindo em seu sítio de

reconhecimento a sacarídeos atividades enzimáticas ou de anticorpos (RINI, 1995), fato este utilizado para sua própria definição, como destacado anteriormente.

As lectinas de leguminosas são excelentes fontes de estudos para se entender as relações estrutura-função que caracterizam uma proteína, uma vez que apesar da enorme homologia existente entre suas sequências e suas estruturas terciárias e quaternárias, as mesmas apresentam distintas especificidades por mono- e oligossacarídeos (MANOJ; SUGUNA, 2001). Seus monômeros apresentam um peso médio de 25kDa, possuindo dois sítios de ligação altamente conservados para os íons divalentes Ca^{2+} e Mn^{2+} , os quais são essenciais para a estabilização da proteína e coordenação das moléculas de carboidrato (BECKER et al., 1975; KAUSHIK; MOHANTY; SUROLIA, 2009). Cada íon está coordenado por seis interações de hidrogênio (Figura 3), sendo quatro provenientes da proteína e duas de moléculas de água. A essencial presença dos íons, particularmente do cálcio, para a ligação das lectinas a carboidratos pode ser explicada pela capacidade dos resíduos que compõem o domínio de reconhecimento a carboidrato serem, também, os responsáveis pela coordenação desse íon (LORIS et al., 1998), conforme observado na Fig. 3. É interessante ressaltar que existem exceções para essa necessidade de sítios de ligação para íons divalentes. Por exemplo, as lectinas α AI (*amylase inhibitor*) e *arcelin* (MIRKOV et al., 1994; OSBORN et al., 1988), derivadas da leguminosa *Phaseolus vulgaris*, não possuem o loop correspondente aos resíduos Pro13-Pro23 de outras lectinas de leguminosas, o qual está envolvido na coordenação dos íons. Neste caso, a estabilização das proteínas parece ser efetuada através de interações entre os anéis da Tyr85 e da Phe127, bem como por duas interações de hidrogênio entre as cadeias principais dos resíduos Ala84/Thr205 e Gly207/Ala84 (BOMPARD-GILLES et al., 1996).

Figura 3 Coordenação dos íons Ca^{2+} e Mn^{2+} . Nota-se que a coordenação daquele envolve resíduos de aminoácidos (Tyr12 e Arg228) que participam também da coordenação de moléculas glicídicas no Domínio de Reconhecimento a Carboidrato, explicando, assim, a necessidade da presença desse íon para a ligação a carboidratos. “wat” refere-se às moléculas de água que participam da coordenação dos íons. Adaptado de Loris e colaboradores (1998).



Cada monômero possui uma arquitetura tridimensional denominada de *jelly-roll* (SRINIVAS et al., 2001), onde um “sanduiche” é formado por uma parte frontal contendo sete fitas- β antiparalelas (Figura 4B) que se sobrepõe a uma porção posterior com seis fitas- β antiparalelas (Figura 4C), de modo que estas duas regiões encontram-se conectadas por diversos *loops* (Figura 4A). Entretanto, as formas biologicamente ativas das lectinas dessa subtribo se encontram di- ou tetramerizadas, fato este influenciado pelo pH do meio (NAGANO et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2008; SENEAR; TELLER, 1981).

É interessante ressaltar que a maioria das lectinas de leguminosas apresenta um arranjo dimérico conhecido como dímero canônico (Figura 4D), onde um monômero interage com outro lado a lado de modo a formar uma arquitetura contínua, através da associação das porções posteriores de cada monômero, de 12 fitas- β antiparalelas (EDELMAN et al., 1972; HARDMAN; AINSWORTH, 1972) e onde cada um forma uma angulação em relação ao outro. Já a estrutura tetramérica, descrita primeiramente para a ConA (EDELMAN et al., 1972; HARDMAN; AINSWORTH, 1972), é formada pela associação entre as partes posteriores de dois dímeros canônicos (Figura 4E), as quais, sendo côncavas, formam uma cavidade preenchida com água que na ConA possui um volume de cerca 5000 Å³. Entretanto, de acordo com a arquitetura dimérica de cada lectina, que pode ser canônica ou não (PRABU et al., 1998), esta associação pode ocorrer de diferentes formas, de modo que variações são detectadas nos arranjos quaternários (BOUCKAERT et al., 1999; MANOJ; SUGUNA, 2001; VIJAYAN; CHANDRA, 1999) (Figura 5), refletindo-se, assim, nas diferenças de atividades biológicas, como abordado por Sanz-Aparicio e colaboradores (1997) para a lectina da *Canavalia brasiliensis* (ConBr) .

Figura 4 Características gerais do arranjo tridimensional das lectinas Diocleinae baseada na ConM. (A) Representação do arranjo monomérico conhecido como β -sandwich (SRINIVAS et al., 2001), destacando-se a sobreposição das sete fitas- β frontais (laranja) em relação às seis posteriores (azul). (B) e (C) Disposição das sete fitas- β frontais e das seis posteriores, respectivamente. (D) Dímero canônico, destacando o arranjo contínuo de 12 fitas- β formado pelas porções posteriores de cada monômero (azul e magenta). (E) Arranjo tetramérico formado a partir da associação entre dois dímeros canônicos, sendo um destes constituído pelas cadeias polipeptídicas A (azul) e B (magenta) e o outro pelas cadeias C (verde) e D (rosa). * Cavidade central gerada pela disposição dos dímeros canônicos no tetrâmero (ver texto). Figuras A, B, C e D baseadas na estrutura nativa da ConM (PDB ID 2CWM) e figura E baseada na estrutura desta lectina complexada com dimanosídeo (PDB ID 2P37).

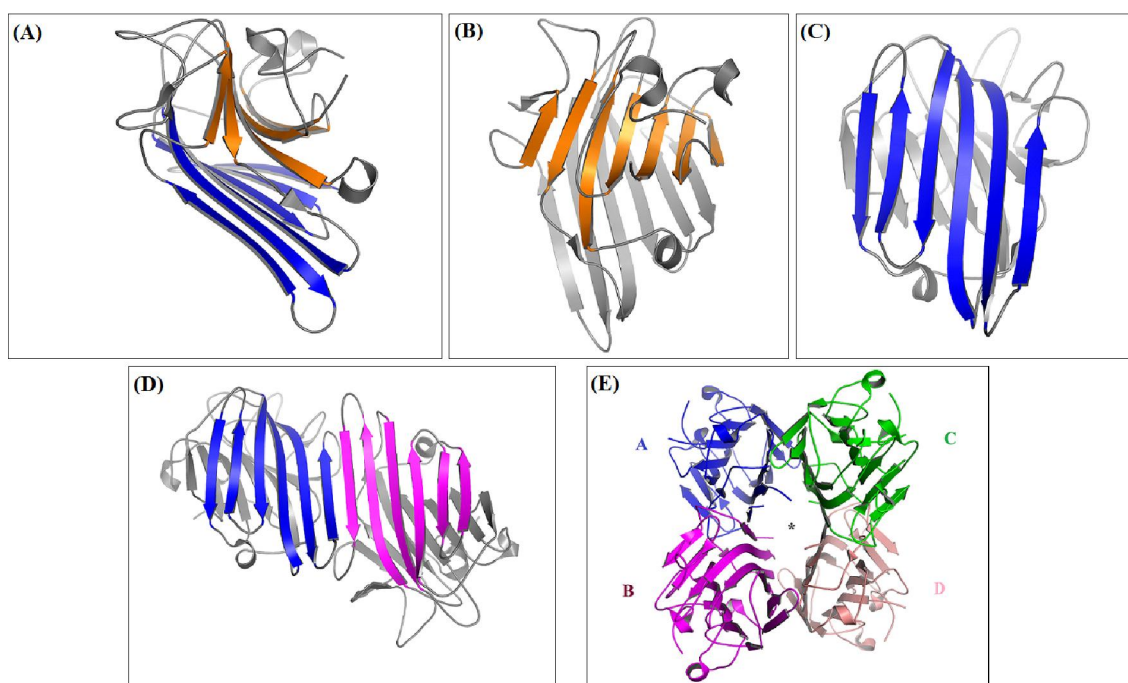
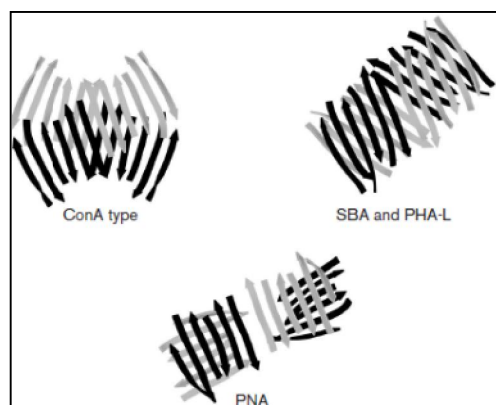


Figura 5 Estruturas quaternárias de lectinas de leguminosas. Adaptado de Vijayan e Chandra (1999).



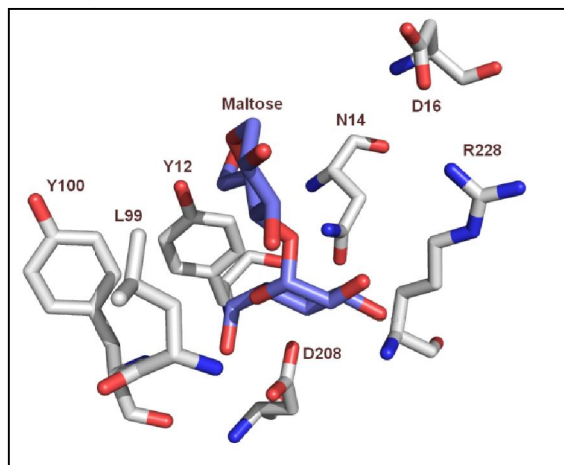
2.2.3 Domínio de Reconhecimento a Carboidrato

Como já mencionado, lectinas apresentam uma ampla variedade de especificidade para mono- e oligossacarídeos, podendo ser classificadas em cinco grupos de acordo com sua afinidade por monossacarídeos (MANOJ; SUGUNA, 2001; VASCONCELOS; OLIVEIRA, 2004): manose/glicose (Man/Glc), galactose/N-acetilgalactosamina (Gal/GalNAc), N-acetilglicosamina (GlcNAc), fucose e ácido N-acetilneuramínico.

Esse espectro de possibilidades de interação com carboidratos pode ser entendido a partir da análise do Domínio de Reconhecimento a Carboidrato (CRD) (DRICKAMER, 1988), o qual, de maneira geral, possui uma arquitetura muito similar nas lectinas de leguminosas, sendo formado por quatro *loops* presentes na superfície da região frontal de cada monômero (SHARMA; SUROLIA, 1997; YOUNG; OOMEN, 1992). Nesse sentido, ressalta-se que lectinas extraídas de plantas filogeneticamente relacionadas e que possuem a mesma afinidade por monossacarídeos, como é o caso daquelas pertencentes à subtribo Diocleinae, apresentam seus CRDs sequencialmente conservados (MANOJ; SUGUNA, 2001) (Figura 6), embora a especificidade por carboidratos mais complexos seja diferente (LIS; SHARON, 1998). A partir disso, constata-se que essa variação se reflete nas atividades biológicas desempenhadas por essas proteínas, onde, por exemplo, verifica-se que ConA, ConM e ConBr (*Canavalia brasiliensis*) se diferenciam, dentre outras coisas, quanto aos efeitos pró- e antiinflamatórios (ALENCAR et al., 1999; ASSREUY et al., 1999; BENTO et al., 1993), liberação de histamina (GOMES et al., 1994; FERREIRA et al., 1996), produção de óxido nítrico (ANDRADE et al., 1999), mitogenicidade (BARRAL-NETO et al., 1992) e produção de citocinas (CAVADA et al., 2001).

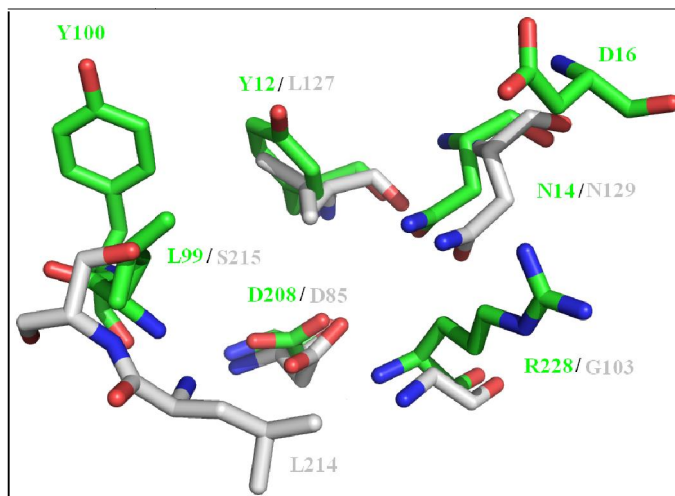
Mas como uma região que apresenta extrema conservação em sua sequência de resíduos de aminoácidos pode apresentar especificidades tão distintas? Uma resposta para tal questionamento foi dada pelo trabalho de Gadelha e colaboradores (2005b) ao demonstrar que os CRDs da ConM e da ConA apresentam uma conformação ligeiramente diferente devido a uma mutação que altera o resíduo 202, o qual naquela é uma Serina e nesta é uma Prolina, mostrando que essa modificação deixa o domínio da ConM cerca de 0.70 Å mais aberto que o da ConA, permitindo, assim, que carboidratos mais complexos possam interagir com maior facilidade com aquela proteína.

Figura 7 Domínio de Reconhecimento a Cabodrato (CRD) da ConM, destacando-se os resíduos de aminoácidos (cinza) que estabilizam a maltose (azul). PDB ID 2CYF. Adaptado de Delatorre e colaboradores (2006).



É interessante destacar que lectinas de leguminosas pertencentes a subtribos e até tribos diferentes, mesmo possuindo resíduos distintos, apresentam equivalência nos seus CRDs quando suas estruturas são sobrepostas (LORIS et al., 1998), como ilustrado na Figura 8 para a ConM e a DBL, a lectina extraída de sementes da *Dolichos biflorus*.

Figura 8 Sobreposição do CRD da ConM (verde – PDB ID 2CYF) e do sítio de ligação a monossacarídeos da DBL (cinza – PDB ID 1BJQ), mostrando a conservação na arquitetura dessa região em lectinas extraídas de espécies de subtribos diferentes. Além disso, nota-se que alguns dos resíduos da DBL correspondem em posição aos da ConM (D85/D208, G103/R228, L127/Y12, N129/N14 e S215/L99).



Interessantemente, o domínio de reconhecimento a carboidrato parece não ser sítio apenas para a ligação de moléculas glicídicas. Recentemente, Delatorre e colaboradores (2013) reportaram a presença do anel hidrofóbico indol ligado aos resíduos Asp16 e Arg228, constituintes do CRD da ConM, sendo sugerido, neste caso, que a lectina poderia estar relacionada em um processo de controle da disponibilização desta molécula, a qual é liberada como um composto volátil quando plantas encontram-se sob ataque de insetos herbívoros (FREY et al., 2000; ZHUANG et al., 2012).

2.2.4 Sítios Hidrofóbicos

As funções biológicas e fisiológicas propostas para as lectinas vegetais, especialmente para aquelas extraídas de leguminosas, tais como ativação de linfócitos e indução de apoptose (BARBOSA et al., 2001; NOWELL, 1960; WANG; McCLAIN; EDELMAN, 1975), atividade antidepressiva e neuroprotetora (BARAUNA et al., 2006; RUSSI et al., 2012; JACKES et al., 2013), processos de defesa contra herbivoria (FITCHES et al., 2001; JANZEN; JUSTER; LIENER, 1976; MURDOCK; SHADE, 2002; PEUMANS; VAN DAMME, 1995), nodulação de raízes (BREWIN; KARDAILSKY, 1997; HIRSCH, 1999) e inibição de infecção por diversos patógenos, como fungos e vírus (BROEKAERT et al., 1989; PEUMANS; VAN DAMME, 1995), estão relacionadas a sua capacidade de decifrar os glicocódigos presentes na superfície das células com as quais interagem, uma vez que suas propriedades são completo ou parcialmente inibidas por açúcares específicos. Entretanto, diversos estudos vêm indicando que lectinas de leguminosas e de outros grupos taxonômicos, bem como de organismos não-vegetais (STOITSOVA; BOTEVA; DOYLE, 2003), podem interagir com outras moléculas, como aminoácidos não-proteicos (DELATORRE et al., 2007) e compostos hidrofóbicos (EDELMAN; WANG, 1978; HARDMAN; AINSWORTH, 1973; ROBERTS; GOLDSTEIN, 1982; ROBERTS; GOLDSTEIN, 1983). Neste caso, trabalhos tem sido desenvolvidos com as substâncias fluorescentes ANS (ácido 1,8-analino-naftalenos-sulfônico) e TNS (ácido 2,6-toluidinil-naftalenos-sulfônico) (ROBERTS; GOLDSTEIN, 1982; YANG; GALL; EDELMAN, 1974), adenina (GEGG et al., 1992; GEGG; ETZLER, 1994; ROBERTS et al., 1986), derivados hidrofóbicos de açúcares (DE BOECK et al., 1984; KENELLOPOULOS, 1996) e com o ácido indole-3-acético (AIA)

(EDELMAN; WANG, 1978). É interessante destacar que boa parte desses estudos indica que a afinidade de lectinas por compostos hidrofóbicos é maior que aquela para os próprios carboidratos, mostrando, assim, que tais sítios podem ter uma importante relevância para as atividades biológicas e fisiológicas desempenhadas por estas proteínas.

Alguns estudos vêm propondo a existência de dois sítios hidrofóbicos independentes nas lectinas. Por exemplo, Yang, Gall e Edelman (1974) identificaram um sítio de ligação de alta afinidade na ConA para um ligante fluorescente. Edelman e Wang (1978) reportaram que o triptofano e o AIA ligam-se com baixa afinidade à ConA, propondo que existe um desses sítios em cada uma das quatro subunidades da lectina. Além disso, Roberts e Goldstein (1982) propuseram a existência de um único sítio de alta afinidade para o TNS em lectinas extraídas da leguminosa *Phaseolus lunatus* e quatro sítios de baixa afinidade para o mesmo composto, um em cada monômero.

Assim, a partir desses estudos, especula-se que existiria um sítio de alta afinidade para compostos hidrofóbicos por tetrâmero e um de baixa afinidade por monômero. O sítio de alta afinidade ou cavidade hidrofóbica na ConA, baseado em alguns estudos (BECKER et al., 1975; EDELMAN et al., 1972), estaria delimitado pelos seguintes resíduos de aminoácidos: Y54, L81, L85, V89, V91, F111, S113, V179, I181, F191, F212 e I214. Nesse sentido, é razoável imaginar que tal região pode, de fato, estar relacionada a alguma função fisiológica e/ou biológica desempenhada pelas lectinas, uma vez que tais resíduos são extremamente conservados nos diferentes gêneros que compõem a subtribo Diocleinae (Figura 6).

Levando-se em consideração esta capacidade que lectinas vegetais, e em especial aquelas oriundas da subtribo Diocleinae, tem de interagir com compostos não-glicídicos, como bases nitrogenadas e aminoácidos não-proteicos, e que o mecanismo pelo qual tais proteínas exercem sua atividade de defesa contra insetos herbívoros é pouco entendido, sendo reportado que a ligação a carboidratos é necessária mas não suficiente para desencadear os processos que diminuem a sobrevivência destes organismos (VASCONCELOS; OLIVEIRA, 2004), o presente trabalho buscou verificar se a lectina ConM se ligaria à adenina e ao aminoácido não proteico GABA, procurando dar maior entendimento ao papel inseticida desta classe de proteínas, contribuindo, assim, para o possível desenvolvimento de processos biotecnológicos que aumentem a resistência de culturas agrícolas frente a insetos herbívoros.

3. OBJETIVOS

Geral

- Resolver a estrutura cristalográfica da lectina extraída das sementes da *Canavalia maritima* (ConM) em complexo com o ácido gama-aminobutírico (GABA) e com a base nitrogenada adenina.

Específicos

- Analisar a estrutura tridimensional do modelo da lectina complexada com os ligantes GABA e adenina;
- Estudar a estrutura dos sítios de ligação para os dois ligantes;
- Descrever as interações intermoleculares que estabilizam os ligantes em seus respectivos sítios;
- Analisar as mudanças conformacionais ocorridas na estrutura tridimensional da ConM mediante a ligação do GABA e da adenina em relação a complexos desta lectina com outros ligantes;
- Comparar a estrutura do complexo ConM/GABA/adenina com aquelas resolvidas para outras lectinas de leguminosas;
- Relacionar a estrutura tridimensional da ConM complexada com o GABA e adenina com a atividade de defesa de lectinas vegetais contra insetos herbívoros.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CRISTALIZAÇÃO

Para se estudar a estrutura tridimensional de uma proteína a partir da difração de raios X é necessário que a macromolécula em questão seja cristalizada. Para tanto, uma solução pura da mesma deve ser conduzida a um estado de supersaturação, onde existem muito mais moléculas de soluto que solvente. Isso se faz necessário porque o processo de cristalização é energeticamente desfavorável, uma vez que moléculas livres na solução passam a se agregar em uma rede, perdendo, assim, entropia (BUKOWSKA; GRÜTTER, 2013). Neste contexto, este estado supersaturado é obtido alterando-se a força iônica do meio e/ou adicionando-se moléculas orgânicas, comumente polietilenoglicóis (AZEVEDO Jr., 2004).

Como proteínas são macromoléculas biológicas dinâmicas, suas propriedades físico-químicas mudam de acordo com as condições do meio, como pH e temperatura. Assim, seu processo de cristalização pode mudar de uma situação para outra, de modo que a solução utilizada para uma proteína pode não ser, necessariamente, a mesma para esta proteína incubada, por exemplo, junto com algum ligante, fazendo deste um processo de tentativa e erro. Procurando tornar esse procedimento mais objetivo, Jancarik e Kim (1991) desenvolveram o método da matriz esparsa, onde a proteína que se deseja cristalizar é submetida a uma série de condições diferentes de uma só vez, onde tais diferenças residem no tipo e concentração de precipitante e sal utilizados, bem como no valor do pH da solução, que varia entre 4.5 e 8.5 (AZEVEDO Jr., 2004).

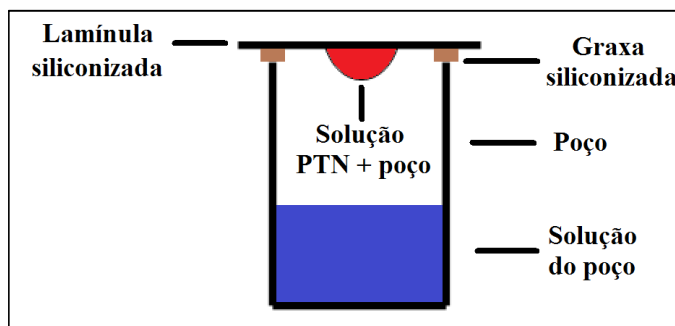
A lectina ConM foi extraída de sementes previamente moídas da leguminosa *Canavalia maritima* sob agitação constante em 0.15 M de NaCl [1:10 (peso/volume)] durante 4h e foi purificada por cromatografia de afinidade utilizando-se coluna Sephadex G-50, seguindo-se o protocolo de Ramos e colaboradores (1996).

ConM purificada foi submetida ao método da matriz esparsa utilizando-se o *kit* de cristalização da Hampton Research (USA), o qual contém 50 condições diferentes de cristalização, cada uma destas contendo diferentes tipos e proporções de sal, tampão e precipitante. Para este procedimento foram utilizadas três placas de cultura celular contendo 24 poços, onde cada um foi preenchido com 200µL de cada condição. Para cada um destes

casos, 2 μ L da solução de cristalização foi adicionada sobre uma lamínula de vidro 20 x 20cm previamente embebida em silicone para se evitar perda da solução. Junto a esta foi adicionada 2 μ L da solução proteica (10mg/mL) e 2 μ L de uma solução 5mM do aminoácido não proteico GABA. Cada lamínula, então, foi revertida sobre seu respectivo poço, de acordo com a solução de cristalização, de modo que as gotas ficassem voltadas para a solução do reservatório (Figura 9). Este tipo de procedimento faz-se necessário para que ocorra o processo de difusão de vapor, onde as moléculas de solvente presente na lamínula vaporizam-se para a solução do poço, a qual contém maior concentração de soluto. Por este processo as gotas na lamínula tornam-se supersaturadas, favorecendo a formação de cristais. As placas “montadas”, com as lamínulas posicionadas sobre os poços, foram armazenadas a 20 °C.

Após a formação dos primeiros cristais, identificados por análise das gotas sob microscópio estereoscópico (lupa), os mesmos foram colados em uma solução 5mM da base nitrogenada adenina. Este procedimento, denominado *soaking*, visa permitir a formação de complexos entre a proteína, já cristalizada, e o ligante quando a co-cristalização (incubação concomitante de receptor e ligante antes da formação dos cristais, como no caso da ConM e do GABA) não resulta na formação de cristais. O processo de *soaking* leva em consideração a presença de canais de solvente entre as moléculas de proteína que forma o cristal, os quais permitem a difusão de pequenas moléculas que se ligarão a sítios funcionais da proteína (AZEVEDO Jr., 2004; DANLEY, 2006; HASSEL et al., 2007).

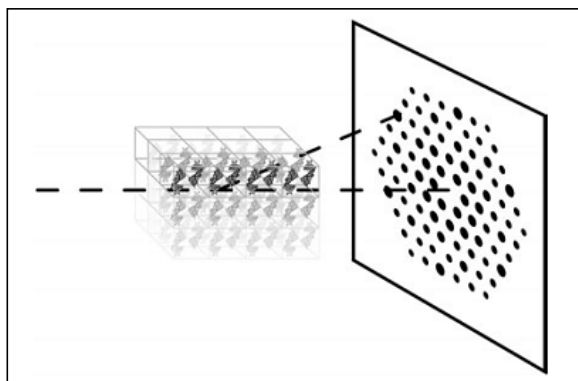
Figura 9 Ilustração de um poço da placa de cristalização. Em azul destaca-se a solução correspondente à condição de cristalização. Em vermelho destaca-se a gota contendo uma solução da proteína (PTN) e do poço, a qual foi colocada sobre uma lamínula previamente siliconizada. Como a concentração na gota é cerca da metade daquela presente no poço, o solvente difunde-se na forma de vapor em direção ao reservatório, fazendo com a gota torne-se uma solução supersaturada, favorecendo a formação de cristais de proteínas. Em marrom destaca-se a graxa siliconizada, que é colocada na borda do poço anteriormente ao posicionamento da lamínula, servindo para evitar que haja troca entre o meio externo e o interno do poço.



4.2 COLETA DE DADOS DE DIFRAÇÃO DE RAIOS X

Cristais formados pelo complexo ConM/GABA/adenina foram submetidos a um experimento de difração de raios X na estação experimental MXI do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), em Campinas, São Paulo. Nesse procedimento, elétrons acelerados a uma velocidade relativística (aproximadamente 99.9% da velocidade da luz) são desviados por um campo magnético, dando origem a um espectro de luz contendo todos os comprimentos de onda. Esse espectro, ao passar por um monocromador, deixa passar apenas comprimentos de onda em torno de $1 \text{ \AA}$, comprimento este referente aos raios X. Estes, então, foram incididos sobre um cristal contendo a ConM complexada com o GABA e a adenina, o qual encontrava-se apoiado sobre uma cabeça goniométrica, a qual foi rotacionada a cada 1° para permitir que o maior número possível de elétrons que compõe cada átomo dos complexos difratasse os raios X incidentes. Ao serem difratados, os raios foram captados por um detector do tipo CCD (MAR *research*), registrando, para cada rotação, um padrão de difração referente à distribuição dos elétrons (Figura 10). As imagens obtidas de cada padrão foram reunidas em um único arquivo e submetidas a um tratamento computacional para se resolver a estrutura do complexo ConM/GABA/adenina.

Figura 10 Padrão de difração, esquematizando como um padrão de difração é gerado a partir da incidência de raios X sobre um cristal proteico, onde destaca-se a ordenação das moléculas de proteína. Adaptado de Lattman e Loll (2008; p. 20).



4.3 RESOLUÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA ConM COMPLEXADA COM O GABA E COM A ADENINA

Conjunto de imagens contendo os padrões de difração obtidos no LNLS foi submetido a um processamento computacional na Unidade de Proteômica Estrutural (UPE) do Departamento de Biologia Molecular (DBM) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Nesse procedimento, foram utilizados *softwares* específicos seguindo-se as seguintes etapas:

4.3.1 Integração das Imagens

Com a utilização do programa iMosflm, transformou-se as informações contidas nas imagens em fatores de estrutura, que são relações matemáticas existentes entre os dados de difração e o modelo que será utilizado na substituição molecular (ver adiante). Essas informações são referentes à intensidade de cada ponto presente nos padrões de difração, a qual é proporcional ao grau de enegrecimento do ponto. Matematicamente, a intensidade é igual ao módulo do fator de estrutura (AZEVEDO Jr, 2009).

Após isso, realizou-se, no próprio iMosflm, a fase de auto-indexação, onde as posições dos pontos de duas imagens foram registradas e as possíveis células unitárias que melhor representam os padrões foram identificadas (AZEVEDO Jr, 2009; POWELL; JOHNSON; LESLIE, 2013). Uma célula unitária pode ser definida como uma caixa contendo todas as cópias de moléculas que se relacionam entre si por simetria, estando, as moléculas, localizadas na unidade assimétrica, que é a menor entidade necessária para se construir um cristal por inteiro (LATTMAN; LOLL, 2008, p. 14). A partir da identificação dos parâmetros de célula unitária (representado por três vetores) que melhor representam os padrões de difração obtidos, o programa indicou o grupo espacial correspondente a estes (AZEVEDO Jr, 2009), onde grupo espacial reflete como as moléculas estão relacionadas entre si por simetria dentro de uma perspectiva tridimensional (HELLIWELL, 1992, p. 28).

4.3.2 Escalonamento

O arquivo criado a partir da integração das intensidades no Mosflm é do tipo “.mtz”, o qual foi utilizado pelo programa Scala, contido no pacote de programas CCP4 (*Collaborative Computational Project 4*, 1994), onde foi realizada a fusão (*merge*) de reflexões (ou pontos) equivalentes e que estão presentes em diferentes imagens. Isso resultou na criação de um arquivo contendo apenas reflexões únicas, onde foi analisado diversos parâmetros, dentre os quais destaca-se o R_{sym} , um índice que verifica se as intensidades de reflexões equivalentes (em imagens distintas) são muito diferentes. Assim, considerou-se como ponto de corte valores iguais ou menores a 0.1, o que indica pouca discordância entre as intensidades (AZEVEDO Jr, 2009).

4.3.3 Substituição Molecular

Das informações contidas nas imagens de difração, apenas aquelas referentes às intensidades das reflexões podem ser recuperadas no processamento pelo Mosflm (intensidades representam as amplitudes dos raios difratados). Nesse sentido, informações sobre a fase relativa entre dois raios difratados são perdidas, fato esse referido como “problema da fase” e que impede a resolução da estrutura cristalográfica (LATTMAN; LOLL, 2008, p. 5). Para superar este problema, utilizou-se o procedimento da substituição molecular, onde um modelo contendo coordenadas atômicas referentes a uma estrutura já resolvida da ConM foi posicionado, pelo programa MolRep (VARGIN; TEPLYAKOV, 1997), na célula unitária da molécula cuja estrutura se queria determinar, no caso a ConM complexada com o GABA e a adenina. Esse procedimento faz uso do conceito proposto por Rossmann (1972) de que proteínas com similaridade em suas sequências de resíduos de aminoácidos apresentam estruturas tridimensionais também similares.

Essa fase utiliza processos de tentativa e erro para posicionar e orientar o modelo na célula unitária (LATTMAN; LOLL, 2008, p. 87), onde foram analisados dois parâmetros principais para se saber se o modelo escolhido é adequado: o R_{fac} , que é um índice que mostra o grau de discordância entre o modelo e os dados de difração, e o *Score* (coeficiente de

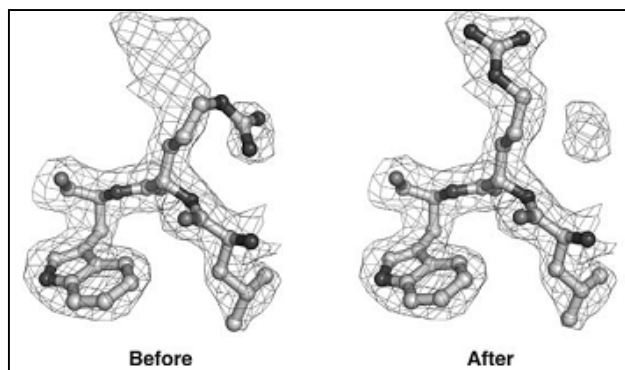
correlação), que indica o grau de concordância. Nesse procedimento, utilizou-se como ponto de corte valores abaixo e acima de 50% para R_{fac} e $Score$, respectivamente.

4.3.4 Modelagem Molecular e Refinamento

O modelo tridimensional gerado a partir da substituição molecular foi analisado e modelado através da versão 0.6.2 do programa COOT (EMSLEY et al., 2010) para se obter uma menor discordância entre esse modelo e os dados de difração. Tal procedimento foi efetuado pela manipulação do modelo em *stick*, posicionando-o e orientando-o de acordo com o mapa de densidade eletrônica (Figura 11), o qual é calculado a partir da diferença entre os coeficientes F_o e F_c , os quais representam, respectivamente, as amplitudes para os dados observados no padrão de difração e aquelas calculadas para o modelo (LATTMAN; LOLL, 2008, p. 86). Além disso, leva-se em consideração as fases calculadas para o modelo.

Entretanto, antes dessa fase, foi realizado o cálculo do conteúdo presente na unidade assimétrica, o qual indica quantas moléculas existem nesta entidade. Tal procedimento foi efetuado através do programa *Matthews – Cell Content Analysis*, disponível no pacote CCP4.

Figura 11 Esquematização do processo de modelagem molecular da cadeia lateral de um resíduo de Arginina, onde se realiza sua manipulação para correta orientação dentro do mapa de densidade eletrônica. Adaptado de Lattman e Loll (2008; p. 103).



Após a modelagem, foi realizada a fase de refinamento do modelo através do programa Refmac5 (MURSHUDOV et al., 2011), onde se aumentou a concordância do

modelo, parâmetro este indicado pelos valores dos índices R_{fac} e R_{free}, que representam coeficientes de discordância e devem estar abaixo de 30%.

Finalizada a resolução da estrutura tridimensional do complexo ConM/GABA/adenina, suas coordenadas atômicas, bem como dados referentes às fases e amplitudes, foram depositadas no banco mundial de estruturas proteicas, o *Protein Data Bank* – PDB (BERNSTEIN et al., 1977).

4.4 DOCKING MOLECULAR

Muitas vezes um complexo proteína-ligante não pode ser cristalizado, seja pela dificuldade de se obter a proteína em sua forma pura e/ou cristalizada ou pela não formação de um complexo estável. Para superar isto, simulações computacionais permitem prever a orientação de uma molécula em relação a outra (LENGAUER; RAREY, 1996). Neste sentido, de maneira geral, o processo de *docking* molecular prevê as maneiras de ligação de um ligante a uma proteína cuja estrutura tridimensional já foi determinada, de modo que o melhor modelo para o complexo é obtido a partir de funções de *score* que refletem, matematicamente, a força das interações não covalentes que estabilizam as duas moléculas (JAIN, 2006).

No presente trabalho, realizamos processos de *docking* molecular com a ConM como molécula receptora e duas classes de moléculas ligantes: carboidratos e fitohormônios. Para tanto, utilizamos o programa Hex 6.3 (RITCHIE; KEMP, 2000), um *software* de uso fácil e intuitivo que trata as moléculas envolvidas no processo como corpos rígidos de modo a serem superpicionadas conhecendo-se apenas suas estruturas tridimensionais, permitindo que os resultados sejam obtidos em um menor intervalo de tempo em relação a outros programas similares. Os complexos mais estáveis e favoráveis foram escolhidos de acordo com o valor de sua função de *score*, dada em Kcal/mol: quanto menor este valor (mais negativo), mais confiável é o resultado.

5. RESULTADOS

5.1 CRISTALIZAÇÃO E DIFRAÇÃO DE RAIOS X

A lectina das sementes da *Canavalia maritima* (ConM) foi cristalizada sob a condição de número 32 (sulfato de amônia 2.0 M, pH 8.5) do *kit* Crystal Screen I da Hampton Research (USA) sobre o grupo espacial ortorrômbico I222, com dimensões da célula unitária de $a = 66.9$, $b = 70.4$ e $c = 97.0$. O coeficiente de Matthews resultou em um valor de $2.24 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$, indicando a presença de um único monômero na unidade assimétrica, com 45.22% de conteúdo de solvente. Dados acerca do escalonamento e refinamento estão sumarizados na Tabela 1. A substituição molecular indicou um coeficiente de correlação (Scor) de 74.7% e um wRfactor de 44.8%.

5.2 ESTRUTURA GERAL

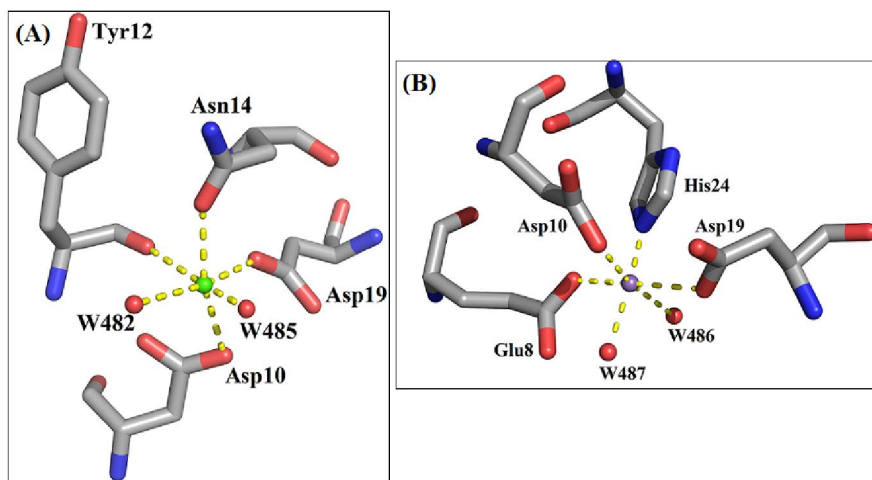
A estrutura cristalográfica da ConM, resolvida sob uma resolução de $1.89 \text{ \AA}$, apresentou-se como um monômero truncado, onde, apesar da estrutura terciária das lectinas *Canavalia* spp. ser composta por 237 resíduos de aminoácidos, o segmento Asn118-Glu122 não pode ser modelado, resultando, portanto, em um modelo estrutural final com 232 resíduos. Entretanto, a maioria de suas características estruturais foi conservada em relação às estruturas previamente reportadas para esta e outras lectinas de *Canavalia* spp.

Parâmetros	Valores
Coleta dos dados	
Número total de observações	88.784
Número total de observações únicas	18.742
R_{merge} (%)	7,1 (36,6)
Limite de resolução (Å)	22,81-1,89 (1,99-1,89)
Completeza (%)	99,9 (99,9)
Multiplicidade	4,7 (4,7)
(I)/ σ	5,7 (2,1)
Comprimento de onda (Å)	1,427
Grupo espacial	I222
Parâmetros de cela (Å)	a = 66,990 b = 70,410 c = 97,050
Refinamento	
Limite de resolução (Å)	57,00-1,89
R_{factor} (%)	22,4
R_{free} (%)	26,4
Número de aminoácidos na unidade assimétrica	237
Número de moléculas de água	87
RMSDs dos valores ideais	
Comprimento das ligações (Å)	0,026
Ângulos das ligações (graus)	2,577
Fatores de temperatura	
Média do B-fator para toda a proteína (Å ²)	29,9
Gráfico de Ramachandran	
Resíduos nas regiões mais favorecidas (%)	97,81
Resíduos em regiões adicionalmente permitidas (%)	2,19
PDB ID	4I30

Tabela 1 Dados estatísticos da estrutura cristalográfica da ConM complexada com o GABA e a adenina. Valores entre parênteses correspondem àqueles calculados para a última camada.

Observou-se que o monômero mantém o arranjo de β -sandwich, com as sete fitas- β antiparalelas frontais sobrepostas às seis posteriores (Figura 4, seção 2.2.2). Além disso, a presença dos íons divalentes Ca^{2+} e Mn^{2+} , essencial para a capacidade de ligação das lectinas Diocleinae a moléculas de carboidratos (LORIS et al., 1998), foi conservada, com ambos sendo estabilizados por interações hidrofílicas com resíduos de aminoácidos e duas moléculas de água. No primeiro caso, o Ca^{2+} perfaz seis interações, sendo quatro com as cadeias laterais (Asp10, Asn14 e Asp19) e principal (Tyr12) de resíduos que contribuem para a formação do Domínio de Reconhecimento a Carboidrato (CRD) e duas com as moléculas de água 482 e 485 (Figura 12A). O Mn^{2+} também encontra-se coordenado por seis interações, sendo quatro com as cadeias laterais dos resíduos Glu8, Asp10, Asp19 e His24 e duas com as moléculas de água 486 e 487 (Figura 12B).

Figura 12 Coordenação dos íons divalentes Ca^{2+} (A) e Mn^{2+} (B). Esferas vermelhas representam moléculas de água e o pontilhado amarelo as interações que estabilizam ambos os íons.



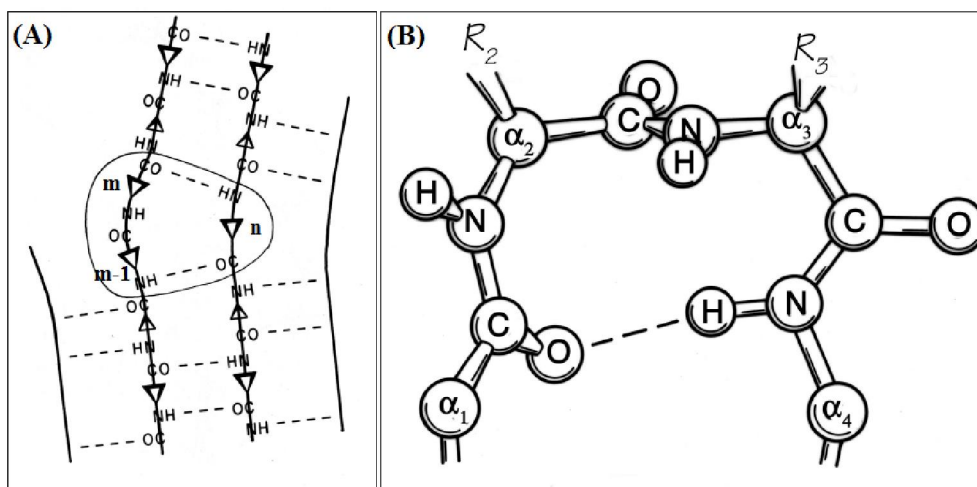
A análise do padrão de ligações de hidrogênio existentes na formação de estruturas secundárias demonstrou a presença de elementos estruturais não reportados anteriormente por nenhum trabalho realizado com lectinas Diocleinae. Estes elementos são chamados na literatura científica de estruturas secundárias não-repetitivas, onde, diferentemente do que ocorre com α -hélices e folhas- β , cujos resíduos formadores possuem aproximadamente os mesmos valores para os ângulos Φ (phi) e Ψ (psi), cada resíduo apresenta um valor característico para estes ângulos de rotação (RICHARDSON, 2007).

Estruturas secundárias não-repetitivas promovem uma mudança na direção da cadeia polipeptídica, podendo ser agrupadas em dois grupos: *tight-turns* e β -*bulges*. As primeiras são definidas como sendo motivos estruturais onde os átomos de carbono C α de dois resíduos separados por 1-5 unidades peptídicas (ou ligações peptídicas) encontram-se a uma distância de menos 7 Å, com os ângulos Φ e Ψ não sendo necessariamente os mesmos para todos os resíduos. Por sua vez, β -*bulges* rompem a regularidade de folhas- β , sendo mais facilmente identificadas em folhas- β antiparalelas. Esta estrutura é definida como sendo uma região presente entre duas ligações de hidrogênio que estabilizam duas fitas sucessivas e que inclui um resíduo de uma fita e dois da outra fita (RICHARDSON, 2007) (Figura 13A).

Segundo Kabasch e Sander (1983), *n-turn* é um segmento de estrutura secundária onde o grupo carbonil de um resíduo, arbitrariamente denominado “i”, perfaz uma ligação de hidrogênio com o grupo –NH do resíduo “i+n”, onde n = 2, 3, 4 ou 5. Neste contexto, *tight-turns*, descritas inicialmente para um sistema de três unidades peptídicas [*3-turn*] (VENKATACHALAN, 1968), onde o grupo CO do primeiro resíduo (i) interage com o grupo –NH do quarto (i+3) (Figura 13B), envolvem, além deste tipo, denominado também de β -*turn*, aqueles descritos como γ -*turn* (MILNER-WHITE, 1990) e π -*turn* (RAJASHANKAR; RAMAKUMAR, 1996), os quais correspondem a 2-*turns* e 5-*turns*, respectivamente. 4-*turns*, também chamadas de α -*turns*, apresentam ângulos de torção Φ e Ψ iguais para todos os três resíduos posicionados entre os resíduos “i” e “i+4”, de modo que este tipo de segmento participa da formação de α -hélices, estruturas secundárias ordenadas e repetitivas (BARLOW; THORNTON, 1988; RICHARDSON, 2007), embora também possam ser encontradas isoladamente, sendo estabilizadas por uma única ligação de hidrogênio e apresentando valores diferentes para Φ e Ψ nos três resíduos centrais (PAVONE et al., 1996).

Desses quatro tipos de *tight-turns*, as “ β ” merecem destaque especial devido a sua maior abundância nas estruturas tridimensionais de proteínas globulares (HUTCHINSON; THORNTON, 1994). Além disso, são caracterizadas por estarem divididas em subclasses de acordo com os valores preditos como ideais para os ângulos Φ e Ψ dos resíduos “i+1” e “i+2” (Tabela 2). A análise estrutural mostrou que a estrutura terciária da ConM contém diversas estruturas secundárias não repetitivas do tipo *tight-turn*, as quais encontram-se listadas na Tabela 3 quanto aos resíduos que as formam, distâncias entre os carbonos C α dos resíduos “i” e “i+n”, distâncias entre o grupo –CO do primeiro resíduo e o –NH do último, bem como o valor do ângulo formado entre –N-H---O. A Tabela 4 mostra as subclasses de β -*turns* identificadas na presente estrutura cristalográfica da ConM.

Figura 13 Representações esquemáticas de estruturas secundárias não repetitivas. (A) Ilustração de uma β -*bulge* do tipo clássica formada entre fitas consecutivas de uma folha-beta antiparalela. Observa-se que o padrão de ligações de hidrogênio é rompida pela realização de uma interação entre o grupo carbonil do resíduo “n” de uma fita e o grupo –NH do resíduo “m-1” da fita adjacente (em uma condição regular, a interação ocorreria com o –NH do resíduo m, como visualizado nos padrões que flanqueiam a β -*bulge*). (B) Ilustração de uma *tight-turn*, evidenciando a mudança de direção tomada pela cadeia polipeptídica. É destacada ainda a ligação de hidrogênio que conecta o grupo carbonil do resíduo “n” (α_1) e o grupo –NH do resíduo “n+3” (α_4). Esferas contendo “ α ” representam os átomos de carbono C α . R2 e R3 representam as cadeias laterais dos resíduos “n+1” e “n+2”, respectivamente. Ambas as figuras foram modificadas de Richardson (2007).



Dentre as *tight-turns* observadas, pode-se destacar as β -turns que envolvem os resíduos Asn14-G18, Asp80-Val84 e Thr226-Leu230, as quais aparecem como pequenas “hélices” quando a estrutura terciária da ConM é representada na forma de *cartoon* pelo programa PyMol (Schrödinger, LLC), como observado na Figura 14. Entretanto, como discutido na seção “Discussão” mais adiante, estas estruturas secundárias, de fato, não podem ser consideradas como sendo hélices verdadeiras. Assim foi proposto que as mesmas sejam denominadas de “pseudohélices” (PHs), onde, no presente trabalho, o primeiro destes segmentos corresponde à PH1, o segundo à PH2 e o terceiro à PH3.

Tipo	Φ_{i+1}	Ψ_{i+1}	Φ_{i+2}	Ψ_{i+2}
I	-60	-30	-90	0
I'^a	60	30	90	0
II	-60	120	80	0
II'^a	60	-120	-80	0
III^b	-60	-30	-60	-30
IV^c	-	-	-	-
V^d	-80	80	80	-80
V'^a	80	-80	-80	80
Via^e	-60	120	-90	0
VIb	-135	135	-75	160
VII^d	-	-	-	-

Tabela 2 Classificação das β -turns baseada em Richardson (2007). Valores de Φ e Ψ dados em graus.

^a Tipos I', II' e V' são imagens especulares de I, II e V, respectivamente. Ou seja, os valores são os mesmos, trocando-se apenas o sinal.

^b Tipo especial de β -turn com caráter helicoidal (3_{10} -hélice), devido conservação dos valores de Φ e Ψ para ambos os resíduos.

^c Qualquer β -turn cujos resíduos apresentem valores de Φ e Ψ que difiram mais de 40° em relação aqueles reportados como ideais para os demais tipos.

^d Reportados em algumas estruturas, mas com contínuo debate sobre sua categorização como grupos separados. No caso do tipo VII, sua definição leva em consideração apenas dois ângulos: $\Phi_{n+2} = 180^\circ$ e $\Psi_{n+1} < 60^\circ$ ou $\Phi_{n+2} < 60^\circ$ e $\Psi_{n+1} = 180^\circ$.

^e Presença de uma cis-prolina na posição “n+2”. Diferença entre subtipos “a” e “b” de acordo com conformação deste resíduo.

Sequência	Ca_i-Ca_{i+n} (Å)	CO_i-NH_{i+n} (Å)	Ângulo NH---O *	Classe
Tyr12-Asn14	6.33	3.16	114.7	γ
Asn14-Ile17	4.75	2.87	153.9	β
Thr15-Gly18	4.95	3.35	154.0	β
Trp40-Met42	5.92	3.17	131.5	γ
Gln43-Lys46	5.35	2.86	154.9	β
Asn55-Lys59	5.61	2.90	137.5	α
Tyr67-Gly70	5.49	2.84	151.4	β
Asp80-Asn83	5.67	2.78	147.8	β
Leu81-Val84	4.69	2.80	158.4	β
Leu81-Leu85	5.66	2.73	167.2	α
Gln137-Leu140	5.68	3.04	154.2	β
Ser160-Gly163	5.54	2.96	135.6	β
Glu183-Ala186	5.36	2.73	150.4	β
Asn216-Ser219	5.55	3.00	166.5	β
Thr226-Leu229	5.78	3.27	161.0	β
Gly227-Leu230	6.01	3.45	150.9	β

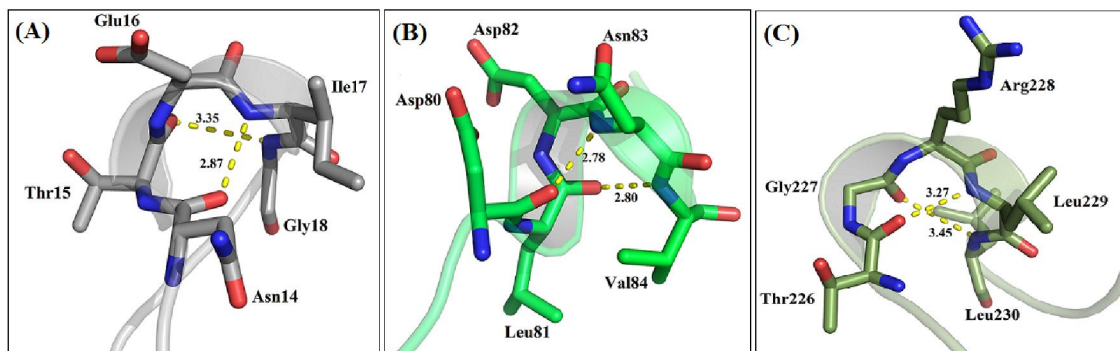
Tabela 3 *Tight-turns* identificadas na estrutura terciária da ConM. A segunda coluna refere-se à distância entre os átomos de carbono Ca do primeiro e último resíduos que formam cada *turn*. A terceira coluna refere-se à distância entre os átomos doador e aceptor da ligação de hidrogênio que estabiliza a respectiva *turn*. A quarta coluna contém valores referentes ao ângulo (dado em graus) formado entre os três átomos envolvidos na ligação de hidrogênio.

* Segundo Arunan e colaboradores (2011), o ângulo formado entre o átomo doador, o hidrogênio e o aceptor deve ser maior ou igual a 110° e menor ou igual a 180° . A partir deste ponto, cada interação de hidrogênio descrita no presente trabalho será acompanhada da distância mensurada entre o átomo doador e aceptor e do valor mensurado para o seu respectivo ângulo.

Sequência	Φ_{i+1}	Ψ_{i+1}	Φ_{i+2}	Ψ_{i+2}	Tipo
Asn14-Ile17	-64.3	-20.7	-44.6	-49.0	IV
Thr15-Gly18	-44.6	-49.0	-112.7	36.3	I
Gln43-Lys46	-51.1	133.5	72.5	1.9	II
Tyr67-Gly70	-63.9	-19.8	-79.3	-4.7	I
Asp80-Asn83	-61.3	-18.3	-57.9	-32.8	I
Leu81-Val84	-57.9	-32.8	-88.1	5.7	I
Gln137-Leu140	-70.9	-5.4	-97.0	10.9	I
Gln143-Ala146	58.5	-134.6	-87.6	6.8	II'
Ser160-Gly163	-47.1	-32.5	-92.8	22.3	I
Glu183-Ala186	-70.0	-19.5	-87.5	-9.9	I
Asn216-Ser219	-61.5	-32.2	-81.1	1.3	I
Thr226-Leu229	51.5	-113.3	-71.5	-27.1	II'
Gly227-Leu230	-71.5	-27.1	-84.7	-8.9	I

Tabela 4 β -turns identificadas na estrutura terciária da ConM, sendo listados os ângulos de torção (em graus) e, baseado nisto, sua respectiva subclasse.

Figura 14 Pseudohélices identificadas no monômero da ConM. (A) PH1 formada pelas β -turns N14-I17 e T15-G18. (B) PH2 formada pelas β -turns D80-N83 e L81-V84. (C) PH3 formada pelas β -turns T226-L229 e G227-L230. Pontilhado amarelo refere-se à ligação de hidrogênio existente entre o grupo carbonil do resíduo “i” e o -NH do resíduo “i+3”.

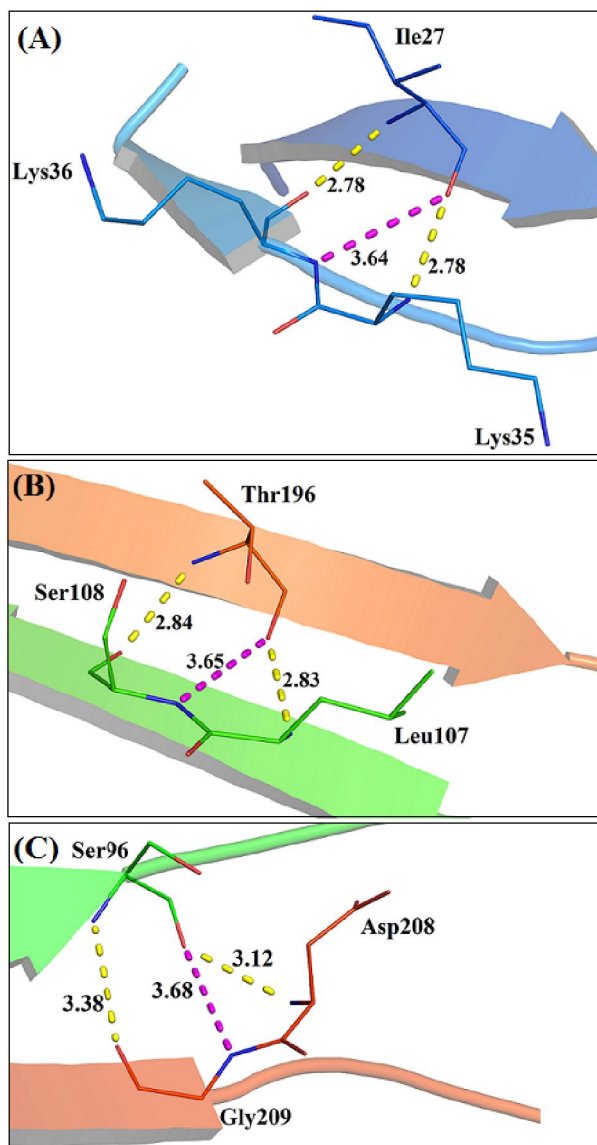


Além das *tight-turns*, outra estrutura secundária não repetitiva identificada na presente estrutura cristalográfica da ConM foi uma β -*bulge*. Em sua forma clássica, esse tipo de arranjo ocorre quando a carbonila de um resíduo de aminoácido (n) em uma fita atua como aceptora de hidrogênio para o grupo –NH do resíduo “m-1” da fita adjacente, podendo ou não também aceitar um hidrogênio do resíduo “m” (CHAN et al., 1993). No primeiro caso, esta forma clássica é denominada de C+ e a ligação de hidrogênio entre –CO (n) e –NH (m) é mais fraca que aquela performada entre “n” e “m-1” devido à distância entre os átomos doador e acceptor (Figura 13A). Já no segundo caso, a interação entre “n” e “m” não existe e a β -*bulge* clássica é denominada C-. Em uma folha- β regular, –CO (n) interage apenas com o –NH do resíduo “m” (KABSCH; SANDER, 1983).

Diferentemente do que ocorre com a β -*bulge* clássica, onde o resíduo “m-1” encontra-se dentro da fita, a subclasse G1 apresenta este resíduo posicionado ou no início de uma fita ou no final de um *loop*, onde, na maioria das vezes, este resíduo é uma glicina. Quando não o é, a β -*bulge* é denominada G1A (CHAN et al., 1993).

As figuras 15A, 15B e 15C mostram as três β -*bulge* presentes na estrutura terciária da ConM. A primeira envolve o resíduo I27 (n) da fita número dois e os resíduos K35 (m-1; 2.78 Å; 146.8°) e K36 (m; 2.78 Å; 158.1°) da fita número três. A segunda β -*bulge*, por sua vez, ocorre entre o resíduo T196 (n) da fita número 12 e os resíduos L107 (m-1; 2.83 Å; 135.7°) e S108 (m; 2.84 Å; 160.6°) da fita número oito. Já a terceira estrutura não repetitiva deste tipo é formada entre o resíduo S96 (n) da fita número sete e os resíduos D208 (m-1; 3.12 Å; 170.3°) e G209 (m; 2.38 Å; 150.8°) da fita número 13.

Figura 15 β -bulges identificadas na estrutura tridimensional da ConM. (A), (B) e (C) correspondem, respectivamente, às estruturas formadas pelas trincas de resíduos I27-K35-K36, L107-S108-T196 e S96-D208-G209. I27, S96 e T196 correspondem ao resíduo “n” da figura 12A, enquanto K35, L107 e D208 referem-se ao resíduo “m-1” e K36, S108 e G209 ao resíduo “m”. Pontilhados amarelos são interações de hidrogênio entre –NH (n) e –CO (m) e entre –CO (n) e –NH (m-1). Pontilhados magentas representam as distâncias entre –CO (n) e –NH (m), mostrando que, de acordo com seus valores, ligações de hidrogênio não podem ser formadas entre estes dois grupos.



5.3 COORDENAÇÃO DO GABA

A análise estrutural da ConM co-cristalizada com o GABA mostrou uma densidade eletrônica em torno de 1.00σ compatível com a estrutura do aminoácido não-proteico, onde a mesma encontra-se no mesmo bolsão hidrofóbico reportado anteriormente para o isômero α -aminobutirato nas estruturas cristalográficas das lectinas de *Canavalia gladiata* (DELATORRE et al., 2007) e *C. brasiliensis* (BEZERRA et al., 2011). Após posicionamento do modelo tridimensional do GABA, obtido a partir da plataforma eletrônica hicup (<http://xray.bmc.uu.se/hicup/>; KLEYWEGT, 2007), sobre o mapa e subsequente refinamento, observou-se que de fato a região era um sítio de ligação para o GABA.

O GABA encontra-se estabilizado por interações de hidrogênio, hidrofóbicas e forças de van der Waals com resíduos de aminoácidos presentes nas fitas oito e nove da folha- β posterior e no *loop* que conecta a fita 11, da porção anterior, à fita 12 posterior e por duas moléculas de águas (Figura 16).

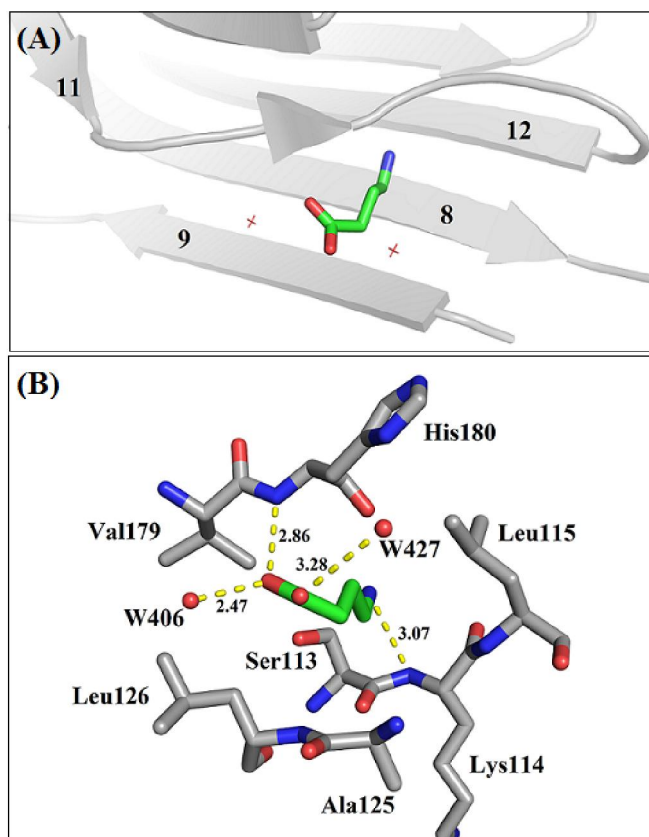
Como o GABA apresenta grupos ionizáveis, procuramos inferir se o mesmo encontrava-se protonado ou não em virtude do pH da solução de cristalização. Para tanto, calculou-se seu pKa, através do servidor *on-line* PROPKA 3.1 (LI; ROBERTSON; JENSEN, 2005), para os grupos carboxil e amino, sendo obtido os valores de 4.38 e 8.38, respectivamente. Levando em consideração que a solução de cristalização apresentava um pH de 8.5, o GABA apresentou-se desprotonado apenas no grupo carboxil, tendo, portanto, uma carga líquida igual a zero. Neste sentido, o átomo de oxigênio OE2 (desprotonado) atua apenas como acceptor de hidrogênio, e assim o faz para a molécula de água 406 (2.47 Å; 106.1°)¹ e para o átomo de nitrogênio N da cadeia principal do resíduo His180 (2.86 Å; 163.5°). Por sua vez, o grupo amino atua como doador de hidrogênio, estabelecendo uma interação com o grupo -NH da cadeia principal do resíduo Lys114 (3.07 Å; 133.8°). O átomo de oxigênio OE1, não protonado por partilhar duas ligações covalentes com o átomo de carbono CD, não perfaz ligação de hidrogênio, embora seja estabilizado por meio de uma interação de van der Waals com a água 427 (3.28 Å).

¹ Ângulo de ligações de hidrogênio envolvendo moléculas de água e proteínas varia entre 100° e 140° (PETHUKOV et al., 2004).

Além destas ligações de hidrogênio convencionais, a molécula de GABA encontra-se estabilizada por ligações não convencionais envolvendo grupos –C-H como doadores. Por exemplo, seu átomo de carbono CG perfaz uma interação com o átomo de oxigênio OG do resíduo Ser113 (2.69 Å; 132.8°), enquanto o átomo de nitrogênio N de seu grupo amino aceita um hidrogênio do átomo de carbono CB do mesmo resíduo Ser113 (2.27 Å; 149.5°).

Já as interações hidrofóbicas são estabelecidas entre seus átomos de carbono e aqueles presentes na cadeia lateral dos resíduos Ser113, Leu115, Asn124, Leu126, Val179 e His180 e na cadeia principal de quase todos estes resíduos, excetuando-se a Leu115. A Tabela 5 lista as distâncias envolvendo todas estas interações.

Figura 16 Estabilização da molécula de GABA (verde) no bolsão hidrofóbico da ConM. (A) Visão geral da disposição do aminoácido não proteico, destacando as estruturas secundárias que compõem seu sítio de ligação. Os “x” vermelhos representam as moléculas de água que participam da estabilização do ligante e o números indicam a posição das fitas dentro da estrutura da ConM. (B) Disposição do GABA em relação aos resíduos de aminoácidos (cinza) que participam de sua estabilização, seja por interações hidrofílicas (pontilhados amarelos) ou hidrofóbicas (Tabela 5). Resíduo Asn124 e interações de hidrogênio não convencionais omitidas para uma visualização mais clara. Esferas vermelhas representam as moléculas de água.



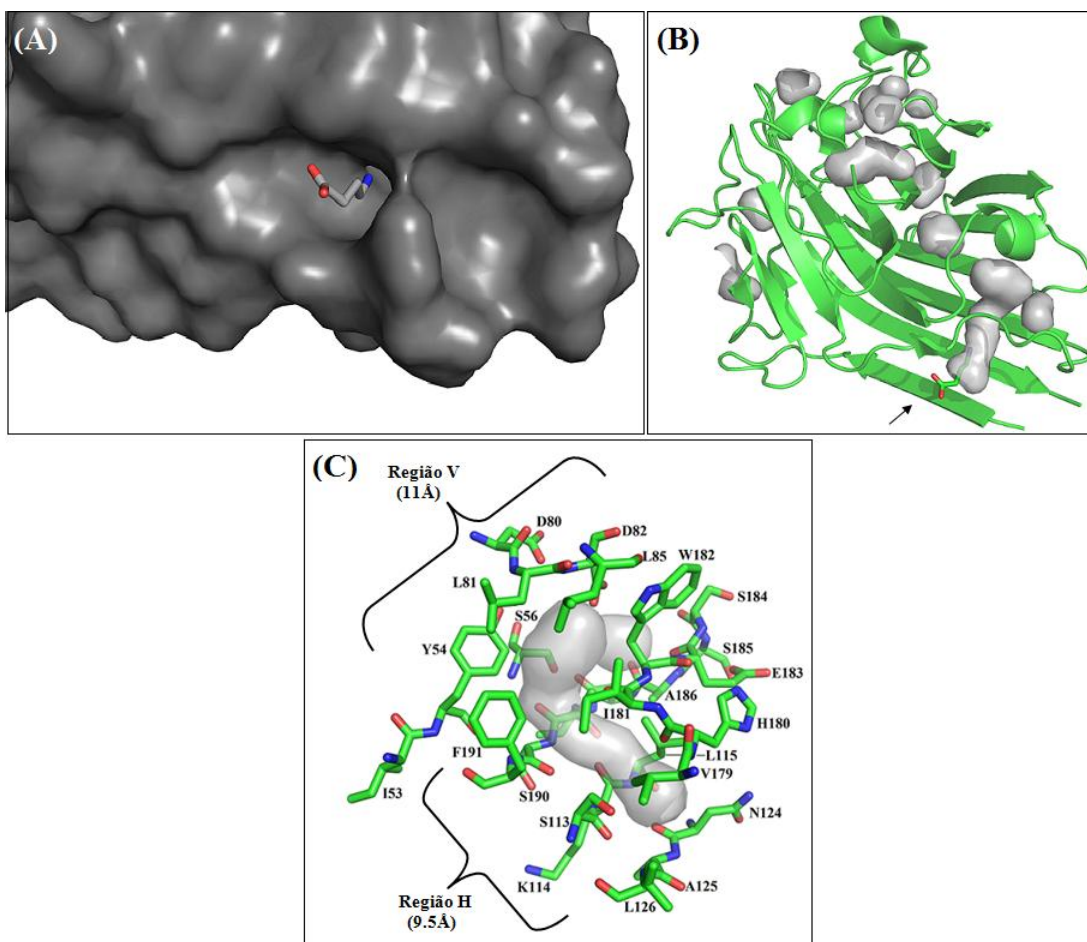
Resíduo	GABA			
	CD	CA	CB	CG
Ser113				
CA	-	-	-	3.51
CB	-	-	-	2.82
C	-	-	-	2.93
Lys114				
CA	-	-	-	3.68
C	-	-	-	3.80
Leu115				
CD1	-	-	3.70	-
CD2	-	-	-	4.71
CG	-	-	3.89	4.01
Asn124				
CA	-	4.66	-	-
CB	-	4.06	-	-
C	-	3.93	-	4.71
Ala125				
CA	4.82	3.80	-	4.37
C	4.41	3.79	-	4.72
Leu126				
CA	4.86	4.70	-	-
CB	4.17	4.29	-	-
Val179				
CA	4.67	-	-	-
CG1	4.70	-	4.16	-
C	4.62	-	-	-
His180				
CA	4.28	4.69	4.74	-
CB	3.75	4.19	3.69	-
CG	-	-	4.78	-
C	4.79	4.74	3.52	-

Tabela 5 Interações hidrofóbicas que estabilizam a molécula de GABA em seu sítio de ligação. Distâncias dadas em Å.

Um modelo em superfície do sítio de ligação ao GABA mostra que no monômero da ConM este aminoácido não proteico encontra-se posicionado na “entrada” de um “canal/túnel” que se estende da superfície ao interior da proteína, onde está presente um bolsão em forma de “L” formado em sua maior parte por resíduos hidrofóbicos (Figura 17).

A porção ou região horizontal (região H) é mais curta e estreita, com um comprimento de 9.5 Å, baseado na distância entre os carbonos Cα dos resíduos Ala125 e Ser190, os quais recobrem a porção inferior do “canal/túnel”, estando disposto cerca de 110° em relação à porção vertical (região V), a qual dilata-se onde a região H termina, estendendo-se 11.0 Å entre o Cα da Ser190 e o Cα do Asp82, o qual reveste o “teto” da região V.

Figura 17 Modelo em superfície do sítio de ligação ao GABA. (A) Superfície da ConM, destacando a cavidade onde se encontra o aminoácido não proteico (bastão). (B) Cavidades e bolsões presentes na estrutura terciária da ConM, destacando-se o sítio do GABA (seta). (C) Bolsão hidrofóbico (cinza) em “L” onde o GABA está coordenado, destacando-se os principais resíduos de aminoácidos que compõem as regiões horizontal (H) e vertical (V)

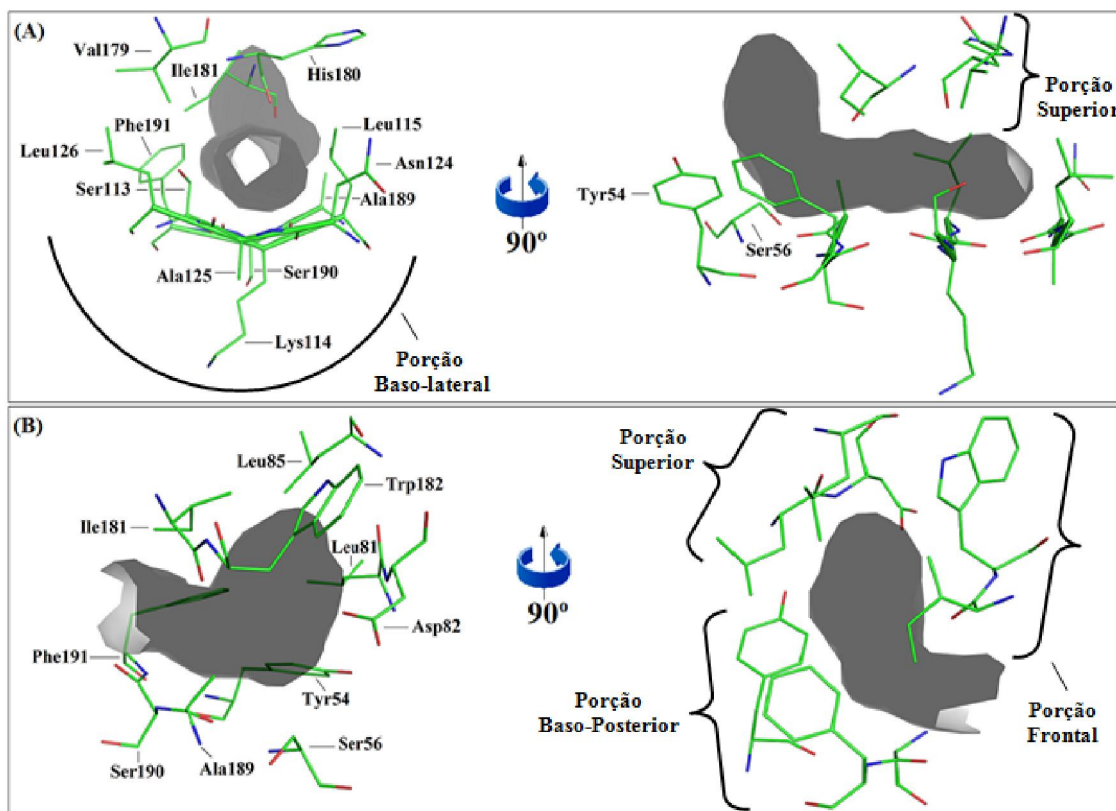


O revestimento baso-lateral da região H envolve três trincas de resíduos localizados nas fitas nove (Asn124-Leu126), oito (Ser113-Leu115) e doze (Ala189-F191), as quais fazem parte da folha- β posterior no arranjo em β -sanduíche. Inferiormente, a região é recoberta pelos átomos da cadeia principal C-N-C α -C, considerando a direção da cadeia polipeptídica. Assim, por exemplo, a base da entrada do canal é formada pelo carbono C da Asn124 e pelos átomos N, C α e C da Ala125. Devido ao padrão antiparalelo das fitas, as cadeias laterais dos resíduos centrais das trincas estão apontadas para a superfície da proteína, por isso o revestimento basal ocorre pelos átomos da cadeia principal destes resíduos (Figura 18A, esquerda). Pelo mesmo motivo, os resíduos distais das trincas apresentam suas cadeias laterais apontadas para o interior da proteína, estando, portanto, revestindo os lados do canal/túnel (Figura 18A, direita). Superiormente, a região H encontra-se revestida pelos resíduos Val179, His180 e I181, presentes no *loop* que conecta a fita 11 à fita 12. Na estrutura da ConM, o GABA está localizado no início do canal, sendo estabilizado por interações realizadas com os mesmos resíduos das fitas oito e nove e do loop 11 $\rightarrow$ 12, como visto anteriormente.

Quando a região H termina no interior da ConM, tendo seu avanço limitado pela presença do resíduo Tyr54, ocorre uma dilatação do canal/túnel de entrada, formando a região V. Esta encontra-se revestida basalmente pela cadeia principal da última trinca da região H (Ala189-F191), estando um lado limitado pela cadeia lateral da F191 e o outro pela Ser56. A porção frontal é protegida pela I181 e pelo Trp182, enquanto sua porção superior (ou “teto”) é limitada pelos resíduos Leu81, Asp82 e Leu85 (Figura 18B).

Uma vez que o arranjo estrutural que confere atividade biológica às lectinas de leguminosas envolve a formação de um dímero ou tetrâmero, construímos um modelo do dímero canônico para a ConM complexada com o GABA baseado em cálculos de simetria através do programa PyMol (Schrödinger, LLC). O resultado obtido (Figura 19A) mostra que de fato o GABA encontra-se posicionado na interface do dímero, onde um modelo de superfície para o arranjo mostra o aminoácido não proteico protegido do conteúdo de solvente do meio. Apesar disso, a participação de resíduos da cadeia gerada (Figura 19B) para esta estabilização parece ser minoritária em relação à estrutura cristalográfica. Nesse sentido, apenas o resíduo Asp139 na cadeia simétrica parece apresentar potencial para uma possível interação com o GABA.

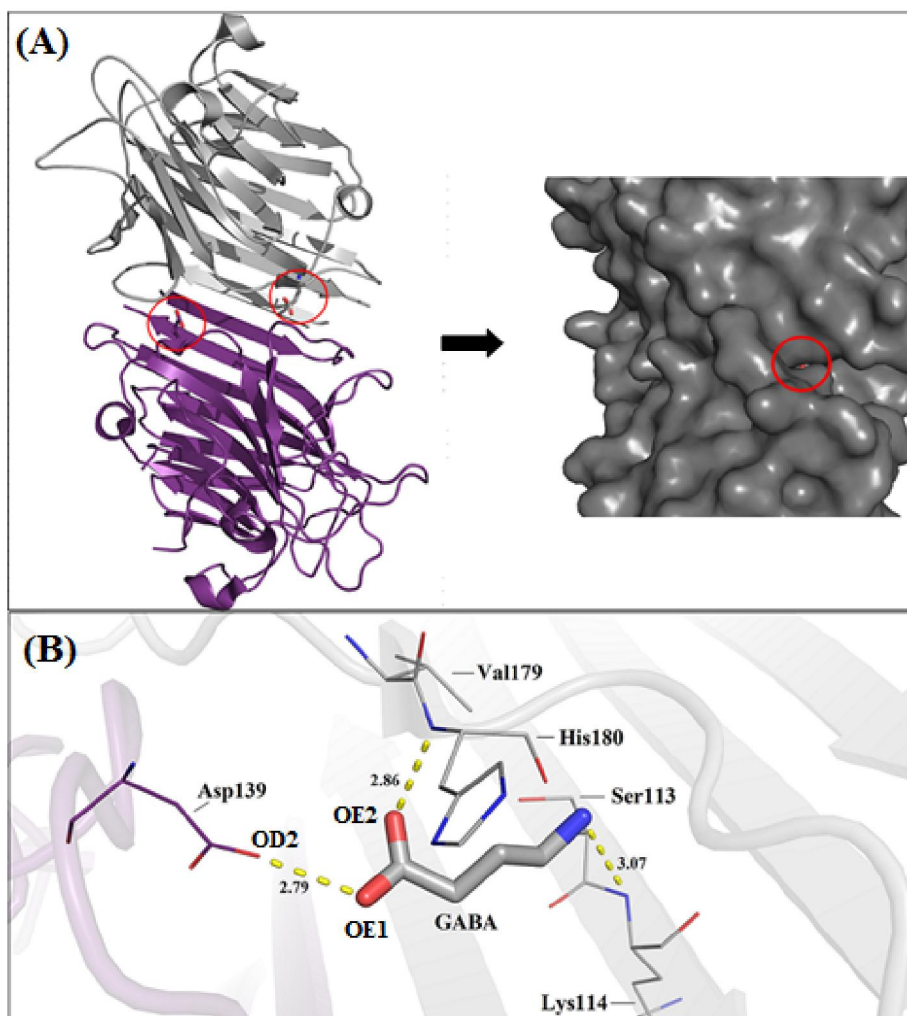
Figura 18 Bolsão hidrofóbico em “L”. (A) Disposição dos resíduos de aminoácidos que recobrem a região horizontal (H) do bolsão. À esquerda uma visão frontal a partir da superfície da entrada do sítio, destacando-se os resíduos que formam a porção baso-lateral. À direita encontra-se uma visão lateral da imagem à esquerda, destacando-se a porção superior da região H. É possível visualizar a forma em “L” invertido do bolsão. Resíduos Tyr54 e Ser56 limitam esta região. (B) Disposição dos resíduos que recobrem a porção vertical (V). À direita destacam-se as porções formadoras desta região.



Considerando que a maior parte do GABA presente em uma célula esteja em sua forma desprotonada (com carga líquida igual a zero) (TSAI; MCCARTHY; MILLER, 2013) e que resíduos de aminoácidos em uma cadeia polipeptídica podem apresentar valores de pKa diferentes daqueles calculados para uma solução do resíduo isolado (DI RUSSO et al., 2012), procuramos mensurar este valor para o Asp139 a fim de inferir se o mesmo encontrava-se protonado ou não. Para isto, utilizamos o servidor on-line PCE (*Protein Continuum Electrostatics*), que realiza cálculos computacionais para prever propriedades eletrostáticas de proteínas (MITEVA; TUFFÉRY; VILLOUTREIX, 2005). O programa predisse um valor de 4.382 para o pKa do Asp139 dentro da cadeia polipeptídica, significando que o mesmo encontra-se desprotonado, de modo que sua participação na estabilização do GABA, quando

considerado o arranjo biológico, envolveria apenas a realização de interações de van der Waals.

Figura 19 Modelo de arranjo biológico para o complexo ConM/GABA. (A) Dímero canônico gerado por cálculos de simetria. À esquerda é mostrado o modelo em cartoon, com a cadeia cristalográfica em cinza e a simétrica em roxo. Círculos vermelhos destacam as moléculas de GABA na interface do dímero. À direita é mostrado um modelo em superfície para o dímero canônico, sendo destacado (círculo vermelho) que o GABA encontra-se protegido do conteúdo do meio. (B) Interações hidrofílicas que estabilizariam o aminoácido não proteico na interface dimérica. Como observado, apenas o Asp139 da cadeia simétrica (roxo) participaria da estabilização do ligante. Distâncias dadas em Å.



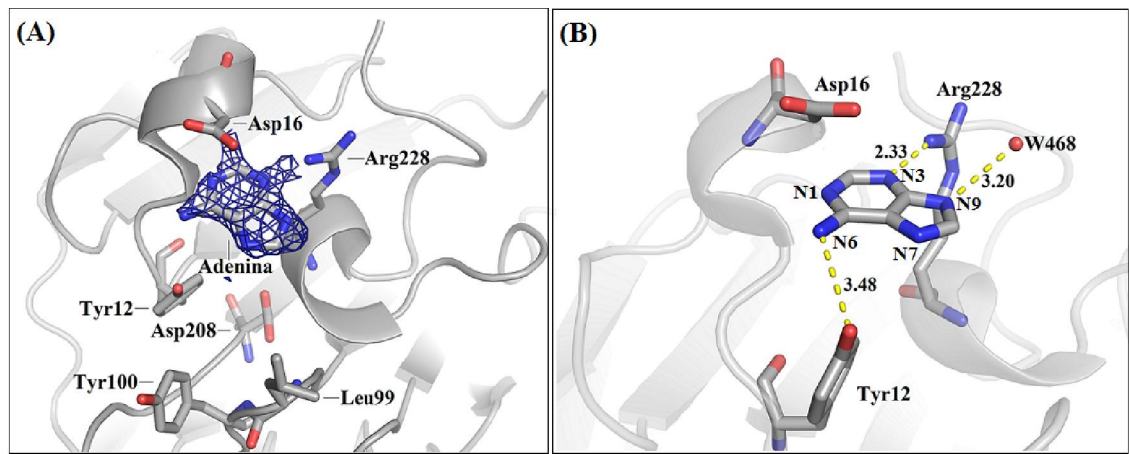
5.4 COORDENAÇÃO DA ADENINA

Apesar de alguns estudos terem demonstrado que lectinas vegetais tem a capacidade se ligarem à adenina (MALIARIK; GOLDSTEIN, 1988; ROBERTS et al., 1986), inclusive com alguns trabalhos mostrando a estrutura cristalográfica do complexo (HAMELRYCK et al., 1999), o resultado obtido pela pesquisa revela algo completamente inesperado: a estabilização da base nitrogenada mediada por resíduos de aminoácidos que compõem o CRD da ConM (Figura 20A). Tal estabilização ocorre por intermédio de interações de hidrogênio e hidrofóbicas e forças de van der Waals.

Quase todos os átomos de nitrogênio da adenina participam da coordenação da molécula por meio de ligações de hidrogênio, com exceção do N1 e do N7 (Figura 20B), embora o primeiro perfaça interações de van der Waals com os grupos –NH dos resíduos Thr15 e Asp16 e com os átomos de oxigênio OD1 e OD2 da cadeia lateral deste resíduo. N3 perfaz interações de van der Waals com os átomos de nitrogênio ND2 da Asn14 e de oxigênio OD2 do Asp16, bem como atua como um átomo acceptor de hidrogênio para o átomo NH1 da Arg228 (2.33 Å; 135.4°). O nitrogênio N9 é um doador para a molécula de água 468 (3.20 Å; 134.4°). Por sua vez, N6 é tanto acceptor quanto doador de hidrogênio para o átomo de oxigênio OH da Tyr12, distanciando-se deste em 3.48 Å, embora no primeiro caso o ângulo formado entre O-H---N seja 121.3° e no segundo (N-H---O) seja de 131.3°. Diferentemente do que ocorre com a molécula do GABA, o anel purínico não perfaz ligações de hidrogênio não convencionais.

A ocorrência de interações hidrofóbicas para estabilização da adenina envolve quase todos os seus átomos de carbono, exceto C8. Estas interações, ainda, envolvem átomos de carbono da cadeia lateral dos resíduos Tyr12, Asn14, Asp16, Ile17 e Arg228 e o carbono Cα da Asn14 e do Asp16. A Tabela 6 lista as distâncias mensuradas para estes contatos.

Figura 20 Ligação da adenina no CRD da ConM. (A) Disposição da base nitrogenada em relação aos resíduos de aminoácidos do CRD. Mapa de densidade eletrônica 1.0 σ (azul). (B). Interações de hidrogênio (pontilhados amarelos) que estabilizam o anel purínico, destacando-se os átomos de nitrogênio desta estrutura. Esfera vermelha representa a molécula de água 468. Distâncias dadas em Å.



Resíduo	Adenina				
		C2	C4	C5	C6
Tyr12					
	CE2	-	-	4.39	-
	CZ	-	-	4.93	-
Asn14					
	CA	3.42	4.87	4.67	3.75
	CB	3.01	4.20	4.39	3.91
	CG	3.78	4.19	4.30	4.13
	C	3.80	-	-	4.56
Asp16					
	CA	3.65	-	-	-
	CB	2.46	4.31	4.67	4.04
	CG	2.96	4.28	4.32	3.67
	C	4.32	-	-	-
Ile17					
	CB	4.91	-	-	-
	CG1	4.65	-	-	-
	CG2	4.25	-	-	-
Arg228					
	CD	-	3.87	-	-
	CZ	-	4.19	-	-

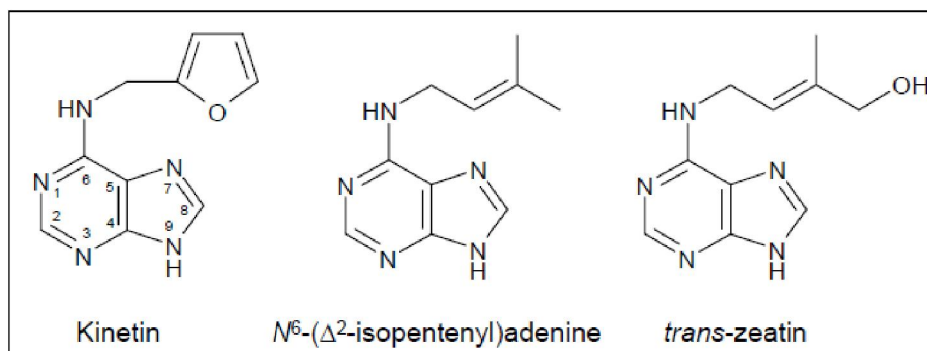
Tabela 6 Interações hidrofóbicas que estabilizam a adenina no sítio de ligação a carboidrato da ConM. Distâncias dadas em Å.

5.5 DOCKING MOLECULAR

5.5.1 Complexos entre Lectinas e Citocininas

Baseado na presença da adenina no CRD da ConM, procuramos verificar se citocininas, hormônios vegetais derivados desta base nitrogenada (SCHMÜLLING, 2004) e envolvidos em diversos processos fisiológicos, como divisão celular (BARCISZEWSKI; MASSINO; CLARK, 2007) e defesa contra herbivoria e patógenos (CHOI et al., 2011; GIRON et al., 2012), teriam também a capacidade de se ligarem à ConM através de seu sítio de ligação a carboidrato. Para isto, realizamos processos de *docking* molecular, por meio do programa Hex 6.3 (RITCHIE; KEMP, 2000), entre esta lectina e as principais formas naturais deste fitohormônio: isopenteniladenina (ZIP), *trans*-zeatina (tZEA) e kinetina (KIN). Os dois primeiros contem um grupo isoprenoide ligado ao átomo de nitrogênio N6 da adenina, onde ZIP apresenta uma cadeia de isopentenil, a qual encontra-se hidroxilada na estrutura de ZEA. Por sua vez, a kinetina, que foi a primeira citocinina descoberta (MILLER et al., 1955), apresenta um grupo furfuril ligado ao N6 da base nitrogenada (Figura 21).

Figura 21 Estruturas moleculares das três principais citocininas naturais encontradas em plantas. Adaptado de Schmölling (2004).



As Figuras 22A e 22B mostram, respectivamente, que o *docking* resultou em um posicionamento muito similar para tZEA e KIN no CRD da ConM. De fato, as interações que estabilizariam o anel purínico nas duas situações são praticamente as mesmas, com o mesmo

interagindo com os resíduos Gly224, Ser225, Thr226, Gly227, Arg228 e Leu229. Também, de forma semelhante, a estabilização da base nitrogenada nas estruturas dos dois fitohormônios envolveria ligações de hidrogênio não convencionais, onde o átomo de nitrogênio N1 aceitaria uma interação do carbono CD da Arg228 e o átomo de carbono C2 doaria um hidrogênio para o nitrogênio NE deste mesmo resíduo. Para a tZEA, estas respectivas distâncias são 3.21 Å (141.4°) e 3.35 Å (133.3°), enquanto para a KIN são de 3.32 Å (138.4°) e 3.37 Å (138.3°).

As cadeias ligadas ao N6 da adenina também mostram semelhanças quanto às interações que seriam realizadas para a estabilização da tZEA e da KIN. Em ambos os casos há o envolvimento de interações hidrofóbicas entre seus átomos de carbono e aqueles presentes nas cadeias laterais e principais dos resíduos Tyr12, Asn14, Gly98, Leu99, Tyr100, Ala207, Asp208 e Arg228, embora a contribuição de alguns destes difira em cada complexo (as Tabelas 7 e 8 listam as interações hidrofóbicas envolvendo o anel purínico e as cadeias a ele ligadas que estão presentes nas estruturas da ConM submetida a *docking* molecular com a tZEA e a KIN, respectivamente). Além disso, ligações de hidrogênio convencionais fazem parte da rede interações que ligam as estruturas dos fitohormônios ao CRD da ConM. Para a tZEA, seu átomo de oxigênio O16 doa um hidrogênio para a hidroxila da Tyr12 (3.50 Å; 113.9°), enquanto o oxigênio da KIN atua como aceptor para o hidrogênio do grupo –NH da cadeia principal do resíduo Leu99 (3.48 Å; 154.7°).

Apesar destas semelhanças, diferenças nas interações dos dois hormônios vegetais com a ConM foram observadas. Além de diferirem quanto à contribuição dos resíduos de aminoácidos para as interações hidrofóbicas com as cadeias laterais das duas estruturas, como mencionado anteriormente e constatado nas Tabelas 7 e 8, outras observações puderam ser realizadas. Por exemplo, o átomo N6 do anel purínico desta última aceita um hidrogênio do grupo –NH da cadeia principal do resíduo de Arg228 (3.06 Å; 152.3°), enquanto estes mesmos átomos na KIN perfazem interações de van der Waals um com o outro. Além disso, enquanto o carbono C8 da tZEA interage com os carbonos CG e CD1 da Leu229 (Tabela 7), o mesmo perfaz interação apenas com o CD1 na KIN (Tabela 8). Por fim, o átomo N7 da KIN aceita um hidrogênio do carbono CA da Gly227 (3.36 Å; 137.9°), ao passo que não há interação entre estes átomos no complexo ConM/tZEA.

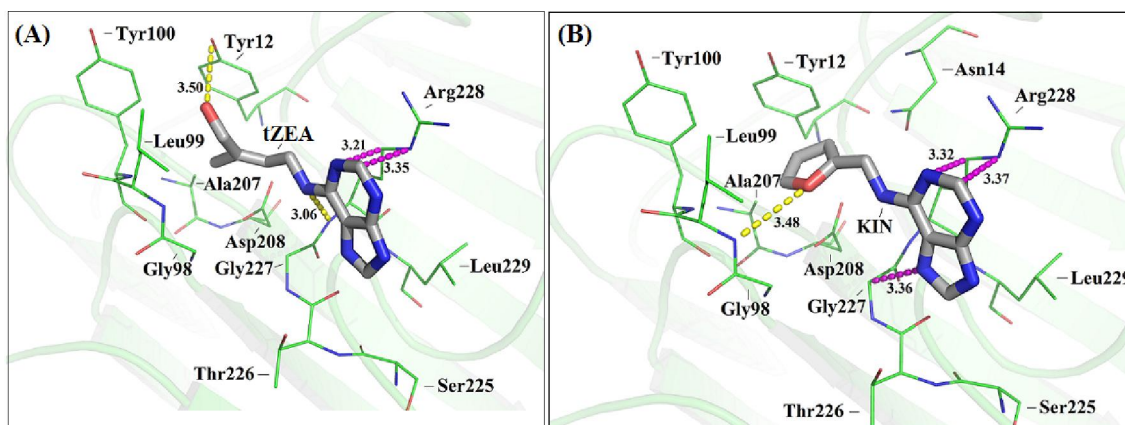


Figura 22 Docking molecular da ConM (verde) com as citocininas (cinza) *trans*-zeatina [tZEA] (A) e kinetina [KIN] (B). Em ambas as figuras são destacadas as ligações de hidrogênio convencionais (pontilhados amarelos) e não convencionais (pontilhados magentas) que participariam da estabilização dos dois ligantes. Como observado, ambas as moléculas adquirem posicionamento bastante similar dentro do CRD da lectina, embora as interações envolvidas difiram nos dois casos. $E_{tZEA} = -274.86$ Kcal/mol; $E_{KIN} = -220.75$ Kcal/mol.

A análise estrutural do complexo resultante do *docking* da ConM com a ZIP mostrou que o fitohormônio encontra-se posicionado de maneira diferente em relação à tZEA e à KIN. A Figura 23 mostra que ZIP sofreu uma rotação de aproximadamente 180° quando comparado com as outras duas estruturas, estando sua base nitrogenada mais próxima aos resíduos Tyr12, Leu99 e Tyr100 e sua cadeia ligante ao N6 da adenina voltada para a Arg228. Sua coordenação no CRD da ConM envolve um número intermediário de interações hidrofóbicas (97) em relação àquelas reportadas para a tZEA e a KIN (99 e 81, respectivamente).

Na estabilização do anel purínico, todos os seus átomos de carbono participam da formação de interações hidrofóbicas, perfazendo-as com os resíduos Tyr12, Gly98, Leu99, Tyr100, Ala207 e Asp208. Além disso, apenas seus átomos de nitrogênio N6, N7 e N9 participam da coordenação da base. O primeiro perfaz uma ligação de hidrogênio não convencional com o átomo CA da Gly227 (3.41 Å; 124.3°), enquanto o segundo interage por intermédio de forças de van der Waals com os oxigênios OD1 e OD2 da cadeia lateral do resíduo Asp208. Já o terceiro nitrogênio atua como aceptor de uma ligação de hidrogênio convencional com o grupo –NH do resíduo Tyr100 (3.28 Å; 139.0°).

A cadeia isopentenil da ZIP, semelhantemente ao observado para tZEA e KIN, não perfaz interações de hidrogênio não convencionais. Deste modo, sua estabilização restante é proporcionada exclusivamente por interações hidrofóbicas entre seus átomos de carbono C12,

C13, C14 e C15 com aqueles dos resíduos Gly224, Ser225, Thr226, Gly227, Arg228 e Leu229. Estas interações, bem como aquelas realizadas pelo anel purínico, estão listadas na Tabela 9.

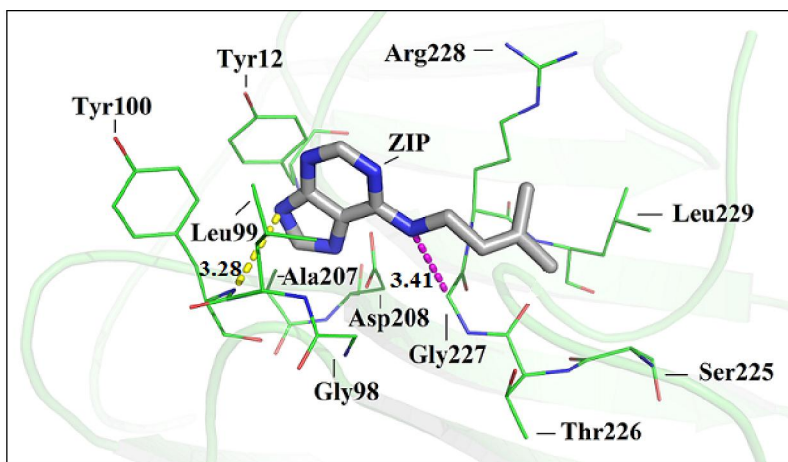


Figura 23 Docking molecular da ConM (verde) com a citocinina (cinza) isopenteniladenina (ZIP). São destacadas as ligações de hidrogênio convencionais (pontilhado amarelo) e não convencionais (pontilhado magenta) que participariam da estabilização do ligante. Como observado, a ZIP adquire um posicionamento diferente daquele reportado para a tZEA e a KIN (figura 22). $E_{ZIP} = -262.65$ Kcal/mol.

Resíduo	<i>trans</i> -Zeatina									
	C2	C4	C5	C6	C8	C11	C12	C13	C14	C15
Tyr12										
CB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.93
CD1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.63
CD2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.19
CE1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.72
CE2	-	-	-	-	-	-	4.49	4.22	4.61	4.28
CG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.36
CZ	-	-	-	-	-	-	-	4.68	4.80	4.53
Asn14										
CG	-	-	-	-	-	4.80	4.69	-	-	-
Gly98										
CA	-	-	-	-	-	-	4.79	4.39	4.91	4.08
C	-	-	-	-	-	-	-	4.65	4.78	4.28
Leu99										
CA	-	-	-	-	-	-	-	4.68	4.17	4.42
CB	-	-	-	-	-	-	-	4.37	3.44	4.42
CD1	-	-	-	-	-	-	-	-	3.88	-
CD2	-	-	-	-	-	-	-	-	4.18	-
CG	-	-	-	-	-	-	-	-	4.07	-
C	-	-	-	-	-	-	-	-	4.89	4.50
Tyr100										
CA	-	-	-	-	-	-	-	4.38	-	4.38
CB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.27
CD2	-	-	-	-	-	-	-	-	4.62	4.15
CG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.72
C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.67
Ala207										
CB	-	-	-	-	-	-	-	4.97	-	3.53
Asp208										
CG	-	-	-	-	-	-	3.96	4.32	-	3.66
Gly224										
C	-	-	4.39	-	4.05	-	-	-	-	-
Ser225										
CA	3.42	4.87	4.67	3.75	4.54	-	-	-	-	-
C	3.80	-	-	4.56	4.46	-	-	-	-	-
Thr226										
CA	3.65	-	-	-	4.55	-	-	-	-	-
C	4.32	-	4.64	-	3.81	-	-	-	-	-
Gly227										
CA	-	-	4.38	4.47	4.70	4.49	4.09	4.80	-	-
C	-	-	4.58	4.67	4.89	4.69	4.30	-	-	-
Arg228										
CA	-	-	4.78	4.61	-	4.53	4.40	-	-	-
CB	-	-	4.53	4.11	-	4.00	4.22	-	-	-
CD	3.68	4.23	3.81	3.26	-	3.88	4.87	-	-	-
CG	4.50	4.28	3.63	3.44	4.71	4.18	4.86	-	-	-
CZ	3.48	4.61	4.92	4.54	-	-	-	-	-	-
Leu229										
CB	-	-	-	-	4.67	-	-	-	-	-
CD1	-	4.97	-	-	3.90	-	-	-	-	-
CG	-	-	-	-	4.15	-	-	-	-	-

Tabela 7 Interações hidrofóbicas que estabilizam a *trans*-zeatina no sítio de ligação a carboidrato da ConM. Distâncias dadas em Å.

Residuo		Kinetina									
		C2	C4	C5	C6	C8	CAP	CAK	CAM	CAO	CAN
Tyr12	CB	-	-	-	-	-	-	-	4.88	4.37	-
	CD1	-	-	-	-	-	-	-	4.67	3.94	-
	CD2	-	-	-	-	-	-	4.46	3.11	3.11	4.48
	CE1	-	-	-	-	-	-	-	4.54	3.91	4.96
	CE2	-	-	-	-	-	-	4.15	2.89	3.06	4.35
	CG	-	-	-	-	-	-	-	4.04	3.55	4.83
	CZ	-	-	-	-	-	-	4.83	3.70	3.48	4.59
Asn14	CG	-	-	-	-	-	4.89	4.76	4.01	-	-
Gly98	CA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.04
	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.14
Leu99	CA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.10
	CB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.92
	CD1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.97
Tyr100	CA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.68
	CB	-	-	-	-	-	-	-	-	4.79	4.84
	CD2	-	-	-	-	-	-	-	-	4.15	4.19
	CG	-	-	-	-	-	-	-	-	4.98	4.90
Ala207	CB	-	-	-	-	-	-	-	-	4.00	4.30
Asp208	CG	-	-	-	-	-	-	4.84	4.49	4.05	4.23
Gly224	C	-	-	-	-	4.33	-	-	-	-	-
Ser225	CA	-	-	-	-	4.77	-	-	-	-	-
	C	-	-	-	-	4.51	-	-	-	-	-
Thr226	CA	-	-	-	-	4.28	-	-	-	-	-
	CB	-	-	-	-	4.66	-	-	-	-	-
	C	-	-	4.75	-	3.48	-	-	-	-	-
Gly227	CA	-	-	4.35	4.74	4.26	-	4.97	-	-	-
	C	-	-	4.63	4.98	4.59	-	-	-	-	-
Arg228	CA	-	-	4.87	4.90	-	-	-	-	-	-
	CB	-	-	4.59	4.33	-	4.44	-	4.80	-	-
	CD	3.80	4.30	3.86	3.35	-	3.99	-	-	-	-
	CG	4.59	4.32	3.76	3.68	4.77	4.52	-	-	-	-
	CZ	3.49	4.79	4.97	4.49	-	-	-	-	-	-
Leu229	CB	-	-	-	-	5.00	-	-	-	-	-
	CD1	-	-	-	-	4.44	-	-	-	-	-
	CG	-	-	-	-	4.59	-	-	-	-	-

Tabela 8 Interações hidrofóbicas que estabilizam a kinetina no sítio de ligação a carboidrato da ConM. Distâncias dadas em Å.

Resíduo		Isopenteniladenina									
		C2	C4	C5	C6	C8	C11	C12	C13	C14	C15
Tyr12	CB	-	-	-	-	4.76	-	-	-	-	-
	CD1	-	4.82	-	-	4.38	-	-	-	-	-
	CD2	-	4.22	4.79	-	4.33	-	-	-	-	-
	CE1	-	4.41	-	-	4.57	-	-	-	-	-
	CE2	4.58	3.74	4.61	-	4.50	-	-	-	-	-
	CG	-	4.72	-	-	4.26	-	-	-	-	-
	CZ	4.83	3.84	4.99	-	4.61	-	-	-	-	-
Gly98	CA	-	-	3.99	4.31	4.13	-	-	-	-	-
	C	-	-	4.22	4.65	4.22	-	-	-	-	-
Leu99	CA	-	4.29	4.32	4.86	4.35	-	-	-	-	-
	CB	4.24	3.70	4.09	4.52	4.48	-	-	-	-	-
	CD1	4.26	4.80	4.71	4.38	-	-	-	-	-	-
	CD2	4.21	4.81	-	-	-	-	-	-	-	-
	CG	4.50	4.69	4.99	-	-	-	-	-	-	-
	C	-	4.61	4.86	-	4.18	-	-	-	-	-
Tyr100	CA	-	-	-	-	3.74	-	-	-	-	-
	CB	-	4.79	-	-	3.60	-	-	-	-	-
	CD2	-	3.70	-	-	3.82	-	-	-	-	-
	CG	-	4.69	-	-	4.20	-	-	-	-	-
	CE2	-	4.35	-	-	-	-	-	-	-	-
	C	-	-	-	-	3.90	-	-	-	-	-
Ala207	CB	-	4.96	4.97	-	2.93	-	-	-	-	-
Asp208	CG	-	-	4.36	-	3.70	-	-	-	-	-
Gly224	C	-	-	-	-	-	-	-	-	4.28	-
Ser225	CA	-	-	-	-	-	-	-	-	4.53	-
	C	-	-	-	-	-	-	-	-	4.22	-
Thr226	CA	-	-	-	-	-	-	-	-	4.02	-
	CB	-	-	-	-	-	-	-	-	4.50	-
	C	-	-	-	-	-	-	3.92	3.92	3.17	-
Gly227	CA	-	-	4.68	4.48	-	4.01	3.40	3.86	4.02	4.90
	C	-	-	-	-	-	4.68	4.14	4.20	4.29	4.91
Arg228	CA	-	-	-	-	-	-	-	4.77	-	4.71
	CB	-	-	-	-	-	-	-	4.77	-	4.25
	CD	-	-	-	-	-	4.66	5.00	4.41	-	3.20
	CG	-	-	-	-	-	4.74	4.71	4.01	4.65	3.17
	CZ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.16
Leu229	CB	-	-	-	-	-	-	-	-	4.70	-
	CD1	-	-	-	-	-	-	-	-	4.31	-
	CG	-	-	-	-	-	-	-	-	4.37	4.91

Tabela 9 Interações hidrofóbicas que estabilizam a isopenteniladenina no sítio de ligação a carboidrato da ConM. Distâncias dadas em Å.

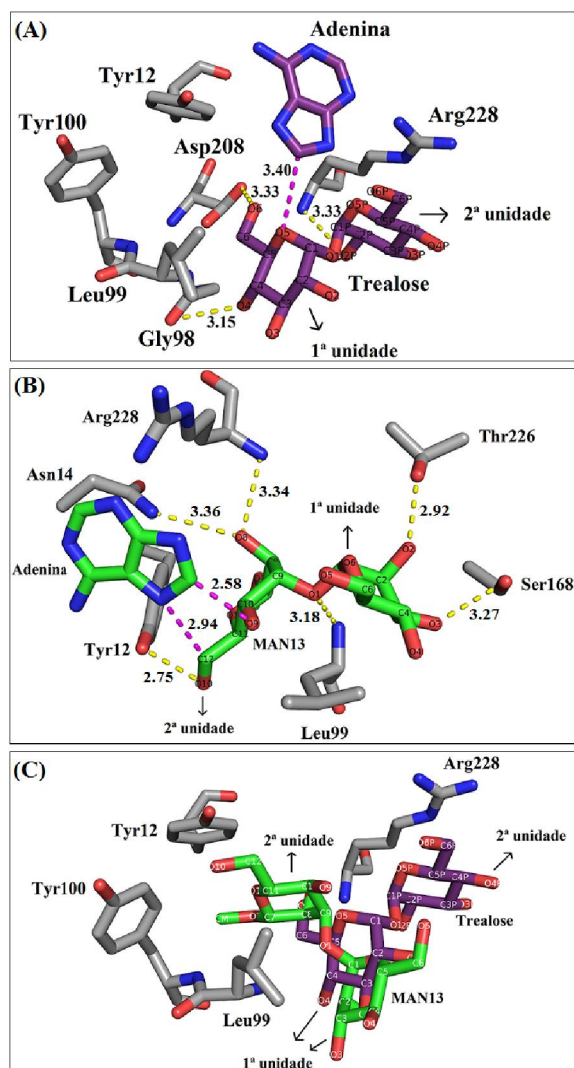
5.5.2 Complexos entre Lectinas, Açúcares, Adenina e Citocininas

Levando-se em consideração a presença da adenina e das citocininas no CRD da ConM, procuramos verificar por simulação computacional se as mesmas poderiam interferir com a capacidade de ligação da lectina com moléculas de açúcar. Inicialmente, efetuamos dois blocos de simulação, onde cada um consistia de dois processos de *docking* molecular, os quais apresentavam como diferença apenas o ligante utilizado. No primeiro, utilizamos o complexo ConM/adenina como receptor e os dissacarídeos trealose e MAN13 [man(α 1-3)man(α 1-O)Me] como moléculas ligantes. No segundo, utilizamos o complexo ConM/tZEA como receptor e os mesmos ligantes do primeiro bloco.

No primeiro par de simulações, observou-se que os dissacarídeos foram posicionados no CRD da ConM (Figura 24), compartilhando interações com os resíduos Gly98, Leu99, Asp208, Thr226, Gly227 e Arg228, bem como com a base nitrogenada. Nos dois casos, a primeira unidade monossacarídica encontra-se perfazendo interações hidrofóbicas com a Leu99 e a Gly98, enquanto suas unidades secundárias estão dispostas ortogonalmente uma em relação à outra (Figura 24C): a da trealose perfaz interações hidrofóbicas com a Gly227 e a Arg228, ao passo que a da MAN13 interage, além destes dois resíduos, com a Tyr12, a Gly98, a Leu99, a Tyr100 e a Ala207. Além disso, diferenças foram identificadas quanto ao padrão de interações de hidrogênio convencionais e não convencionais (Figuras 24A e 24B). A trealose perfaz três ligações do primeiro tipo, onde os átomos de oxigênio O4 e O6 de sua primeira unidade monossacarídica doam um hidrogênio para o grupo carbonil da Gly98 (3.15 Å; 141.1°) e para o oxigênio OD2 da cadeia lateral do Asp208 (3.33 Å; 117.7°), respectivamente, e onde o átomo O2P da segunda unidade recebe um hidrogênio do grupo –NH da cadeia principal da Arg228 (3.33 Å; 134.3°); apenas uma ligação do segundo tipo foi identificada para este açúcar, a qual ocorre entre o átomo de oxigênio O5 da primeira unidade e o átomo de carbono C8 da adenina (3.40 Å; 128.9°). Por sua vez, o dissacarídeo de manose MAN13 perfaz cinco interações de hidrogênios convencionais e duas não convencionais. Para o primeiro tipo, seus átomos de oxigênio O1 da ligação glicosídica, O2 da primeira unidade monossacarídica e O10 da segunda unidade aceitam um hidrogênio do grupo –NH da Leu99 (3.18 Å; 131.5°), do oxigênio OG1 da Thr226 (2.92 Å; 123.9°) e da hidroxila da Tyr12 (2.75 Å; 114.4°), respectivamente. Seus átomos de oxigênio O3 e O8 tanto aceitam (126.3° e 115.6°, respectivamente) quanto doam (135.2° e 172.9°, respectivamente) hidrogênios para o oxigênio

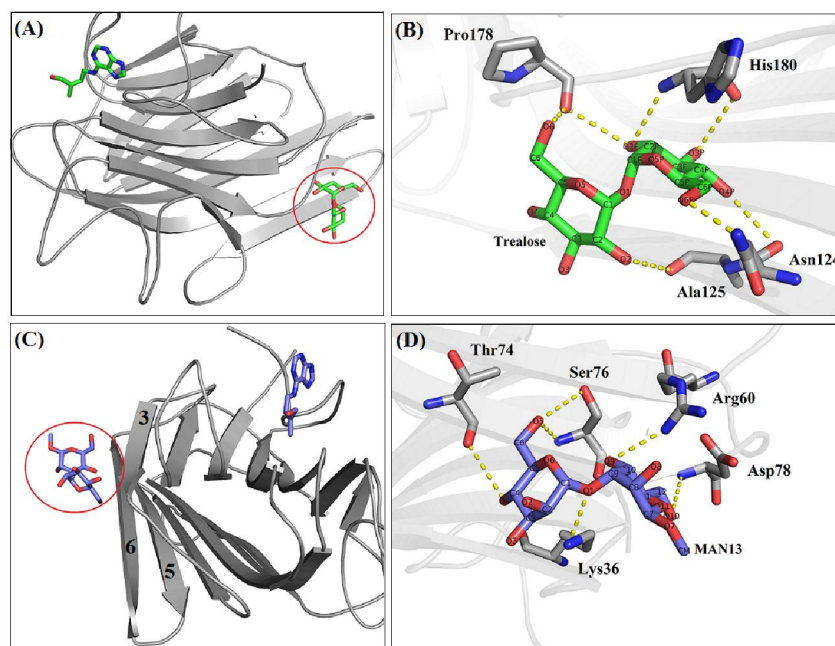
OG da Ser168 (3.27 Å) e para o grupo –NH da Arg228 (3.34 Å), respectivamente. O oxigênio O8 ainda aceita um hidrogênio do nitrogênio ND2 da Asn14 (3.36 Å; 146.5°). Já para o segundo tipo, seu átomo de oxigênio O9 aceita um hidrogênio do carbono C8 da adenina (2.58 Å; 155.9°), enquanto seu átomo de carbono C12 o doa para o nitrogênio N7 do anel purínico (2.94 Å; 129.1°).

Figura 24 *Docking* molecular do complexo ConM/adenina com os dissacarídeos trealose (roxo) e MAN13 [man(α1-3)man(α1-O)Me] (verde). (A) Interações de hidrogênio convencionais (pontilhados amarelos) e não convencionais (pontilhado magenta) que estabilizariam a trealose. Observa-se que a segunda unidade monossacarídica deste açúcar encontra-se disposta distalmente em relação à Tyr12, diferentemente daquilo observado para a MAN13 (B). Além disso, nota-se o maior número de ligações de hidrogênio que estabilizariam este carboidrato, o que pode explicar a diferença na energia dos dois processos de *docking* ($E_{\text{trealose}} = -231.17$ Kcal/mol; $E_{\text{MAN13}} = -243.12$ Kcal/mol). (C) Sobreposição dos dois açúcares, destacando a disposição aproximadamente ortogonal de suas segundas unidades monossacarídicas.



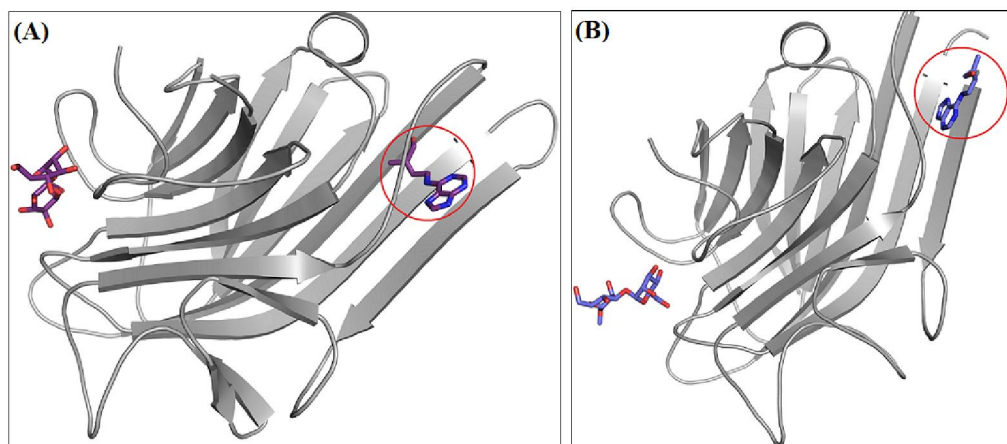
O segundo bloco de processos de *docking* mostrou que a presença da tZEA no CRD interferiu, de fato, com a capacidade de interação da ConM com os dissacarídeos trealose e MAN13. No primeiro caso, o açúcar foi posicionado na região do sítio de ligação a aminoácidos não proteicos, com sua segunda unidade monossacarídica adentrando a região H do bolsão hidrofóbico. Para este glicídio, as interações hidrofílicas previstas em sua estabilização envolveriam a participação dos resíduos Asn124, Ala125, Pro178 e His180, dos quais três contribuem para a coordenação do GABA neste sítio (Figuras 25A e 25B). No segundo caso, a MAN13 foi posicionada na superfície da lectina, em uma região intermediária do β -sandwich (Figuras 24C e D). De fato, uma predição das possíveis interações hidrofílicas que poderiam estar relacionadas com a estabilização do dissacarídeo neste local mostrou o envolvimento de um resíduo da fita- β número três (Lys36), na porção anterior, e de um resíduo da fita- β número cinco (Arg60) e três resíduos da fita- β número seis (Thr74, Ser76 e Asp78), ambas as fitas da porção posterior.

Figura 25 *Docking* molecular do complexo ConM/tZEA com os dissacarídeos trealose (verde) e MAN13 [man(α 1-3)man(α 1-O)Me] (azul). (A) e (C) Posicionamento dos açúcares (círculos vermelhos) em relação à citocinina ligada ao CRD da lectina. Em (C) os números indicam as β -fitas das quais alguns resíduos participariam da estabilização da MAN13. (B) e (D) Possíveis interações hidrofílicas (pontilhados amarelos) que estabilizariam a trealose e a MAN13, respectivamente. Observa-se que no primeiro caso, há a participação de resíduos de aminoácidos (Asn124, Ala125 e His180) que perfazem interações com a molécula de GABA (Figura 16B). $E_{\text{trealose}} = -232.66$ Kcal/mol; $E_{\text{MAN13}} = -241.22$ Kcal/mol.



Levando-se em consideração este último resultado, procuramos verificar se o mesmo aconteceria para a tZEA submetida a um processo de *docking* molecular tendo como receptor a ConM complexada com a trealose (PDB ID 2CY6) ou com a MAN13 (PDB ID 2P37). Como esperado, a presença dos dois dissacarídeos no CRD da lectina interferiu com a capacidade de ligação da tZEA nesse sítio (Figura 26). Nos dois casos, a citocinina foi posicionada na região de ligação a aminoácidos não proteicos, embora sua disposição tenha se apresentado distinta nas duas situações: para o complexo ConM/trealose, a cadeia isopentenil hidroxilada da tZEA foi posicionada adentrando a região H do bolsão hidrofóbico, enquanto que para o complexo ConM/MAN13 esta mesma cadeia ficou voltada para a superfície da proteína.

Figura 26 *Docking* molecular dos complexos ConM/trealose (A) e ConM/MAN13 (B) com a tZEA (círculos vermelhos) como ligante. Destaca-se a diferença na disposição da cadeia isopentenil hidroxilada nas duas situações. $E_{\text{trealose}} = -224.06$ Kcal/mol; $E_{\text{MAN13}} = -234.44$ Kcal/mol.



6. DISCUSSÃO

6.1 ESTRUTURAS SECUNDÁRIAS NÃO REPETITIVAS

Apesar de lectinas de leguminosas, e em particular daquelas isoladas da subtribo Diocleinae, serem estudadas do ponto de vista estrutural há muito tempo, o presente trabalho, é o primeiro a realizar uma análise mais detalhada acerca das estruturas secundárias que compõem o monômero destas proteínas. Neste sentido, foi possível descrever, pela primeira vez, a presença de estruturas (secundárias) não repetitivas que, a julgar por sua localização, parece ter papel fundamental para a interação das lectinas com seus mais variados ligantes.

Primeiramente, observou-se que β -turns são estruturas secundárias não repetitivas predominantes no monômero da ConM (Tabela 3). Dentre estas, destacou-se as sequências de resíduos Asn14-Gly18 (PH1), Asp80-Val84 (PH2) e Thr226-Leu229 (PH3) por que (1) comumente são representadas como hélices pelo programa PyMol e (2) fazem parte de domínios de ligação.

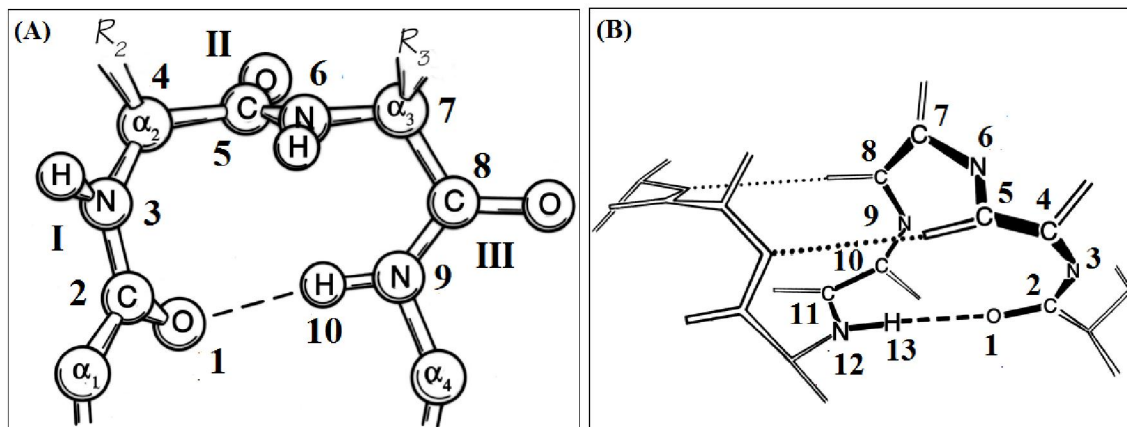
Essas três sequências não podem ser denominadas, de fato, como hélices, uma vez que os ângulos Φ e Ψ dos resíduos posicionados entre as extremidades da estrutura secundária não apresentam valores iguais (Tabelas 3 e 4). Neste sentido, a IUPAC-IUB²(1974), através de sua Comissão sobre Nomenclatura Bioquímica, estabelece que hélices só podem ser assim denominadas se os resíduos que as formam apresentam Φ 's iguais e Ψ 's iguais. De fato, reconhecem-se três formações em hélices como sendo estruturas secundárias que estão presentes em proteínas: α -hélice, 3_{10} -hélice e π -hélice. A primeira é a mais comumente encontrada na estrutura tridimensional de proteínas, sendo formada por 4-turns cujos resíduos apresentam valores de Φ em torno de -60° e de Ψ em torno de -45° (IUPAC-IUB, 1974). Por sua vez, 3_{10} -hélices são formadas por β -turns do tipo III (Tabela 2). Tal nomenclatura, “ 3_{10} ”, refere-se ao fato de que entre a ligação de hidrogênio (i, i+3) existem três unidades peptídicas, onde 10 átomos estão envolvidos no anel formado por tal interação (Figura 27). No caso das α -hélices, a nomenclatura 3.6_{13} é utilizada para denotar a presença de 3.6 unidades peptídicas e 13 átomos no anel formado pela interação de hidrogênio (i, i+4). Por fim, π -hélices são

² IUPAC-IUB = *International Union of Pure and Applied Chemistry – International Union of Biochemistry*

formadas por π -turns (5-turns), com uma ligação de hidrogênio entre o carbonil do resíduo “i” e o –NH do resíduo “i+5”.

Assim, embora PH1, PH2 e PH3 não tenham repetição quanto aos valores dos ângulos de torção dos resíduos que as formam, a representação em “hélice” pelo PyMol ocorre porque estas três estruturas são formadas, cada uma, por duas β -turns sucessivas, sendo estabilizadas, assim, por duas ligações de hidrogênio. Devido a isto, o programa “entende” que esta configuração representaria uma hélice verdadeira, já que a definição desta estrutura secundária regular envolve a ocorrência de pelo menos duas n -turns sucessivas (KABASCH; SANDER, 1983). Contudo, devido ao fato de serem irregulares, tais segmentos devem ser considerados apenas como β -turns sucessivas ou como pseudohélices, como proposto no presente trabalho.

Figura 27 Comparação entre os dois padrões de hélices mais comuns em proteínas globulares. (A) 3_{10} -hélice. Destacam-se os 10 átomos (algarismos arábicos) presentes no anel formado pela interação de hidrogênio (pontilhado). Algarismos romanos referem-se às três unidades peptídicas. (B) α -hélice, destacando-se os 13 átomos presentes no anel formado pela interação de hidrogênio (pontilhado). Ambas as figuras adaptadas de Richardson (2007).



O segundo motivo para que se destacassem estas três sequências parece estar diretamente relacionado ao primeiro. Uma vez que PH1 e PH3 contêm resíduos de aminoácidos que participam da estabilização de moléculas de carboidratos, é razoável inferir que a presença destas estruturas não repetitivas tem papel crucial para a capacidade de interação das lectinas. Neste sentido, hipotetizamos que a formação destas estruturas secundárias não repetitivas, com seus característicos ângulos Φ e Ψ , permite que as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos que as compõem tenham uma maior liberdade para se

adequarem a uma conformação que favoreça a realização de interações com os átomos dos carboidratos que se liguem ao CRD. Do contrário, caso a estrutura secundária fosse uma hélice verdadeira, com seus ângulos de rotação Φ e Ψ limitados para todos os resíduos, seria provável que as cadeias laterais não adquirissem uma conformação favorável para a estabilização das moléculas glicídicas.

Interessantemente, todas as lectinas Diocleinae cujas estruturas tridimensionais foram resolvidas e encontram-se depositadas no PDB apresentam as mesmas pseudohélices PH1 e PH3. O alinhamento das sequências de resíduos de aminoácidos destas proteínas mostra que há grande conservação nos resíduos formadores destas duas estruturas (Figura 28). Para PH1, observa-se que em todas as 14 lectinas os cinco resíduos são estritamente os mesmos, enquanto que para PH3 uma mudança é observada na posição 226 das *Canavalia* spp., *Dioclea* spp. e *Cymbosema roseum*, a qual corresponde à posição 225 nas *Cratylia* spp. e *Camptosema pedicellatum*, que contem 236 resíduos de aminoácidos em sua estrutura terciária. Para os dois primeiros gêneros, a posição é ocupada por uma treonina, enquanto que há uma serina para o terceiro; para o quarto e quinto gêneros, uma glicina é encontrada na posição correspondente. Neste caso, estas substituições, de fato, não interferiram na formação da PH3, provavelmente porque as cadeias laterais destes resíduos, sendo pequenas e relativamente do mesmo tamanho, permitem que o grupo carbonil de sua cadeia principal mantenha uma mesma conformação capaz de interagir com o grupo $-NH$ do resíduo de leucina localizado três posições adiante.

Entretanto, apesar da conservação quanto à presença das PH1 e PH3, algumas situações mostram que a primeira parece ser menos estável que a segunda. Por exemplo, a estrutura cristalográfica da própria ConM complexada com o grupo indol no CRD (DELATORRE et al., 2013), em uma posição muito similar à adenina, mostra que a pseudohélice PHI não foi formada, uma vez que a distância entre o grupo carbonil da Thr115 e o amino da Gly18 foi de 4.12 Å (Figura 29B), embora a ligação de hidrogênio entre a Asn14 e a Ile17 tenha sido conservada (3.09 Å), corroborando, assim, nossa hipótese inicial de que a representação em “hélice” pelo PyMol leva em consideração a presença de interações de hidrogênio sucessivas.

Interessantemente, a presença da adenina no CRD da ConM não afetou a mesma pseudohélice, a qual foi conservada, como observado na Figura 20. A superposição dos dois complexos (ConM/adenina e ConM/indol), ilustrada na Figura 29A, mostra que a diferença

mais significativa entre os CRDs nas duas situações foi ocasionada por uma mudança conformacional na cadeia lateral do resíduo Asp16, a qual encontra-se voltada para o interior do sítio no primeiro caso e para o exterior do mesmo no segundo. Tal movimento provocou uma mudança nos valores de seus ângulos Φ e Ψ (-44.6 e -49.0 para ConM/adenina; -89.6 e 4.6 para ConM/indol), o que, conseqüentemente, modificou a posição do grupo carbonil da Thr15, impossibilitando a formação da ligação de hidrogênio com a Gly18 (Figura 29B). Tal modificação conformacional pode ser explicada pela natureza mais hidrofóbica do grupo indol. Neste sentido, o caráter menos hidrofóbico da adenina permite a realização de interações de van der Waals (OD1/OD2/Asp16 e N1/N2/adenina), favorecendo, assim, a posição da cadeia lateral do Asp16 voltada para dentro do CRD.

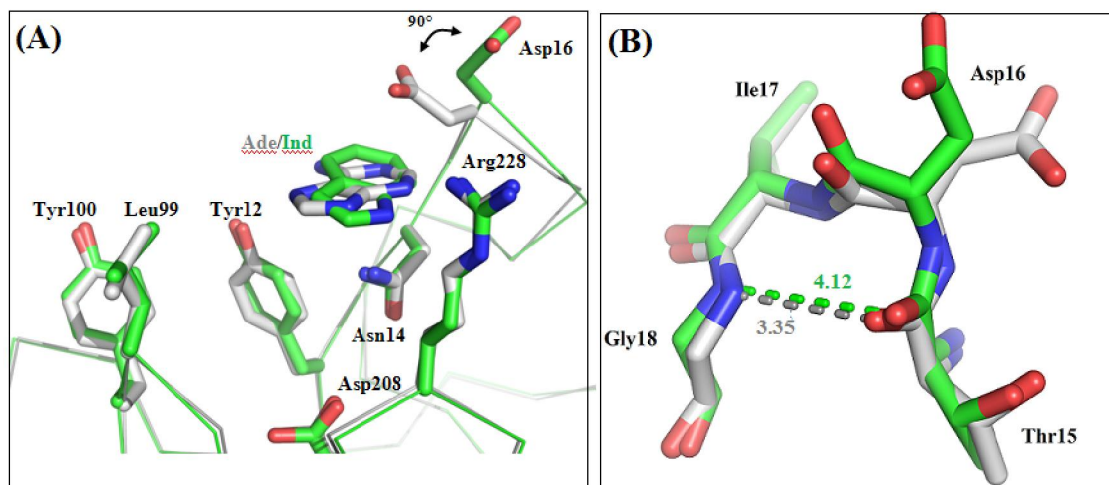
A pseudohélice PH2, formada pelos resíduos Asp80-Val84 (Tabela 3), também mostra alta conservação nas lectinas Diocleinae, diferindo, entretanto, nas posições 82 e 84. No primeiro caso, há a presença de um resíduo de asparto (Asp) nas *Canavalia* spp., enquanto nos demais gêneros esta posição é ocupada por uma asparagina (Asn). No segundo caso, os três gêneros cujas lectinas contem 236 resíduos em seu monômero apresentam uma isoleucina (Ile) na posição 84, ao passo que em todas as demais proteínas este resíduo é substituído por uma leucina (Leu). Similarmente ao observado para PH3, estas substituições não afetam a formação da pseudohélice PH2, provavelmente porque (1) a posição 82 não está envolvida na formação das interações de hidrogênio que estabilizariam as duas β -turns formadoras da pseudohélice e (2) porque as cadeias laterais dos resíduos Leu e Ile, sendo muito semelhantes, permitem que a cadeia principal conserve sua conformação, de modo que seu grupo -NH ainda encontra-se apto a performar uma ligação de hidrogênio com o grupo carbonil do resíduo localizado três posições antes.

Como observado na Figura 16, PH2 encontra-se recobrimdo a porção superior da região V da cavidade hidrofóbica em “L”, a qual, segundo alguns estudos, é o sítio de alta afinidade que se ligaria a compostos hidrofóbicos (ver seção 2.2.4), onde a Leu81, presente nesta estrutura secundária, e a Leu85 fazem parte deste escopo de resíduos que formariam o sítio. Assim, fica evidenciado que tal estrutura tem papel fundamental no revestimento desta cavidade e, provavelmente, na formação de interações com ligantes apolares, uma vez que os resíduos que a formam, particularmente a Leu81, adquirem uma conformação mais favorável para estas funções, o que poderia não ocorrer caso o segmento apresentasse outro padrão de estrutura secundária.

Figura 28 Alinhamento das estruturas primárias das lectinas Diocleinae cujas estruturas tridimensionais foram resolvidas e encontram-se depositadas no PDB. PH1, PH2 e PH3 referem-se às pseudohélices Asn14-Gly18, Asp80-Leu84 e Thr226-Leu230, respectivamente. β B1, β B2 e β B3 referem-se às trincas I27-K35-K36, T196-L107-S108 e S96-D208-G209, respectivamente, que são as β -bulges identificadas na estrutura terciária da ConM. * = conservação; : = modificações conservadas, . = modificações semi-conservativas. Espaços em branco referem-se à modificações de um grupo químico para outro (por exemplo de um polar por um apolar).

	PH1	PH2	PH3
<i>Dioclea wilsonii</i>	ADTIVAVELDSYPNTDIGDPNYPHIGIDIKSIRSKSTARWNMQTKGVGTV 50	HISYNSVAKRLSAVVSYSGSSSTTVSYDVLNNVLPENWVRVGLSATITGLY 100	DGNELELTKVSNSSGDPQGSNVGRALFYAPVHIWEKSAVVASFDATEIFLIK 200
<i>D. violacea</i>	ADTIVAVELDSYPNTDIGDPNYPHIGIDIKSIRSKSTARWNMQTKGVGTV 50	HISYNSVAKRLSAVVSYSGSSSTTVSYDVLNNVLPENWVRVGLSATITGLY 100	DGNELELTKVSSSGDPQGSNVGRALFYAPVHIWEKSAVVASFDATEIFLIK 200
<i>D. grandiflora</i>	ADTIVAVELDSYPNTDIGDPNYPHIGIDIKSIRSKSTARWNMQTKGVGTV 50	HISYNSVAKRLSAVVSYSGSSSTTVSYDVLNNVLPENWVRVGLSATITGLY 100	DGNELELTKVSSSGDPQGSNVGRALFYAPVHIWEKSAVVASFDATEIFLIK 200
<i>D. rostrata</i>	ADTIVAVELDSYPNTDIGDPNYPHIGIDIKSIRSKSTARWNMQTKGVGTV 50	HISYNSVAKRLSAVVSYSGSSSTTVSYDVLNNVLPENWVRVGLSATITGLY 100	DGNELELTKVSSSGDPQGSNVGRALFYAPVHIWEKSAVVASFDATEIFLIK 200
<i>D. guianensis</i>	ADTIVAVELDSYPNTDIGDPNYPHIGIDIKSIRSKSTARWNMQTKGVGTV 50	HISYNSVAKRLSAVVSYSGSSSTTVSYDVLNNVLPENWVRVGLSATITGLY 100	DGNELELTKVSSSGDPQGSNVGRALFYAPVHIWEKSAVVASFDATEIFLIK 200
<i>D. virgata</i>	ADTIVAVELDSYPNTDIGDPNYPHIGIDIKSIRSKSTARWNMQTKGVGTV 50	HISYNSVAKRLSAVVSYSGSSSTTVSYDVLNNVLPENWVRVGLSATITGLY 100	DGNELELTKVSSSGDPQGSNVGRALFYAPVHIWEKSAVVASFDATEIFLIK 200
<i>Cymbosema roseum</i>	ADTIVAVELDSYPNTDIGDPSPYHIGIDIKSVRSKSTARWNMQTKGVGTA 50	HISYNSVAKRLSAIVSYPGSSSATVSVDVLDNLNLPENWVRVGLSATITGLY 100	DGNELELTKVSSSGDPQGSNVGRALFYAPVHIWEKSAVVASFDATEIFLIK 200
<i>Cratylia floribunda</i>	ADTIVAVELDSYPNTDIGDPSPYHIGIDIKSVRSKSTARWNMQTKGVGTA 50	HISYNSVAKRLSAIVSYPGSSSATVSVDVLDNLNLPENWVRVGLSATITGLY 100	DGNELELTKVSSSGDPQGSNVGRALFYAPVHIWEKSAVVASFDATEIFLIK 200
<i>Campitosema pedicellatum</i>	ADTIVAVELDTYPNTDIGDPNQYHIGINIKSIRSKATTTRWNVDQDKVGTA 50	HISYNSVAKRLSAIVSYPGSSSATVSVDVLDNLNLPENWVRVGLSATITGLY 100	DGNELELTKVSSSGDPQGSNVGRALFYAPVHIWEKSAVVASFDATEIFLIK 200
<i>Cratylia mollis</i>	ADTIVAVELDTYPNTDIGDPNQYHIGINIKSIRSKATTTRWNVDQDKVGTA 50	HISYNSVAKRLSAIVSYPGSSSATVSVDVLDNLNLPENWVRVGLSATITGLY 100	DGNELELTKVSSSGDPQGSNVGRALFYAPVHIWEKSAVVASFDATEIFLIK 200
<i>Canavalia ensiformis</i>	ADTIVAVELDTYPNTDIGDPSPYHIGIDIKSVRSKKTAKWNMQNGKVGT 50	HIIYNSVVKRLSAVVSYPNGDSATVSVDVLDNLNLPENWVRVGLSATITGLY 100	DGNELELTKVSSSGDPQGSNVGRALFYAPVHIWEKSAVVASFDATEIFLIK 200
<i>C. brasiliensis</i>	ADTIVAVELDTYPNTDIGDPSPYHIGIDIKSVRSKKTAKWNMQNGKVGT 50	HIIYNSVVKRLSAVVSYPNGDSATVSVDVLDNLNLPENWVRVGLSATITGLY 100	DGNELELTKVSSSGDPQGSNVGRALFYAPVHIWEKSAVVASFDATEIFLIK 200
<i>C. maritima</i>	ADTIVAVELDTYPNTDIGDPSPYHIGIDIKSVRSKKTAKWNMQNGKVGT 50	HIIYNSVVKRLSAVVSYPNGDSATVSVDVLDNLNLPENWVRVGLSATITGLY 100	DGNELELTKVSSSGDPQGSNVGRALFYAPVHIWEKSAVVASFDATEIFLIK 200
<i>C. gladiata</i>	ADTIVAVELDTYPNTDIGDPNYPHIGIDIKSVRSKKTAKWNMQNGKVGT 50	HIIYNSVVKRLSAVVSYPNGDSATVSVDVLDNLNLPENWVRVGLSATITGLY 100	DGNELELTKVSSSGDPQGSNVGRALFYAPVHIWEKSAVVASFDATEIFLIK 200
	***** : ***** * **** : * : * : *	***** : ***** * **** : * : * : *	***** : ***** * **** : * : * : *
<i>Dioclea wilsonii</i>	KETNTILSWSFSTKLKTNIADEANSLHFHSFKFSQNPKDLILQGDASTDS 150	KETNTILSWSFSTKLKTNIADEANSLHFHSFNQFSQNPKDLILQGDASTDS 150	DGNELELTKVSNSSGDPQGSNVGRALFYAPVHIWEKSAVVASFDATEIFLIK 200
<i>D. violacea</i>	KETNTILSWSFSTKLKTNIADEANSLHFHSFKFSQNPKDLILQGDASTDS 150	KETNTILSWSFSTKLKTNIADEANSLHFHSFNQFSQNPKDLILQGDASTDS 150	DGNELELTKVSSSGDPQGSNVGRALFYAPVHIWEKSAVVASFDATEIFLIK 200
<i>D. grandiflora</i>	KETNTILSWSFSTKLKTNIADEANSLHFHSFKFSQNPKDLILQGDASTDS 150	KETNTILSWSFSTKLKTNIADEANSLHFHSFNQFSQNPKDLILQGDASTDS 150	DGNELELTKVSSSGDPQGSNVGRALFYAPVHIWEKSAVVASFDATEIFLIK 200
<i>D. rostrata</i>	KETNTILSWSFSTKLKTNIADEANSLHFHSFNQFSQNPKDLILQGDASTDS 150	KETNTILSWSFSTKLKTNIADEANSLHFHSFNQFSQNPKDLILQGDASTDS 150	DGNELELTKVSSSGDPQGSNVGRALFYAPVHIWEKSAVVASFDATEIFLIK 200
<i>D. guianensis</i>	KETNTILSWSFSTKLKTNIADEANSLHFHSFNQFSQNPKDLILQGDASTDS 150	KETNTILSWSFSTKLKTNIADEANSLHFHSFNQFSQNPKDLILQGDASTDS 150	DGNELELTKVSSSGDPQGSNVGRALFYAPVHIWEKSAVVASFDATEIFLIK 200
<i>D. virgata</i>	KETNTILSWSFSTKLKTNIADEANSLHFHSFNQFSQNPKDLILQGDASTDS 150	KETNTILSWSFSTKLKTNIADEANSLHFHSFNQFSQNPKDLILQGDASTDS 150	DGNELELTKVSSSGDPQGSNVGRALFYAPVHIWEKSAVVASFDATEIFLIK 200
<i>Cymbosema roseum</i>	KETNTILSWSFSTKLKTNIADEANSLHFHSFNQFSQNPKDLILQGDASTDS 150	KETNTILSWSFSTKLKTNIADEANSLHFHSFNQFSQNPKDLILQGDASTDS 150	DGNELELTKVSSSGDPQGSNVGRALFYAPVHIWEKSAVVASFDATEIFLIK 200
<i>Cratylia floribunda</i>	KETNTILSWSFSTKLKTNIADEANSLHFHSFNQFSQNPKDLILQGDASTDS 150	KETNTILSWSFSTKLKTNIADEANSLHFHSFNQFSQNPKDLILQGDASTDS 150	DGNELELTKVSSSGDPQGSNVGRALFYAPVHIWEKSAVVASFDATEIFLIK 200
<i>Campitosema pedicellatum</i>	KETNTILSWSFSTKLKTNIADEANSLHFHSFNQFSQNPKDLILQGDASTDS 150	KETNTILSWSFSTKLKTNIADEANSLHFHSFNQFSQNPKDLILQGDASTDS 150	DGNELELTKVSSSGDPQGSNVGRALFYAPVHIWEKSAVVASFDATEIFLIK 200
<i>Cratylia mollis</i>	KETNTILSWSFSTKLKTNIADEANSLHFHSFNQFSQNPKDLILQGDASTDS 150	KETNTILSWSFSTKLKTNIADEANSLHFHSFNQFSQNPKDLILQGDASTDS 150	DGNELELTKVSSSGDPQGSNVGRALFYAPVHIWEKSAVVASFDATEIFLIK 200
<i>Canavalia ensiformis</i>	KETNTILSWSFSTKLKTNIADEANSLHFHSFNQFSQNPKDLILQGDASTDS 150	KETNTILSWSFSTKLKTNIADEANSLHFHSFNQFSQNPKDLILQGDASTDS 150	DGNELELTKVSSSGDPQGSNVGRALFYAPVHIWEKSAVVASFDATEIFLIK 200
<i>C. brasiliensis</i>	KETNTILSWSFSTKLKTNIADEANSLHFHSFNQFSQNPKDLILQGDASTDS 150	KETNTILSWSFSTKLKTNIADEANSLHFHSFNQFSQNPKDLILQGDASTDS 150	DGNELELTKVSSSGDPQGSNVGRALFYAPVHIWEKSAVVASFDATEIFLIK 200
<i>C. maritima</i>	KETNTILSWSFSTKLKTNIADEANSLHFHSFNQFSQNPKDLILQGDASTDS 150	KETNTILSWSFSTKLKTNIADEANSLHFHSFNQFSQNPKDLILQGDASTDS 150	DGNELELTKVSSSGDPQGSNVGRALFYAPVHIWEKSAVVASFDATEIFLIK 200
<i>C. gladiata</i>	KETNTILSWSFSTKLKTNIADEANSLHFHSFNQFSQNPKDLILQGDASTDS 150	KETNTILSWSFSTKLKTNIADEANSLHFHSFNQFSQNPKDLILQGDASTDS 150	DGNELELTKVSSSGDPQGSNVGRALFYAPVHIWEKSAVVASFDATEIFLIK 200
	***** : ***** * **** : * : * : *	***** : ***** * **** : * : * : *	***** : ***** * **** : * : * : *
<i>Dioclea wilsonii</i>	SPDRPADGGTFFFIANTDTSIPSGSGRLLGLFPDAN 237	DGNELELTKVSNSSGDPQGSNVGRALFYAPVHIWEKSAVVASFDATEIFLIK 200	DGNELELTKVSSSGDPQGSNVGRALFYAPVHIWEKSAVVASFDATEIFLIK 200
<i>D. violacea</i>	SPDRPADGGTFFFIANTDTSIPSGSGRLLGLFPDAN 237	DGNELELTKVSSSGDPQGSNVGRALFYAPVHIWEKSAVVASFDATEIFLIK 200	DGNELELTKVSSSGDPQGSNVGRALFYAPVHIWEKSAVVASFDATEIFLIK 200
<i>D. grandiflora</i>	SPDRPADGGTFFFIANTDTSIPSGSGRLLGLFPDAN 237	DGNELELTKVSSSGDPQGSNVGRALFYAPVHIWEKSAVVASFDATEIFLIK 200	DGNELELTKVSSSGDPQGSNVGRALFYAPVHIWEKSAVVASFDATEIFLIK 200
<i>D. rostrata</i>	SPDRPADGGTFFFIANTDTSIPSGSGRLLGLFPDAN 237	DGNELELTKVSSSGDPQGSNVGRALFYAPVHIWEKSAVVASFDATEIFLIK 200	DGNELELTKVSSSGDPQGSNVGRALFYAPVHIWEKSAVVASFDATEIFLIK 200
<i>D. guianensis</i>	SPDRPADGGTFFFIANTDTSIPSGSGRLLGLFPDAN 237	DGNELELTKVSSSGDPQGSNVGRALFYAPVHIWEKSAVVASFDATEIFLIK 200	DGNELELTKVSSSGDPQGSNVGRALFYAPVHIWEKSAVVASFDATEIFLIK 200
<i>D. virgata</i>	SPDRPADGGTFFFIANTDTSIPSGSGRLLGLFPDAN 237	DGNELELTKVSSSGDPQGSNVGRALFYAPVHIWEKSAVVASFDATEIFLIK 200	DGNELELTKVSSSGDPQGSNVGRALFYAPVHIWEKSAVVASFDATEIFLIK 200
<i>Cymbosema roseum</i>	SPDSEPADGGTFFFIANTDTSIPSGSGRLLGLFPDAN 237	DGNELELTKVSNSSGDPQGSNVGRALFYAPVHIWEKSAVVASFDATEIFLIK 200	DGNELELTKVSSSGDPQGSNVGRALFYAPVHIWEKSAVVASFDATEIFLIK 200
<i>Cratylia floribunda</i>	STDSDIADGTAFFFIANTDSSIPHGSGRLLGLFPDAN 236	DGNELELTKVSNSSGDPQGSNVGRALFYAPVHIWEKSAVVASFDATEIFLIK 200	DGNELELTKVSSSGDPQGSNVGRALFYAPVHIWEKSAVVASFDATEIFLIK 200
<i>Campitosema pedicellatum</i>	SPDSPADGGTAFFFIANTDSSIPHGSGRLLGLFPDAN 236	DGNELELTKVSNSSGDPQGSNVGRALFYAPVHIWEKSAVVASFDATEIFLIK 200	DGNELELTKVSSSGDPQGSNVGRALFYAPVHIWEKSAVVASFDATEIFLIK 200
<i>Cratylia mollis</i>	SPDREPADGGTAFFFIANTDSSIPHGSGRLLGLFPDAN 236	DGNELELTKVSNSSGDPQGSNVGRALFYAPVHIWEKSAVVASFDATEIFLIK 200	DGNELELTKVSSSGDPQGSNVGRALFYAPVHIWEKSAVVASFDATEIFLIK 200
<i>Canavalia ensiformis</i>	SPDSHPADGGTAFFISNIDSSIPSGSGRLLGLFPDAN 237	DGNELELTKVSNSSGDPQGSNVGRALFYAPVHIWEKSAVVASFDATEIFLIK 200	DGNELELTKVSSSGDPQGSNVGRALFYAPVHIWEKSAVVASFDATEIFLIK 200
<i>C. brasiliensis</i>	SPDSHPADGGTAFFISNIDSSIPSGSGRLLGLFPDAN 237	DGNELELTKVSNSSGDPQGSNVGRALFYAPVHIWEKSAVVASFDATEIFLIK 200	DGNELELTKVSSSGDPQGSNVGRALFYAPVHIWEKSAVVASFDATEIFLIK 200
<i>C. maritima</i>	SPDSHPADGGTAFFISNIDSSIPSGSGRLLGLFPDAN 237	DGNELELTKVSNSSGDPQGSNVGRALFYAPVHIWEKSAVVASFDATEIFLIK 200	DGNELELTKVSSSGDPQGSNVGRALFYAPVHIWEKSAVVASFDATEIFLIK 200
<i>C. gladiata</i>	SPDSHPADGGTAFFISNIDSSIPSGSGRLLGLFPDAN 237	DGNELELTKVSNSSGDPQGSNVGRALFYAPVHIWEKSAVVASFDATEIFLIK 200	DGNELELTKVSSSGDPQGSNVGRALFYAPVHIWEKSAVVASFDATEIFLIK 200
	*. * . *	***** : ***** * **** : * : * : *	***** : ***** * **** : * : * : *

Figura 29 Estruturas cristalográficas do CRD da ConM complexada com a adenina (cinza) e o grupo indol (verde). (A) Sobreposição dos dois complexos, destacando o posicionamento dos dois anéis próximo à Arg228. Observa-se que a principal mudança ocorrida refere-se à conformação da cadeia lateral do resíduo Asp16, a qual encontra-se direcionada para dentro do sítio no complexo ConM/adenina. (B) β -turn Thr15-Gly18, destacando que a mesma é formada apenas no complexo ConM/adenina, como observado pelas distâncias entre o grupo carbonil da Thr15 e o –NH da Gly18.

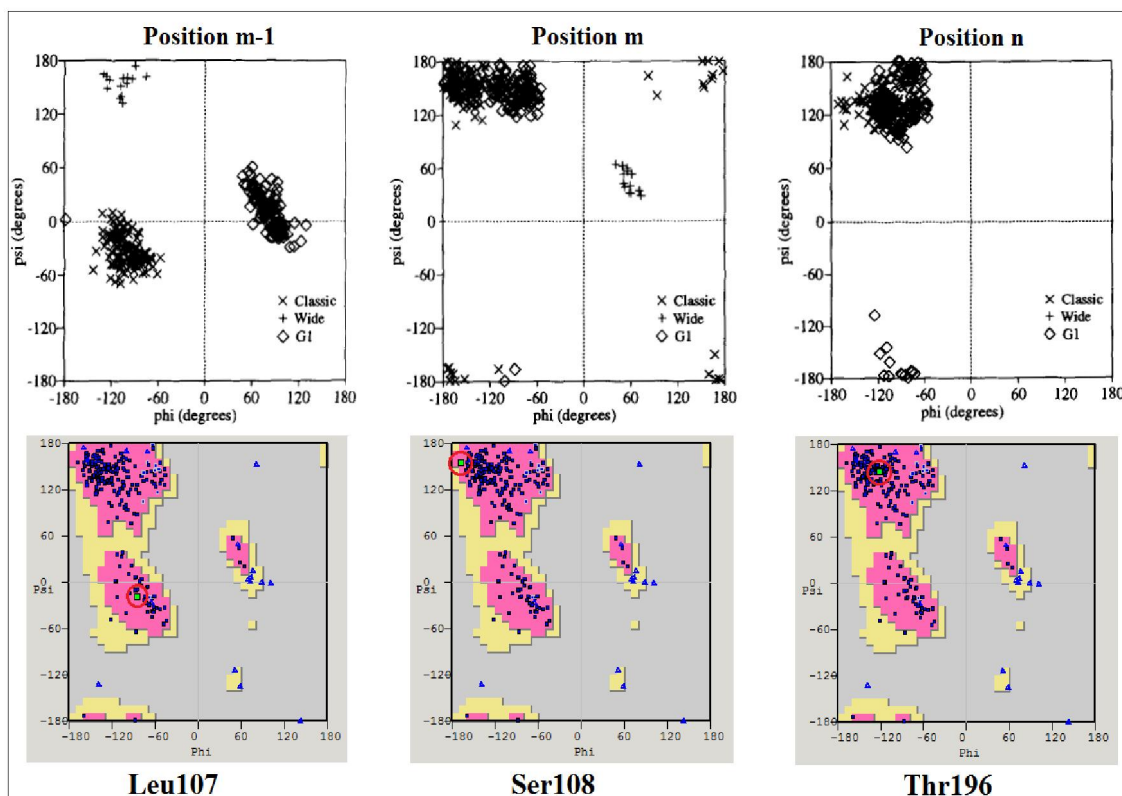


A descrição de estruturas secundárias do tipo β -bulge (β B) não tinha sido realizada para lectinas Diocleinae até o desenvolvimento do presente trabalho, onde foi visto que as mesmas ocorrem em três situações (Figura 15). Em duas destas, formadas pelas trincas I27-K35-K36 (β B1) e S96-D208-G209 (β B3), observa-se a formação de β -bulges classificadas como G1A, onde o resíduo “m-1” (K35 e D208), não sendo uma glicina, localiza-se no final do *loop* que conecta as β -fitas 2 e 3 e 12 e 13, respectivamente.

Por sua vez, a β -bulge formada pela trinca T196-L107-S108 (β B2) apresenta um padrão clássico do tipo C-, onde os três resíduos envolvidos encontram-se dentro de suas respectivas β -fitas e onde o grupo carbonil do resíduo “n” (T196) não perfaz uma interação de hidrogênio com o grupo –NH do resíduo “m” (S108), como observado pelo valor mensurado de 3.68 Å, mas sim com o grupo –NH do resíduo “m-1” (L107). Além disso, o padrão clássico é caracterizado por apresentar em seu resíduo “m” uma preferência por resíduos de cadeia lateral pequena, como glicina, alanina e serina, e em seu resíduo “m-1” uma preferência por resíduos hidrofóbicos, como valina, isoleucina e leucina (CHAN et al., 1993). Neste sentido, a presença da Ser108 e da Leu107 nestas respectivas posições corrobora ainda mais a existência desta β -bulge clássica na estrutura da ConM. Somado a isto, observou-se

que os três resíduos formadores desta estrutura secundária encontram-se nas regiões do gráfico de Ramachandran preditas para suas respectivas posições (Figura 30).

Figura 30 Gráficos de Ramachandran para os três resíduos de aminoácidos que constituem a β B2. Painel superior ilustra a localização dos resíduos correspondentes a cada posição para os três tipos de β B mais comuns [adaptado de Chan e colaboradores (1993)]. Painel inferior ilustra os gráficos referentes aos resíduos de cada posição identificados no monômero da ConM. Observa-se que para cada uma destas houve correspondência de sua localização (círculos vermelhos) em relação às predições reportadas pelo trabalho de Chan e colaboradores.



Em duas β -bulges (β B2 e β B3) observou-se que os resíduos envolvidos em sua formação são, respectivamente, a Ser108 e o Asp208, os quais estão envolvidos na formação de interações com ligantes. O primeiro, localizado na fita número oito, na porção posterior do β -sandwich, foi descrito como sendo um dos resíduos que interagem com o ácido indole-3-acético (AIA) na estrutura da ConM (DELATORRE et al., 2013), enquanto o segundo, presente na fita número 13, faz parte do CRD desta e das demais lectinas Diocleinae, onde participa da interação e estabilização de moléculas glicídicas (MOOTHOO et al., 1999; SANDERS et al., 2001) (Figura 15). Como β -bulges são, com maior frequência, encontradas

em regiões de sítio ativo (RICHARDSON, 2007), é possível inferir que, de fato, a presença destas duas estruturas secundárias sejam essenciais para o estabelecimento de interações entre lectinas e moléculas ligantes, uma vez que nestes arranjos a cadeia lateral de determinados resíduos encontram-se em uma conformação específica que permite a formação de complexos proteína-ligante (RICHARDSON, 2007).

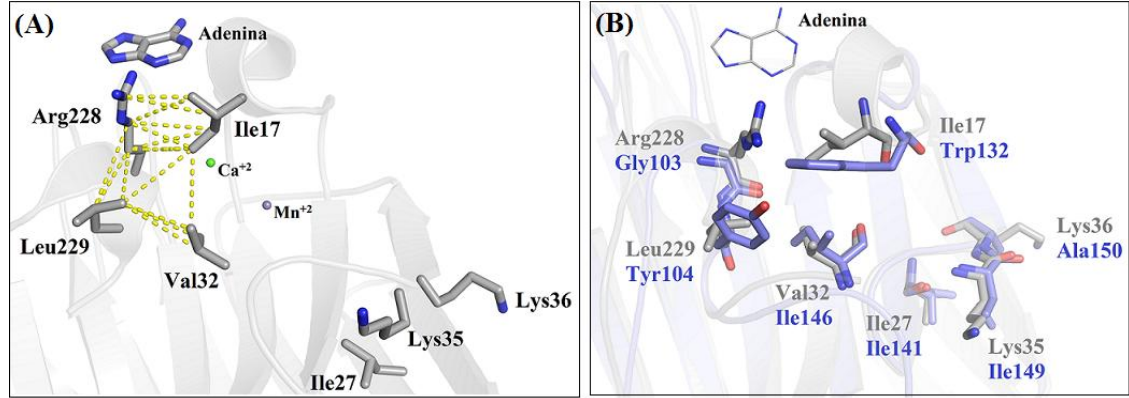
O alinhamento das sequências de todas as lectinas Diocleinae que possuem sua estrutura tridimensional resolvida e depositada no PDB mostra que os resíduos Ser108 e Asp208 são conservados, indicando que, de fato, ambos os resíduos são essenciais para seus respectivos sítios de ligação, embora a participação do primeiro em uma interação tenha sido descrita apenas uma vez e para uma única lectina. Mas levando-se em consideração a extrema conservação dos três resíduos que constituem a β B2 (Figura 28), é razoável inferir que esta região também sirva para que o mesmo ligante (AIA), ou algum similar estruturalmente, se ligue em outras lectinas da subtribo.

Embora β B1 seja formada por resíduos que não participam de nenhum sítio de ligação, especialmente porque se encontram em uma região superficial da estrutura terciária, estando em contato direto com as moléculas de água do meio mesmo quando da formação do arranjo dimérico e tetramérico, sua conservação enquanto estrutura secundária não repetitiva presente em todas as lectinas Diocleinae parece indicar que a mesma possa ter um papel diferente daqueles discutidos anteriormente para as β -bulges β B2 e β B3.

Além de fazerem parte de sítios ativos, outra propriedade geral destas estruturas é a capacidade de induzirem uma mudança na direção da cadeia polipeptídica nas fitas onde são encontradas, o que pode explicar, assim, sua predominância em folhas- β antiparalelas (RICHARDSON; GETZOFF; RICHARDSON, 1978).

No caso das lectinas, essa mudança de direção parece promover uma aproximação entre o resíduo Val32 e os resíduos Ile17, Arg228 e Leu229, os quais, através de uma rede de 16 interações hidrofóbicas (Figura 31A e Tabela 10), criam uma região de caráter hidrofóbico localizada na porção superior da cavidade onde encontram-se coordenados os íons divalentes Ca^{+2} e Mn^{+2} . Neste sentido, levando-se em consideração a presença das moléculas hidrofóbicas adenina e indole próxima a esta região na estrutura da ConM, é razoável inferir que a β B1, bem como a PH1, que contem a Ile17, cria um ambiente de relativa hidrofobicidade capaz de atrair a ligação de moléculas apolares na posição reportada neste trabalho.

Figura 31 Região hidrofóbica adjacente ao CRD da ConM. (A) Interações hidrofóbicas (pontilhados amarelos) que criam um ambiente de atração para a adenina. Observa-se que a β B1 formada pela trinca de resíduos I27-K35-K36 promove uma mudança de direção da cadeia polipeptídica de tal maneira que a Val32 se aproxima dos resíduos Ile17, Arg228 e Leu229, formando uma região hidrofóbica localizada sobre o sítio de coordenação de íons divalentes (esferas). (B) Sobreposição das estruturas cristalográficas da ConM (cinza) e da DBL (azul). Observa-se que a β -bulge é conservada na lectina Phaseolinae (trinca I141-I149-A150), a qual promove a aproximação da Ile146 aos resíduos Tyr104 e Trp132. Além disso, é observado que na posição correspondente à Arg228 da ConM há um resíduo de glicina na estrutura da DBL, o que pode explicar a não coordenação da adenina no CRD desta lectina. DBL = Lectina de *Dolichos biflorus* (PDB ID 1BJQ – HAMELRYCK et al., 1999).



Resíduo	Ile17				Val32			Arg228				Leu229	
	CB	CD1	CG1	CG2	CB	CG1	CG2	CB	CD	CG	CZ	CD2	CG
Ile17													
CB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.81	-	-
CD1	-	-	-	-	-	4.50	-	3.98	3.72	3.68	-	4.67	-
CG1	-	-	-	-	-	-	-	-	4.60	4.89	-	-	-
CG2	-	-	-	-	-	-	-	-	4.52	-	3.57	-	-
Val32													
CB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.52	-
CG1	-	4.50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.81	-
CG2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.64	-
Arg228													
CB	-	3.98	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD	-	3.72	4.60	4.52	-	-	-	-	-	-	-	-	4.99
CG	-	3.68	4.89	-	-	-	-	-	-	-	-	3.79	4.04
CZ	4.81	-	-	3.57	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Leu229													
CD2	-	4.67	-	-	4.52	3.81	4.64	-	-	3.79	-	-	-
CG	-	-	-	-	-	-	-	-	4.99	4.04	-	-	-

Tabela 10 Distâncias (Å) das interações que formam o sítio hidrofóbico adjacente ao CRD da ConM.

A lectina isolada de sementes da *Dolichos biflorus* (DBL – subtribo Phaseolinae), a qual foi a primeira proteína desta classe a ter sua estrutura tridimensional resolvida em complexo com a adenina (HAMELRYCK et al., 1999), mostra características estruturais muito semelhantes às lectinas Diocleinae, onde, por exemplo, a superposição da ConM com a DBL mostra que o CRD de ambas são coincidentes em posição e arquitetura, embora exista alguma distinção quanto aos resíduos que os formam (Figura 8, seção 2.2.3). Além disso, a DBL também apresenta, no mesmo local que a ConM, uma estrutura secundária em β -bulge, onde o resíduo Ile141 (“n”), correspondente à Ile27, perfaz interações de hidrogênio com os grupos carbonil da Ala150 (“m”), correspondente à Lys36, e amino da Ile149 (“m-1”), correspondente à Lys35. E da mesma forma que em sua homóloga Diocleinae, a presença desta estrutura não repetitiva parece ser responsável, pelo menos em parte, pela aproximação dos resíduos Tyr104, correspondente à Leu229, Ile146, que corresponde à Val32, e Trp132, correspondente à Ile117, os quais recobrem a mesma cavidade onde estão coordenados os íons divalentes (Figura 31B).

Diferentemente do que ocorre para a ConM, a adenina parece não ter condições de se ligar ao CRD da DBL, embora a região formada pelos resíduos Tyr104, Trp132 e Ile146 seja relativamente mais hidrofóbica (25 interações) do que a observada para sua homóloga Diocleinae. A sobreposição das estruturas cristalográficas destas duas lectinas mostra que o resíduo Arg228 da ConM, que interage com o anel purínico da adenina, é correspondente à Gly103 na DBL (Figura 31B). Deste modo, a adenina não teria a capacidade de ser estabilizada pelo CRD desta última, fazendo-o apenas na interface dimérica, como mostrado por Hamelryck e colaboradores (1999). Isto explicaria o fato da DBL não ter sua capacidade de ligação a moléculas glicídicas afetada na presença da adenina (GEGG et al., 1992), uma vez que os sítios para ambos os compostos encontram-se em locais distintos dentro da estrutura tridimensional da lectina.

6.2 DOMÍNIO DE LIGAÇÃO A AMINOÁCIDOS NÃO PROTEICOS

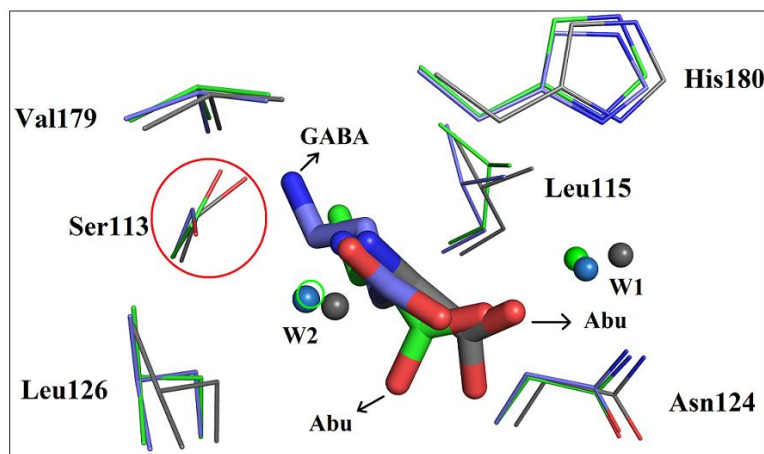
O GABA foi identificado no mesmo sítio anteriormente reportado para seu isômero ácido α -aminobutírico (Abu) nas estruturas cristalográficas da CGL (PDB ID 2D7F) e ConBr (PDB ID 3JU9), perfazendo interações com os mesmos resíduos de aminoácidos reportados por Delatorre e colaboradores (2007) e Bezerra e colaboradores (2011), respectivamente. O grupo carboxil dos ligantes nas três situações adquire uma disposição bastante semelhante, oposta à Leu115 na fita- β número oito (Figura 32).

A presença de uma molécula de água estabilizada pela Asn124 (W1) e que participa da rede de interações com os ácidos carboxílicos é conservada nos três complexos. Por outro lado, a presença de uma segunda molécula de água (W2), a qual interage com o grupo amino na molécula de Abu e com o oxigênio OE2 no GABA, é conservada apenas nas estruturas da ConM e da ConBr. Provavelmente, esta diferença esteja relacionada com o empacotamento cristalográfico dos complexos. Embora os três apresentem sistema cristalino ortorrômbico, com os ângulos α , β e γ de sua cela unitária iguais a 90° , suas redes de Bravais e grupos espaciais são distintos: para ConM/GABA e ConBr/Abu estes parâmetros são corpo centrado (I) e I222 e para CGL/Abu são plano centrado (C) e C222₁, respectivamente. Essa diferença é evidenciada quando se sobrepõem as três estruturas em duas situações: uma com a cadeia L da CGL e outra com a cadeia A desta lectina. No primeiro caso, é observado aquilo reportado anteriormente: W1 conservada nas três estruturas e W2 apenas na ConM e ConBr. No segundo, o inverso acontece: W2 é conservada nas três estruturas e W1 apenas na ConM e ConBr (Figura 32). Assim, a presença de um elemento de translação no terceiro eixo do grupo espacial da CGL é responsável por promover a ausência de uma molécula de água na cadeia A e a ausência de outra molécula na cadeia L.

Outras diferenças identificadas entre as três estruturas referem-se à cadeia lateral do resíduo Ser113 e à modelagem do loop Ser117-Glu122.

No primeiro caso, observou-se que ocorreu uma rotação para o exterior da região H da cavidade hidrofóbica de aproximadamente 160° no resíduo da ConM em relação ao da ConBr e 180° em relação ao da CGL. Tal mudança conformacional foi induzida pela presença do grupo amino do GABA nesta região, evitando, assim, um impedimento estérico desta porção do aminoácido não proteico com a hidroxila da Ser113 (Figura 32).

Figura 32 Sobreposição das estruturas cristalográficas dos complexos ConM/GABA (azul), ConBr/Abu (cinza) e CGL/Abu (verde). Observa-se a mudança conformacional da cadeia lateral da Ser113 (círculo vermelho) na estrutura da ConM. Destacam-se, ainda, as moléculas de água W1 e W2 (esferas) que participam da estabilização dos ligantes. Círculo verde refere-se à molécula de água W2 presente na cadeia A da CGL.



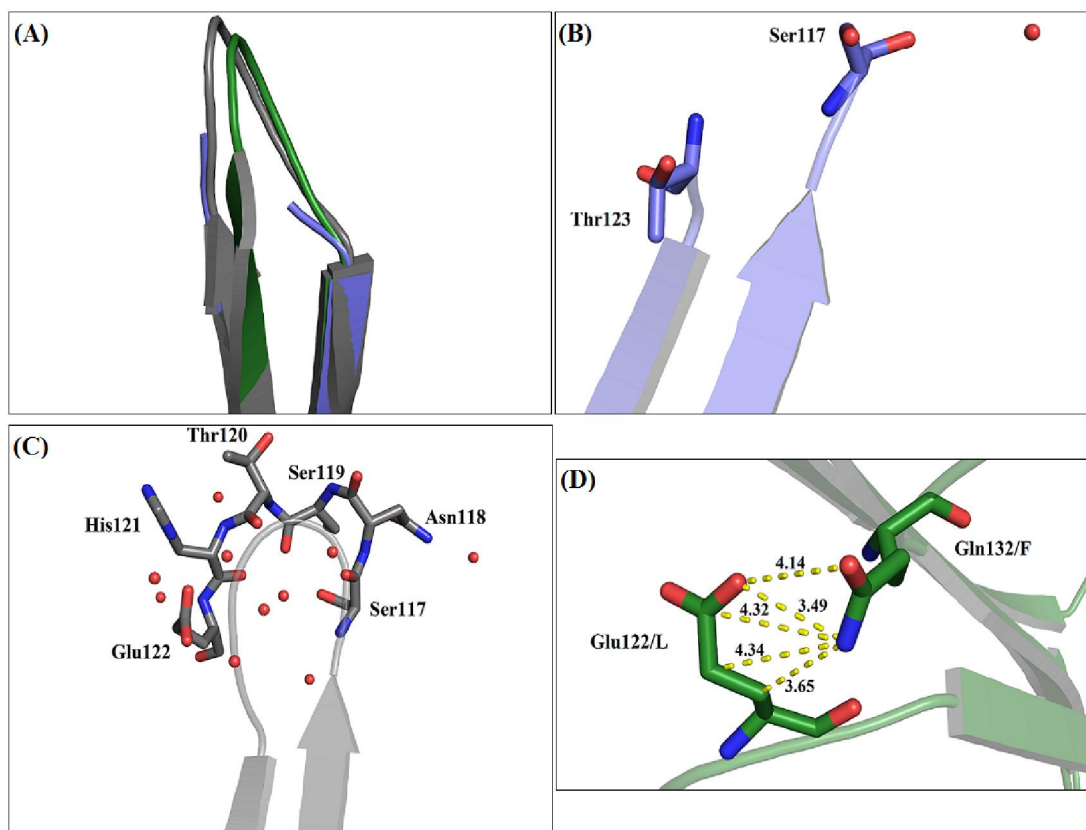
No segundo caso, observou-se que o *loop* foi completamente modelado apenas para a ConBr e CGL, enquanto que para a ConM apenas o resíduo Ser117 apresentou densidade eletrônica (Figura 33A e B). Para a primeira, a explicação pode estar relacionada com a presença de 10 moléculas de água que circundam o *loop*, as quais, perfazendo interações de hidrogênio com os resíduos que o constituem, diminuem sua flexibilidade (BÖS; PLEISS, 2008), favorecendo, assim, a amplificação do sinal derivado do processo de difração de raios X, o que resulta na modelagem estrutural da região (Figura 33C). Por outro lado, embora não apresente moléculas de água circunvizinhas, o *loop* na estrutura tetramérica da CGL parece ser estabilizado devido à interação entre o resíduo Glu122 de um monômero e a Gln132 do monômero adjacente participante da formação do dímero canônico (Figura 33D). De fato, estruturas quaternárias de lectinas *Canavalia* spp. cujos *loops* Ser117-Glu122 foram completamente modelados (PDB IDs: 2D7F e 1WUV para CGL; 2CWM e 2CY6 para ConM; 1BXH e 1CVN para ConA) mostram a ocorrência de uma ligação de hidrogênio e/ou interações de van der Waals entre o Glu122 de uma cadeia e a Gln132 de outra.

O complexo ConM/adenina, resolvido como um monômero, não apresentou seu *loop* Ser117-Glu122 modelado, diferentemente daquilo reportado para o complexo monomérico ConBr/Abu, o que pode estar relacionado com o menor número de moléculas de água presente na unidade assimétrica da ConM (87 contra 139 da ConBr). Deste modo, as

moléculas de solvente passam a interagir com outras regiões da proteína, deixando o *loop* sem estabilização.

Levando-se em consideração que a ConM e a ConBr apresentaram-se em sua forma monomérica enquanto a CGL estava em sua forma tetramérica, propomos que a estabilização do *loop* Ser117-Glu122 pode ocorrer por diferentes fatores, dependendo do arranjo estrutural da proteína. Em sua forma monomérica, a presença de moléculas de água que perfazem interações de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos que o constituem permite que os mesmos apresentem menor flexibilidade quanto às suas conformações. Por outro lado, no arranjo quaternário dimérico e tetramérico, o *loop* é estabilizado por interações hidrofílicas performadas entre o resíduo Glu122 de um monômero e a Gln132 da cadeia adjacente.

Figura 33 *Loop* Ser117-Glu122 nas estruturas cristalográficas dos complexos ConM/GABA azul, ConBr/Abu (cinza) e CGL/Abu (verde). (A) Sobreposição do *loop* nas três estruturas, mostrando que o mesmo encontra-se truncado na ConM. (B) Detalhe da região na ConM, destacando que apenas uma molécula de água (esfera vermelha) encontra-se na vizinhança do *loop*. (C) *Loop* modelado da ConBr, mostrando a presença de 10 moléculas de água em sua circunvizinhança. (D) Interações de van der Waals entre as cadeias laterais do Glu122 da cadeia L e da Gln132 da cadeia F na estrutura da CGL, as quais podem ser responsáveis pela estabilização do *loop* em estruturas quaternárias de lectinas Diocleinae.



6.3 LIGAÇÃO DA ConM A CITOCININAS

Embora nenhum estudo prévio tenha sido conduzido para se analisar a interação entre lectinas Diocleinae e adenina, o fato desta base nitrogenada, bem como do grupo indol (DELATORRE et al., 2013), se ligar ao CRD da ConM pode indicar que sua presença interfira com a capacidade de ligação a carboidratos. Para verificar esta hipótese submetemos o complexo ConM/adenina a um processo de *docking* molecular, tendo como ligantes os carboidratos trealose e MAN13 [man(α 1-3)man(α 1-O)Me], os quais são formas dissacarídicas da glicose e da manose, respectivamente, e cujas estruturas cristalográficas em complexo com a ConM foram resolvidas previamente (BEZERRA et al., 2007; DELATORRE et al., 2006). Estes glicídios foram escolhidos (1) porque a ConM apresenta maior afinidade de ligação a dissacarídeos (GADELHA et al., 2005b; RAMOS et al., 1996) e (2) porque representam formas diméricas dos monossacarídeos glicose e manose, os quais são os açúcares que, historicamente, são reportados como sendo aqueles que dão especificidade às lectinas Diocleinae (RAMOS; BELTRAMINI; MOREIRA, 2001).

Interessantemente, os resultados obtidos mostraram que os dois dissacarídeos mantiveram a capacidade de se ligarem ao CRD da ConM, mesmo com a presença da base nitrogenada. Nos dois casos, as moléculas de açúcar encontram-se dispostas no sítio de modo a performar interações com os resíduos Leu99, Tyr100 e Arg228, bem como com a própria base nitrogenada. Apesar disso, diferenças importantes foram observadas nos dois complexos. Por exemplo, embora as primeiras unidades monossacarídicas das duas moléculas coincidam, aproximadamente, em posição, as segundas unidades encontram-se ortogonalmente dispostas uma relação à outra, com a unidade da maltose mais próxima da Tyr12 (perfazendo uma interação de hidrogênio) e a da trealose distalmente posicionada em relação a este resíduo. Tais diferenças se refletiram nos valores das energias de ligação obtidos nos processos de *docking*, onde aquele retornado para o dissacarídeo de manose apresentou-se melhor (-243.12 Kcal/mol contra -231.17 Kcal/mol para a trealose). Provavelmente, isto seja resultado da capacidade da MAN13 interagir com o resíduo Tyr12, o qual é reportado como sendo essencial para a ligação de oligossacarídeos (DAM et al., 1998; DAM et al., 2000; DELATORRE et al., 2006), bem como da proximidade de seu grupamento metil aos resíduos Leu99 e Tyr100. Deste modo, a presença da adenina no CRD da ConM parece não interferir com sua capacidade de ligação a carboidratos, resultado este semelhante àquele reportado por

Delatorre e colaboradores (2013) para o complexo ConM/indol. Entretanto, a presença de compostos derivados desta base nitrogenada pode, de fato, afetar esta interação (discutido a seguir).

A capacidade que as lectinas de leguminosas tem em interagir com a adenina indicaria, do ponto de vista da fisiologia vegetal, que tais proteínas poderiam se ligar a citocininas, fitohormônios derivados desta base nitrogenada que estão relacionadas principalmente, com processos de divisão de celular, embora também desempenhem funções quanto a respostas a estresses bióticos e abióticos. De fato, dois estudos demonstraram que a lectina Mistletoe I, uma proteína inativadora de ribossomos (RIP – *Ribosome Inactivating Protein*) isolada do visco-branco (*Viscum album*), se liga às citocininas zeatina (MEYER et al., 2008) e kinetina (MALECKI et al., 2012). Sendo uma RIP, mais especificamente da classe II, a estrutura tridimensional desta lectina apresenta dois domínios: um de reconhecimento a carboidratos, que permite sua ligação à superfície celular com subsequente internalização, e um catalítico, responsável pela clivagem de uma ligação N-glicosídica em uma adenosina específica presente no rRNA 28S da subunidade 60S do complexo ribossômico (PARK et al., 2004). Os dois estudos destacados previamente demonstraram que ambas as citocininas se ligam no sítio ativo da Mistletoe I.

Levando-se em consideração que o presente trabalho destacou que a ConM se liga à adenina através de seu CRD, procuramos verificar, semelhantemente ao que fora realizado para a Mistletoe I, se aquela lectina também teria a capacidade de se ligar a citocininas e se, de fato, tal interação ocorreria no próprio CRD. Curiosamente, os resultados do processo de *docking* molecular da ConM como molécula receptora mostraram que as três principais citocininas naturais, isopenteniladenina (ZIP), *trans*-zeatina (tZEA) e kinetina (KIN) se ligam ao CRD da lectina. As duas últimas adquirem um posicionamento bastante similar dentro do sítio, com o anel purínico da adenina interagindo com a Arg228, semelhante ao reportado para a mistletoe, onde o anel interage com a Arg168 (KRAUSPENHAAR et al., 2002; MALECKI et al., 2012), e suas cadeias ligantes à base, isopentenil hidroxilada e furfuril, respectivamente, voltadas para as cadeias laterais dos resíduos Tyr12, Leu99 e Tyr100, fazendo, assim, com que o eixo transversal (Leu99 → Arg228) do sítio fique preenchido pelo fitohormônio. O mesmo ocorre com a ZIP, embora, neste caso, a molécula sofra uma rotação de aproximadamente 180° em relação a suas homólogas, com o anel purínico próximo aos resíduos hidrofóbicos Tyr12, Leu99 e Tyr100 e a cadeia isopentenil voltada para a Arg228. Interessantemente, apesar desta mudança, esta citocinina apresentou uma energia de ligação

maior que a KIN (-262.65 Kcal/mol e -220.75 Kcal/mol, respectivamente), embora menor que a tZEA (-274.86 Kcal/mol), o que pode ser explicado pelo número de interações hidrofóbicas que estabilizariam os três ligantes (99 para tZEA, 97 para ZIP e 81 para KIN).

Embora a adenina presente no CRD da ConM pareça não interferir com a interação desta lectina com os dissacarídeos trealose e MAN13 (Figura 24), o mesmo parece não acontecer quando citocininas se encontram no mesmo local. Os processos de *docking* molecular do complexo ConM/tZEA com os dissacarídeos trealose e MAN13 como moléculas ligantes mostraram que estes açúcares não se ligam à lectina através de seu CRD, indicando que, de fato, a presença de fitohormônios no CRD, diferentemente do que ocorre para a base nitrogenada, não possibilita que a lectina se ligue a moléculas de carboidratos (Figura 25). Provavelmente, no caso da tZEA, isto ocorra devido à presença da cadeia isopentenil hidroxilada ligada ao anel purínico, fazendo com que a molécula preencha o espaço referente ao eixo transversal do CRD, de modo que o sítio fique limitado para a acomodação de duas moléculas de tamanhos relativamente iguais. Resultado similar foi obtido submetendo-se a cadeia A da ConM co-cristalizada com a trealose (PDB ID 2CY6) e com a MAN13 (PDB ID 2P37) a processos de *docking* molecular com a tZEA, onde esta citocinina encontra-se localizada na região próxima ao sítio de ligação a aminoácidos não proteicos (Figura 26).

6.4 LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO NÃO CONVENCIONAIS

Como reportado, a molécula de GABA, bem como as citocininas e os açúcares utilizados nos processos de *docking*, encontra-se estabilizada por interações de hidrogênio ditas não convencionais, as quais tem um grupo -CH como doador. Embora com eletronegatividade menor do que aquela observada para os átomos doadores “comuns” oxigênio, nitrogênio e flúor, o carbono pode participar da formação deste tipo de interação devido sua eletronegatividade ser maior que a do átomo de hidrogênio a ele covalentemente ligado, de modo que os elétrons compartilhados irão se situar mais proximamente àquele átomo, criando assim um dipolo parcialmente positivo na região do hidrogênio. Apesar de todos os carbonos reportados neste trabalho e que participam da formação destas interações apresentarem hibridização sp^3 (quatro substituintes), fato que os tornariam fracos doadores

(CANNIZZARO; HOUK, 2002; VDOVENKO et al., 2013), a presença de átomos mais eletronegativos a eles ligados, como o oxigênio nas moléculas de carboidratos e o nitrogênio nas moléculas de GABA e citocininas, torna a formação deste tipo de ligação mais favorável (SCHEINER, 2011), uma vez que os elétrons, estando deslocados para o átomo mais eletronegativo, podem contribuir para uma maior polarização da ligação –C-H, dando-a, assim, um caráter mais ácido e tornando a interação de hidrogênio mais forte (STEINER; DESIRAJU, 1998; WAHL; SUNDARALINGAM, 1997).

De fato, a presença destas ligações “fora do padrão” é de extrema importância para a estabilização estrutural de proteínas e ácidos nucleicos, bem como são requeridas para o estabelecimento de interações entre proteínas e ligantes (GU; KAR; SCHEINER, 1999; HOROWITZ; TRIEVEL, 2012; SCHEINER, 2009). Assim, é possível inferir que a capacidade das lectinas de se ligarem a moléculas com propriedades estruturais e químicas distintas, como carboidratos, aminoácidos não proteicos e compostos hidrofóbicos, pode estar relacionada com a existência desse tipo de interação, que, juntamente com outros tipos de interações intermoleculares, contribui para uma maior estabilidade dos complexos formados.

6.5 RELAÇÃO ESTRUTURA-FUNÇÃO: UM MODELO DE MECANISMO PARA A ATIVIDADE INSETICIDA DE LECTINAS

Uma das formas de defesa das plantas, quando submetidas a um estresse biótico, sob ataque de um inseto herbívoro, por exemplo, é a produção de metabólitos secundários, dentre os quais pode-se destacar o aminoácido não proteico GABA (HUANG; JANDER; DE VOS, 2011). Estudos mostram que a concentração deste composto aumenta cerca de 20 a 40 vezes dentro de 5-10 minutos sob estas condições (BOWN; HALL; MACGREGOR, 2002; FOUGÉRE; LE RUDULIER; STREETER, 1991; RHODES; HANDA; BRESSAN, 1986; WALLACE; SECOR; SCHRADER, 1984). Além disso, é mostrado que o mesmo, quando presente em dietas artificiais administradas a larvas de insetos, causa efeitos negativos sobre seu desenvolvimento, como redução de crescimento e sobrevivência e prolongamento do tempo para sofrerem metamorfose em pupa (RAMPUTH; BOWN, 1996). Neste sentido, especula-se que os danos proporcionados pelo GABA esteja relacionado com a ativação de seus receptores ionotrópicos localizados nas junções neuromusculares desses animais, os

quais, sendo canais de íons cloreto, promovem uma hiperpolarização da membrana (BOWN; MACGREGOR; SHELP, 2006).

De acordo com a capacidade da ConM interagir com o GABA, como descrito neste trabalho, é possível que esta lectina desempenhe sua função de proteção contra herbivoria através de um mecanismo de captura, transporte e liberação deste metabólito. A primeira destas etapas ocorreria pela ligação do GABA ao sítio de reconhecimento a aminoácidos não proteicos, o que seria um processo extremamente favorável do ponto de vista energético, uma vez que a interação de uma proteína com um ligante promove a saída de moléculas de água que previamente preenchiam o sítio ativo/de ligação, acarretando em um aumento na desordem do sistema, o que, conseqüentemente, diminui a energia livre do mesmo (MARTIN; CLEMENTS, 2013; ROSS, 2011). Levando-se em consideração que tal interação ocorreria com a lectina em seu estado monomérico, o transporte do GABA para o interior do trato digestório do inseto (ou de sua forma larval) não seria possível neste arranjo tridimensional, uma vez, que como visto neste trabalho, o sítio para aminoácidos proteicos encontra-se na superfície da estrutura terciária, com o grupo carboxil (hidrofílico) voltado para o espaço externo. Nesta configuração, o GABA torna-se um alvo fácil para que as moléculas de água presentes no meio, e em maior quantidade, substituam-no por meio da formação de interações de hidrogênio. Assim, após a formação do complexo ConM/GABA, a junção de duas moléculas da lectina formando um dímero canônico evitaria essa substituição, uma vez, que como visto, o metabólito encontra-se protegido do conteúdo do meio (Figura 18), de forma que o arranjo dimérico, e por extensão o tetramérico, é mais viável como transportador.

A análise do modelo de dímero canônico construído por cálculos de simetria, mostrou que em uma posição adjacente ao sítio para aminoácido não proteico, na interface dos dois monômeros e mais próximo à superfície da proteína, ocorreu uma mudança conformacional na cadeia lateral do resíduo Gln132 em relação a estruturas previamente reportadas para a ConM (Figuras 34A e 34B). Nesta mudança, seus átomos polares OE1 e NE2 encontram-se distais em relação à cadeia lateral do resíduo Glu183 da cadeia simétrica, ao passo que nas estruturas tetraméricas da ConM complexada com os dimanosídeos MAN13 e MAN14 [man(α 1-4)man(α 1-O)Me] (PDB ID 2P34) a cadeia lateral da Gln132 encontra-se proximal em relação ao Glu183. Interessantemente, esta mesma configuração é visualizada nas estruturas tetraméricas da CGL complexada com os mesmos açúcares e da ConA complexada com MAN13.

A mesma mudança conformacional, com a Gln132 distalmente posicionada em relação ao Glu183, é encontrada nas estruturas cristalográficas diméricas da ConM complexada com os dissacarídeos de glicose trealose e maltose (PDB ID 2CYF), embora no caso deste último apenas um dos pares Q132-E183 tenha apresentado a mudança conformacional, e do monômero da ConM com o dimanosídeo MAN12 [man(α 1-2)man(α 1-O)Me] (PDB ID 2OW4).

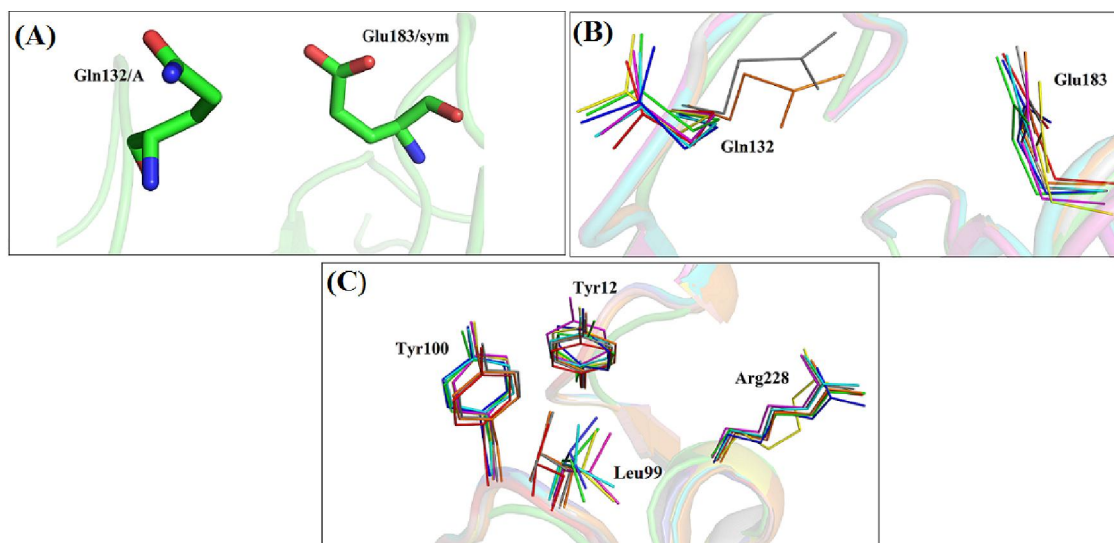
Isto nos leva a propor que, de acordo com o carboidrato com o qual a lectina interage, a mudança conformacional irá ocorrer ou não. Para a ligação da proteína com os dimanosídeos MAN13 e MAN14, a mudança não ocorre, enquanto que para MAN12 e a trealose a Gln132 apresenta-se com sua cadeia lateral distalmente posicionada em relação ao Glu183. No caso da interação das lectinas com a maltose, a qual promoveu mudança em apenas um dos pares, é possível especular que este dímero da glicose “ative” a alteração de modo parcial, onde apenas um par, no caso do dímero canônico, é afetado.

Curiosamente, a estrutura nativa dimérica da ConM, não ligada a carboidrato (PDB ID 2CWM), mostra que nos dois monômeros a Gln132 encontra-se com sua cadeia lateral distalmente posicionada em relação ao Glu183. Levando-se em consideração que nas estruturas nativas das demais lectinas *Canavalia* [ConBr, *C. brasiliensis* (PDB ID 1AZD e 3JU9); ConA, *C. ensiformis* (PDB ID 1JBC) e CGL, *C. gladiata* (PDB ID 1WUV)] a Gln132 encontra-se proximal, é razoável inferir que na ausência de interação com carboidratos, este resíduo alterne sua conformação entre os estados proximal e distal, com uma predominância para a primeira posição. Entretanto, sob interação com moléculas glicídicas específicas, a conformação distal seria estabilizada e favorecida. Mecanismo similar foi observado para o domínio de ligação a glutamato (Glu) de receptores ionotrópicos GluRs, os quais são constituídos por dois lobos que, juntos, formam uma cavidade onde o aminoácido se liga. Em sua forma apoproteica (sem interação com o Glu), o domínio parece existir em duas formas conformacionais: aberta e fechada, com predominância da primeira. Quando o Glu se liga à cavidade a forma fechada é estabilizada e predomina sob a aberta (MADDEN, 2002).

Como observado pelo presente trabalho, entretanto, não é só a interação com carboidratos que parece influenciar a conformação distal da Gln132: a presença da adenina e do grupo indol no CRD da ConM também o fazem. Neste sentido, outro fator pode estar relacionado com esse processo. A análise do CRD de todas as estruturas cristalográficas da ConM nos dá uma pista da identidade deste fator. Nas estruturas onde a Gln132 encontra-se

proximal (ConM/MAN13, ConM/ MAN14 e cadeia A da ConM/maltose) a cadeia lateral da Leu99, a partir de seu átomo de carbono CB, mostra-se mais próxima à Tyr100. Por sua vez, nas estruturas cuja Gln132 apresenta-se distal (ConM/trealose, ConM/adenina, ConM/indol, ConM/nativa e cadeia D da ConM/maltose) a Leu99 mostra um caráter também distal em relação à Tyr100. Assim, propomos que a diferença conformacional deste resíduo possa estar relacionada com a estabilização do estado proximal ou distal da Gln132, com o primeiro sendo influenciado pela proximidade da Leu99 com a Tyr100 e o segundo pelo distanciamento entre estes dois resíduos (Figura 34C). Apesar desta tendência, observou-se que na estrutura da ConM/MAN12, cuja Gln132 está distal, a cadeia lateral da Leu99 apresenta uma conformação semelhante àquela visualizada para as estruturas com a Gln132 proximal, indicando que trabalhos futuros deverão ser desenvolvidos para esclarecer este mecanismo.

Figura 34 Disposição da Gln132 de um monômero em relação ao Glu183 de outro. (A) Disposição dos dois resíduos no complexo ConM/adenina/GABA. “Sym” refere-se à cadeia simétrica. (B) Sobreposição das estruturas cristalográficas da ConM complexada com diferentes ligantes. (C) Conformação da Leu99, a qual parece refletir na conformação da Gln132: se sua cadeia encontra-se distal em relação à Tyr100, a glutamina também está distal em relação ao Glu183; se sua cadeia está proximal, a glutamina também se encontra proximal. Exceção a isto é observada para o complexo ConM/MAN12, que apresenta a glutamina distal, mas a Leu99 proximal. Estruturas cristalográficas da ConM: Nativa (cian – PDB ID 2CWM); ConM/adenina/GABA (verde – PDB ID 4I30); ConM/indol (azul – PDB ID 3SNM); ConM/trealose (magenta – PDB ID 2CY6); cadeia D da ConM/maltose (amarelo – PDB ID 2CYF); ConM/MAN12 (vermelho – PDB ID 2OW4); ConM/MAN13 (laranja – PDB ID 2P37); ConM/MAN14 (cinza – PDB ID 2P34).



O papel de defesa das lectinas contra insetos herbívoros depende, principalmente, de sua interação com glicoproteínas presentes na superfície das células epiteliais que recobrem o trato digestório destes animais, bem como com aquelas presentes na membrana peritrófica (MP), uma camada de quitina (polímero do monossacarídeo *N*-acetilglicosamina) e proteínas que recobre o bolo alimentar, dando-o proteção mecânica, impedindo invasão de microrganismos e compartimentalizando enzimas necessárias para sua digestão (TERRA, 2001). De fato, a ligação de lectinas promove mudanças estruturais bastante significativas na MP, o que acarreta severos distúrbios funcionais da mesma (VANDENBORRE; SMAGGHE; VAN DAMME, 2011).

A ação inseticida das lectinas parece não estar limitada à sua interação com glicoproteínas da superfície epitelial. Fitchel e colaboradores (2001) demonstraram que as lectinas ConA e GNA, extraídas da *Canavalia ensiformis* e da *Galanthus nivalis*, respectivamente, também podem, por meio do processo de transcitose, onde macromoléculas são seletivamente transportadas de um ambiente a outro enquanto seus conteúdos continuam distintos (TUMA; HUBBARD, 2003), serem encontradas em outras regiões do inseto além do trato digestório, como por exemplo a hemolinfa, de onde podem ser distribuídas para diversos órgãos, causando uma disfunção sistêmica.

Embora a maioria das ações inseticidas das lectinas demonstrem que a ligação das mesmas a glicoconjugados presentes na superfície celular seja fundamental e necessária, estudos mostram que tal processo é insuficiente para explicar todos os efeitos ocasionados pela ingestão destas proteínas (VASCONCELOS; OLIVEIRA, 2004), indicando que outras propriedades poderiam estar relacionadas.

Levando-se em consideração todos esses processos acima reportados, propomos um possível mecanismo que poderia explicar mais detalhadamente como as lectinas desenvolveriam suas atividades de defesa da planta. A lectina, ao interagir com o metabólito secundário GABA, o transportaria, na forma de dímero ou tetrâmero, para o interior do inseto. Ao atingir o trato digestório, sua interação com carboidratos específicos induziria uma mudança conformacional da cadeia lateral do resíduo Gln132, como mostrado anteriormente, tornando o GABA mais susceptível a desfazer suas interações com a proteína por promover um maior acesso das moléculas de água do meio ao sítio de ligação de aminoácidos não proteicos. Tal liberação do metabólito poderia ocorrer em dois momentos, não necessariamente excludentes: (1) após interação da lectina com as glicoproteínas presentes na

superfície das células epiteliais e/ou (2) após seu processo de transcitose. Aquelas que não o liberassem no primeiro cenário, poderiam o fazer no segundo, como, por exemplo, na hemolinfa, a qual, curiosamente, apresenta como açúcar mais característico o dissacarídeo trealose (LÜ et al., 2012), o qual promoveu a mudança conformacional da Gln132 na estrutura cristalográfica da ConM. O GABA liberado, então, poderia interagir com seus receptores de superfície e desempenhar seus efeitos.

Embora seja muito especulativa, tal proposta mostra-se bem interessante levando-se em consideração os dados reportados no presente trabalho e aqueles demonstrados por diversos estudos. O mecanismo proposto explicaria (1) o fato da ligação das lectinas a carboidratos ser essencial, mas não suficiente, para os efeitos desencadeados por sua ingestão (MICHIELS; VAN DAMME; SMAGGHE, 2010; VASCONCELOS; OLIVEIRA, 2004), uma vez que, concomitante a esta interação, haveria liberação do GABA capturado e transportado e (2) o fato de, quando identificadas nas fezes dos animais, após horas de sua ingestão, tais proteínas continuarem a apresentar atividade hemaglutinante (VASCONCELOS; OLIVEIRA, 2004), indicando que após todo o processo as estruturas diméricas e/ou tetraméricas permaneceram preservadas. Para este segundo caso, a explicação estaria relacionada, além da capacidade de se manterem estáveis mediante ação de proteases e do pH do meio (PAIVA et al., 2012), à mudança conformacional do resíduo Gln132, a qual facilitaria a liberação do GABA sem que fosse necessária a dissolução da estrutura quaternária.

A presente estrutura cristalográfica da ConM complexada com o GABA, entretanto, indica a existência de um “gap” no mecanismo proposto: a substituição das interações do aminoácido não proteico com a proteína pelo maior acesso que as moléculas de água do meio tem ao sítio de ligação, devido à mudança conformacional da Gln132, é um processo que aumentaria a energia livre do sistema, uma vez que as moléculas do solvente (água) passariam de um estado desordenado (livre no meio) para um organizado, estável, dentro do sítio. Tal processo promoveria uma queda da entropia do sistema, tornando, assim, o mecanismo energeticamente desfavorável. No entanto, a resolução parcial da estrutura cristalográfica da lectina ConBr, isolada das sementes da *Canavalia brasiliensis* e que apresenta uma identidade de 98% com a ConM, complexada com o mesmo metabólito GABA parece resolver este problema.

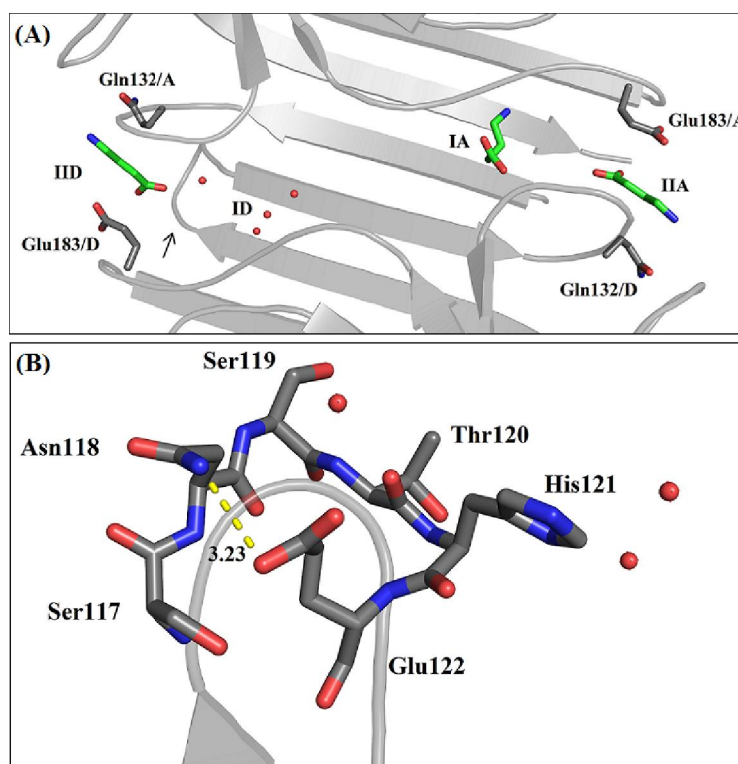
O coeficiente de Matthews indicou que a unidade assimétrica do cristal formado pelo complexo ConBr/GABA apresenta duas moléculas, as quais foram modeladas como um dímero canônico (cadeias A e D). Além de estar presente no mesmo sítio descrito no presente trabalho (sítio primário), o GABA ligado à ConBr encontra-se coordenado na região onde ocorre a mudança conformacional da Gln132 (sítio secundário) (Figura 35A), a qual, interessantemente, é predita como sendo um possível sítio de ligação pelo servidor *on-line* Q-sitefinder (LAURIE; JACKSON, 2005), uma ferramenta que, além de fazer tal predição, nos diz o valor aproximado do volume do mesmo. A presença do metabólito neste local, tão exposto às moléculas do meio, corrobora nossa ideia inicial de que a mudança conformacional torna o GABA mais susceptível à ação das moléculas de água. Curiosamente, um dos sítios primários para o GABA (correspondente à cadeia D – ID) encontra-se preenchido com quatro moléculas de água, enquanto seu sítio secundário adjacente (IID) contém uma molécula de GABA, o qual interage com a Gln132 da cadeia A e Glu183 da cadeia simétrica D.

Na cadeia D, o *loop* S117-E122 encontra-se modelado, diferentemente da mesma região para a cadeia A no mesmo complexo e para a presente estrutura da ConM. Tal *loop* sofreu uma profunda mudança conformacional quando comparado com aquele modelado, por exemplo, para a mesma lectina ConBr complexada com o Abu. A estabilização do mesmo nestas duas situações ocorre por diferentes razões: para o complexo ConBr/Abu, o *loop* encontra-se circundado por 10 moléculas de águas, as quais interagem com as cadeias laterais e principais dos resíduos de aminoácidos que o compõem; enquanto isso, o mesmo *loop* na cadeia D do complexo ConBr/GABA apresenta apenas duas moléculas de água ao seu redor, de modo que sua estabilização é proporcionada principalmente pela mudança conformacional do Glu122, que passou a interagir com a Asn118 através de suas cadeias laterais (Figura 35B).

Neste sentido, a presença de poucas moléculas de água ao redor do *loop* modelado, na região correspondente ao sítio primário ID e secundário IID, indica, pelo menos indiretamente, que houve um aumento na desordem do sistema, fazendo com que a energia livre fosse compensada pela substituição do GABA pelas moléculas de água.

Assim, de maneira geral, o mecanismo proposto, que parecia desfavorável, passa a ter um aspecto mais energeticamente favorável, onde a retirada do GABA do sítio primário é compensada pela estabilização independente de água do *loop* Ser117-Glu122.

Figura 35 Estrutura cristalográfica da ConBr em complexo com o GABA. (A) Visão geral da estabilização das três moléculas do aminoácido não proteico na interface do dímero canônico. Destaca-se a conformação da Gln132 nas duas cadeias (A e D), a qual encontra-se distalmente disposta em relação ao Glu183 da cadeia adjacente. Nota-se, ainda que enquanto há uma molécula de GABA no sítio primário da cadeia A (IA), quatro moléculas de água preenchem o respectivo da cadeia D (ID). IIA e IID referem-se ao sítio secundário do GABA das cadeias A e D, respectivamente. A seta indica que o *loop* Ser117-Glu122 do monômero D foi estabilizado, ao passo que o da cadeia A encontra-se truncado. (B) Detalhe do *loop* estabilizado, destacando a presença de apenas três moléculas de água (esferas vermelhas) em sua vizinhança. É mostrada ainda que o resíduo Glu122 sofreu uma mudança conformacional de tal modo a perfazer uma interação de hidrogênio (114.8°) com a cadeia lateral da Asn118, o que pode ter ocasionado uma queda na flexibilidade do *loop*, permitindo, assim, que o mesmo pudesse ser modelado.



Em adição à síntese de metabólitos secundários quando submetida a um estresse (KESSLER; BALDWIN, 2002; SELMAR; KLEINWÄCHTER, 2013), como o ataque de um inseto herbívoro, as plantas podem ativar e regular suas respostas de defesa pela atividade de hormônios específicos com etileno, ácido salicílico e jasmonato (PIETERSE et al., 2009; PIETERSE et al., 2012). Entretanto, hormônios primariamente relacionados com o crescimento e desenvolvimento vegetal, como auxinas, giberelinas e citocininas demonstram também participar deste processo (ROBERT-SEILANIANZ et al., 2007). No caso dos hormônios derivados da adenina (citocininas), que tem seus níveis aumentados quando a

planta sofre um ataque de herbivoria (DERVINIS et al., 2010; GIRON et al., 2013), por exemplo, sua atuação, neste contexto “imunológico”, envolve diminuição da senescência foliar e ativação de fatores de resposta a estresse (CHOI et al., 2011), como os três primeiros hormônios citados anteriormente.

Neste sentido, baseado na interação da ConM com a adenina, e de outras lectinas com representantes dos fitohormônios derivados desta base (MALECKI et al., 2012; MEYER et al., 2008), sugerimos que tais proteínas poderiam estar relacionadas em uma etapa da via de sinalização que leva ao desenvolvimento de respostas da planta contra a herbivoria. Isto fica mais evidenciado pelos resultados de *docking* molecular da ConM com as citocininas isopenteniladenina, *trans*-zeatina e kinetina, as quais encontraram-se coordenadas no domínio de reconhecimento a carboidrato desta lectina.

Provavelmente, o mecanismo pelo qual lectina e citocinina atuem para estimular a defesa vegetal frente a um ataque de inseto herbívoro esteja relacionado com a capacidade de liberação do GABA que a proteína apresenta (como visto anteriormente). Neste sentido, Merewitz e colaboradores (2012) demonstraram que plantas transgênicas expressando o gene *ipt* para biossíntese da isopenteniladenina aumentam seus níveis intracelulares de GABA. Embora este estudo tenha sido conduzido para se avaliar a tolerância vegetal à seca, onde o aminoácido não proteico apresenta participação ativa nesta e em outras respostas a estresses abióticos (AKÇAY et al., 2012; AL-QURAAN; SARTAWA; QARYOUTI, 2013; SHELPI et al., 1999), é razoável inferir que o fitohormônio promova um efeito similar sob um estresse biótico, visto que as vias metabólicas envolvidas no processo de defesa são essencialmente as mesmas nas duas situações (FRAIRE-VELÁZQUEZ; RODRÍGUEZ-GUERRA; SÁNCHEZ-CALDERÓN, 2011; FUJITA et al., 2006). Assim, o aumento citosólico de GABA, acompanhado da elevação dos níveis de citocininas quando do ataque de um inseto herbívoro, pode estar relacionado, além da ativação de sua enzima formadora (GAD – Glutamato Decarboxilase) [BOWN et al., 2006], com sua liberação do sítio de ligação presente na lectina, a qual ocorreria devido à mudança conformacional da Gln132 mediante interação desta proteína com o fitohormônio, similarmente ao mecanismo proposto anteriormente quando da interação da lectina com moléculas de carboidratos.

Apesar do resultado bastante interessante apresentado pelo *docking* molecular da ConM com as citocininas, e, por extensão, do mecanismo proposto anteriormente para a atuação destas moléculas sobre a defesa vegetal, é mais provável que esta interação ocorra

entre o CRD das lectinas e as formas glicosiladas destes fitohormônios, que funcionam no armazenamento e transporte de suas formas ativas (SCHMÜLLING, 2004). Embora o processo de glicosilação possa envolver a adição de moléculas de glicose (e mais raramente de xilose) [BAJGUZ; PIOTROWSKA, 2009] aos átomos de nitrogênio N3, N7 e N9 do anel purínico, a acomodação deve ocorrer com o resíduo glicídico ligado à cadeia substituinte do N6 da base, uma vez que as posições da adenina na estrutura cristalográfica e das citocininas tZEA e KIN nos *docking* indica que a coordenação da molécula glicosilada seria favorecida se o açúcar estivesse ligado à cadeia, onde torções facilitariam a estabilização do motivo glicídico na porção mais profunda do CRD. Do contrário, se o açúcar estivesse ligado à base, a posição do hormônio glicosilado para que o carboidrato fosse acomodado na mesma região seria semelhante aquela observada para a ZIP no *docking* com a ConM, o que provavelmente tornaria a estabilização da molécula como um todo muito fraca já que a cadeia substituinte não teria espaço nem interações suficientes.

É válido ressaltar que todas as hipóteses apresentadas neste trabalho foram formuladas com base em dados estruturais e dados obtidos da literatura científica, fazendo deste um estudo prioritariamente teórico. Embora muito interessantes e contextualizadas, tais ideias devem ser submetidas a testes bioquímicos e fisiológicos para que possam ser corroboradas ou não, ajudando assim a compreender melhor o papel que as lectinas tem para a fisiologia vegetal.

7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

- A presente análise da estrutura cristalográfica da lectina extraída das sementes do feijão-de-praia (*Canavalia maritima* Aub.), ConM, mostra, pela primeira vez, que seu monômero contém estruturas secundárias não repetitivas do tipo β -turn e β -bulge formadas por resíduos de aminoácidos envolvidos na estabilização de ligantes e altamente conservadas nas lectinas Diocleinae, dando um maior entendimento acerca da relação estrutura-função dessa classe de proteínas, o que pode facilitar sua aplicação como ferramenta biotecnológica;
- A ConM foi capaz de interagir com o ácido gama-aminobutírico (GABA) no mesmo sítio anteriormente reportado como sendo o local de ligação para seu isômero ácido alfa-aminobutírico (Abu), estabelecendo, assim, esta região como um domínio de reconhecimento a aminoácidos não proteicos;
- O modelo de arranjo biológico na forma de dímero canônico do complexo ConM/GABA mostra a ocorrência de uma mudança conformacional no resíduo Gln132 em relação a estruturas previamente resolvidas para esta lectina. De acordo com a análise estrutural da ConM complexada com diferentes açúcares, propomos que a natureza do carboidrato ligante irá favorecer ou não a mudança na cadeia lateral da Gln132;
- A ConM foi ainda capaz de interagir com a base nitrogenada adenina, a qual encontrava-se estabilizada por resíduos de aminoácidos constituintes do Domínio de Reconhecimento a Carboidratos (CRD) desta lectina, semelhantemente ao observado para o complexo ConM/indol. A presença destas duas moléculas hidrofóbicas no “topo” do CRD, perfazendo interações com a Arg228 é influenciada pela presença de uma pequena região hidrofóbica localizada posteriormente a este resíduo, a qual é formada pela ocorrência de uma β -bulge, mostrando, assim, a importância de estruturas secundárias não repetitivas tanto para o arranjo tridimensional da lectina quanto para a capacidade incomum de interação do CRD destas proteínas com ligantes hidrofóbicos;
- Os resultados de *docking* molecular entre a ConM e as citocininas mostraram que estes fitohormônios se ligam no CRD da lectina. Embora interessantes, é mais provável que a

interação ocorra com as formas glicosiladas destas moléculas. Futuramente, estudos estruturais e de bancada deverão dizer se aquilo visto pelos processos de *docking* é válido ou não;

- A descrição de interações de hidrogênio não convencionais, embora consolidada para proteínas e ácidos nucleicos, foi realizada pela primeira vez para lectinas complexadas com seus ligantes. Neste sentido, descrições similares deverão ser reportadas para se ter um maior entendimento acerca da capacidade de interação desta classe de proteínas com diferentes ligantes, o que pode permitir avanços quanto à elucidação das bases estruturais de sua promiscuidade;
- Embora bastante consolidada a ideia de que lectinas vegetais desempenham atividades de defesa contra herbivoria, poucos estudos demonstraram satisfatoriamente os mecanismos moleculares envolvidos neste processo. O presente trabalho traz outras visões para este tópico, servindo de base para que estudos bioquímicos e fisiológicos corroborem as ideias aqui apresentadas, o que pode ser útil, por exemplo, no desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas que protejam culturas economicamente importantes para a região Nordeste e para o país como um todo.

8. REFERÊNCIAS

- AKÇAY, N.; BOR, M.; KARABUDAK, T.; ÖZDEMİR, F.; TÜRKAN, I. (2012). Contribution of gamma-aminobutyric acid (GABA) to salt stress responses of *Nicotiana sylvestris* CMSII mutant and wild type plants. *J. Plant Physiol.*, 169: 452-458.
- AL-QURAAN, N.A.; SARTAWA, F.A.; QARYOUTI, M.M. (2013). Characterization of γ -aminobutyric acid metabolism and oxidative damage in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings under salt and osmotic stress. *J. Plant Physiol.*, 170: 1003-1009.
- ALENCAR, N.M.N.; TEIXEIRA, E.H.; ASSREUY, A.M.S.; CAVADA, B.S.; FLORES, C.A.; RIBEIRO, R.A. (1999). Leguminous lectins as tools for studying the role of sugar residues in leukocyte recruitment. *Mediators Inflamm.*, 8: 107-113.
- ANDRADE, J.L.; ARRUDA, S.; BARBOSA, T.; PAIM, L.; RAMOS, M.V.; CAVADA, B.S.; BARRAL-NETO, M. (1999). Lectin-induced nitric oxide production. *Cell Immunol.*, 194: 98-112.
- ARUNAN, E.; DESIRAJU, G.R.; KLEIN, R.A.; SADLEJ, J.; SCHEINER, S.; ALKORTA, I.; CLARY, D.C.; CRABTREE, R.H.; DANNENBERG, J.J.; HOBZA, P.; KJAERGAARD, H.G.; LEGON, A.C.; MENNUCCI, B.; NESBITT, D.J. (2011). Defining the hydrogen bond: an account (IUPAC technical report). *Pure Appl. Chem.*, 83: 1619-1636.
- ASSREUY, A.M.S.; MARTINS, G.J.; MOREIRA, M.E.F.; BRITO, G.A.C.; CAVADA, B.S.; RIBEIRO, R.A.; FLORES, C.A. (1999). Prevention of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis by glucose-mannose binding plant lectins. *J. Urol.*, 161: 1988-1993.
- AZEVEDO Jr., W.F. (2004). Cristalização de macromoléculas biológicas. Disponível em www.biocristalografia.df.ibilce.unesp.br
- AZEVEDO Jr., W.F. (2009). Processamento de dados de difração de raios e resolução de estruturas de proteínas. Material pessoal do autor.
- BAJGUZ, A.; PIOTROWSKA, A. (2009). Conjugates of auxin and cytokinin. *Phytochemistry*, 70: 957-969.
- BARAUNA, S.C.; KASTER, M.P.; HECKERT, B.T.; NASCIMENTO, K.S.; ROSSI, F.M.; TEIXEIRA, E.H.; CAVADA, B.S.; RODRIGUES, A.L.S. & LEAL, R.B. (2006). Antidepressant-like effect from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) administered centrally in mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 85: 160-169.
- BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; CAVADA, B.; GRANGEIRO, T.B.; DE FREITAS, L.A.R.; BARRAL-NETO, M. (2001). In vivo lymphocyte activation and apoptosis by lectins of the Diocleinae subtribe. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 96: 673-678.
- BARCISZEWSKI, J.; MASSINO, F.; CLARK, B.F.C. (2007). Kinetin – a multiactive molecule. *Int. J. Biol. Macromol.*, 40: 182-192.
- BARLOW, D.J.; THORNTON, J.M. (1988). Helix geometry in proteins. *J. Mol. Biol.*, 201: 601-619.

- BARRAL-NETO, M.; SANTOS, S.B.; BARRAL, A.; MOREIRA, L.I.; SANTOS, C.F.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.; CAVADA, B.S. (1992). Human lymphocyte stimulation by legume lectins from the Diocleinae subtribe. *Immunol. Invest.*, 21: 297-303.
- BECKER, J.W.; REEKE, G.N., Jr; WANG, J.L; CUNNINGHAM, B.A.; EDELMAN, G.M. (1975). The covalent and three-dimensional structure of Concanavalin A. III. Structure of the monomer and its interactions with metals and saccharides. *J. Biol. Chem.*, 250: 1513-1524.
- BENTO, C.A.M.; CAVADA, B.S.; OLIVEIRA, J.T.A.; MOREIRA, R.A.; BARJA-FIDALGO, C. (1993). Rat paw edema and leukocyte immigration induced by plant lectins. *Agents Actions*, 38: 48-54.
- BERNSTEIN, F.C.; KOETZLE, T.F.; WILLIAMS, G.J.; MEYER Jr, E.E.; BRICE, M.D.; RODGERS, J.R.; OKENNARD, O.; SHIMANOUCI, T.; TASUMI, M. (1977). The protein data bank: a computer-based archival file for macromolecular structures. *J. Mol. Biol.*, 112: 535-542.
- BEUVÉ, N.; RISPAIL, N.; LIANE, P.; CLIQUET, J-b; OURRY, A.; LE DEUNFF, E. (2004). Putative role of γ -aminobutyric acid as a long-distance signal in up-regulation of nitrate uptake in *Brassica napus* L. *Plant Cell Environ.*, 27: 1035-1046.
- BEZERRA, E.H.S.; ROCHA, B.A.M.; NAGANO, C.S.; BEZERRA, G.A.; MOURA, T.A.; BEZERRA, M.J.B.; BENEVIDES, R.G.; SAMPAIO, A.H.; ASSREUY, A.M.S.; DELATORRE, P.; CAVADA, B.S. (2011). Structural analysis of ConBr reveals molecular correlation between the carbohydrate recognition domain and endothelial NO synthase activation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 408: 566-570.
- BOMPARD-GILLES, C.; ROUSSEAU, P.; ROUGÉ, P.; PAYAN, F. (1996). Substrate mimicry in the active center of a mammalian α -amylase: structural analysis of an enzyme-inhibitor complex. *Structure*, 4: 1441- 1452.
- BÖSS, F.; PLEISS, J. (2008). Conserved water molecules stabilize the Ω -loop in class A β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 52: 1072-1079.
- BOUCHÉ, N.; FROMM, H. (2004). GABA in plants: just a metabolite? *TRENDS Plant Sci.*, 9: 110-115.
- BOUCKAERT, J.; HAMELRYCK, T.; WYNS, L.; LORIS, R. (1999). Novel structures of plant lectins and their complexes with carbohydrates. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 9: 572-577.
- BOWLES, D.J.; MARCUS, S.E.; PAPPIN, D.J.; FINDLAY, J.B.; ELOIPOULOS, E.; MAYCOX, P.R.; BURGESS, J. (1986). Posttranslational processing of concanavalin A precursors in jack bean cotyledons. *J. Cell Biol.*, 102: 1284-1297.
- BOWN, A.W.; HALL, D.E.; MACGREGOR, K.B. (2002). Insect footsteps on leaves stimulate the accumulation of 4-aminobutyrate and can be visualized through increased chlorophyll fluorescence and superoxide production. *Plant Physiol.*, 129: 1430-1434.
- BOWN, A.W.; MACGREGOR, K.B.; SHELP, B.J. (2006). Gamma-aminobutyrate: defense against invertebrate pests? *TRENDS Plant Sci.*, 11: 424-427.
- BOYD, W.C.; SHAPLEIGH, E. (1954). Specific precipitation activity of plant agglutinins (lectins). *Science*, 119: 419.

- BREWIN, N.J.; KARDAILSKY, I.V. (1997). Legume lectins and nodulation by *Rhizobium*. *Trends Plant Sci.*, 2: 92-98.
- BROEKAERT, W.F.; VAN PARIJS, J.; LEYNS, F.; JOOS, H.; PEUMANS, W.J. (1989). A chitin-binding lectin from stinging nettle rhizomes with antifungal properties. *Science*, 245: 1100-1102.
- BUKOWSKA, M.A.; GRÜTTER, M.G. (2013). New concepts and aids to facilitate crystallization. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 23: 1-8.
- CANNIZZARO, C.E.; HOUK, K.N. (2002). Magnitudes and chemical consequences of R3N⁺ - C-H---O=C hydrogen bonding. *J. Am. Chem. Soc.*, 124: 7163-7169.
- CARRINGTON, D.M.; AUFFRET, A.; HANKE, D.E. (1985). Polypeptide ligation occurs during post-translational modification of concanavalin A. *Nature*, 313: 64-67.
- CAVADA, B.S.; BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; GRANGEIRO, T.B.; BARRAL-NETO, M. (2001). Revisiting proteus: do minor changes in lectin structure matter in biological activity. Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. *Curr. Protein Pep. Sci.*, 2: 123-135.
- CHAN, A.W.E.; HUTCHINSON, E.G.; HARRIS, D.; THORTON, J.M. (1993). Identification, classification, and analysis of beta-bulges in proteins. *Protein Sci.*, 2: 1574-1590.
- CHOI, J.; CHOI, D.; LEE, S.; RYU, CM.; HWANG, I. (2011). Cytokinins and plant immunity: old foes or new friends? *TRENDS Plant Sci.*, 16: 388-394.
- COHEN, Y.; NIDERMAN, T.; MÖSINGER, E.; FLUHR, R.; (1994). β -aminobutyric acid induces accumulation of pathogenesis-related proteins in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) plants and resistance to late blight infection caused by *Phytophthora infestans*. *Plant Physiol.*, 104: 59-66.
- COHEN, Y.R. (2002). β -aminobutyric acid-induced resistance against plant pathogens. *Plant Disease*, 86: 448-457.
- COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT, NUMBER 4. (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr.*, D50: 760-763.
- DAM, T.K.; CAVADA, B.S.; GRANGEIRO, T.B.; SANTOS, C.F.; CECATTO, V.M.; SOUSA, F.A.M.; OSCARSON, F.; BREWER, C.F. (2000). Thermodynamic binding studies of lectins from the diocleinae subtribe to deoxy analogs of the core trimannoside of asparagine-linked oligosaccharides. *J. Biol. Chem.*, 275: 16119-16126.
- DAM, T.K.; CAVADA, B.S.; GRANGEIRO, T.B.; SANTOS, C.F.; SOUSA, F.A.M.; OSCARSON, F.; BREWER, C.F. (1998). Diocleinae lectins are a group of proteins with conserved binding sites for the core trimannoside of asparagine-linked oligosaccharides and differential specificities for complex carbohydrates. *J. Biol. Chem.*, 273: 12082-12088.
- DANLEY, D.E. (2006). Crystallization to obtain protein-ligand complexes for structure-aided drug design. *Acta Cryst.*, D62: 569-575.
- DELATORRE, P.; ROCHA, B.A.M.; GADELHA, C.A.A.; SANTI-GADELHA, T.; CAJAZEIRAS, J.B.; SOUZA, E.P.; NASCIMENTO, K.S.; FREIRE, V.N.; SAMPAIO, A.H.;

- AZEVEDO Jr., W.F.; CAVADA, B.S. (2006). Crystal structure of a lectin from *Canavalia maritima* (ConM) in complex with trehalose and maltose reveals relevant mutation in ConA-like lectins. *J. Struct. Biol.*, 154: 280-286.
- DE BOECK, H.; LOONTIENS, F.G.; LIS, H.; SHARON, N. (1984). Binding of simple carbohydrates and some *N*-acetylglucosamine-containing oligosaccharides to *Erythrina cristagalli* agglutinin as followed with a fluorescent indicator ligand. *Arch. Biochem. Biophys.*, 234: 297-304.
- DELATORRE, P.; ROCHA, B.M.; SOUZA, E.P.; OLIVEIRA, T.M.; BEZERRA, G.A.; MORENO, F.B.M.B.; FREITAS, B.T.; SANTI-GADELHA, T.; SAMPAIO, A.H.; AZEVEDO JR, W.F.; CAVADA, B.S. (2007). Structure of a lectin from *Canavalia gladiata* seeds: new structural insights for old molecules. *BMC Struct. Biol.*, 7: 52-60.
- DELATORRE, P.; SILVA-FILHO, J.C.; ROCHA, B.A.M.; SANTI-GADELHA, T.; NÓBREGA, R.B.; GADELHA, C.A.A.; NASCIMENTO, K.S.; NAGANO, C.S.; SAMPAIO, A.H.; CAVADA, B.S. (2013). Interactions between indole-3-acetic acid (IAA) with a lectin from *Canavalia maritima* seeds reveal a new function for lectins in plant physiology. *Biochimie*, xxx (xxx): 1-7.
- DERVINIS, C.; FROST, C.J.; LAWRENCE, S.D.; NOVAK, N.G.; DAVIS, J.M. (2010). Cytokinin primes plant responses to wounding and reduces insect performance. *J. Plant Growth Regul.*, 29: 289-296.
- DINH, S.T.; BALDWIN, I.T.; GALIS, I. (2013). The herbivore elicitor-regulated1 (HER1) gene enhances abscisic acid levels and defense against herbivores in *Nicotiana attenuata* plants. *Plant Physiol.*, doi: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.113.221150>.
- DODD, R.B.; DRICKAMER, K. (2001). Lectin-like proteins in model organisms: implications for evolution of carbohydrate-binding activity. *Glycobiology*, 11: 71R-79R.
- DRICKAMER, K. (1988). Two distinct classes of carbohydrate-recognition domain in animal lectins. *J. Biol. Chem.*, 263: 9557-9560.
- EDELMAN, G.M.; CUNNINGHAM, B.A.; REEKE, G.N., Jr; BECKER, J.W.; WAXDAL, M.J.; WANG, J.L. (1972). The covalent and three-dimensional structure of Concanavalin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 69: 2580-2584.
- EDELMAN, G.M.; WANG, J.L. (1978). Binding and Functional Properties of Concanavalin-A and Its Derivatives. 3. Interactions with Indoleacetic-Acid and Other Hydrophobic Ligands. *J. Biol. Chem.*, 253: 3016-3022.
- EMSLEY, P.; LOHKAMP, B.; SCOTT, W.G.; COWTAN, K. (2010). Features and development of coot. *Acta Crystallogr.*, D66: 486-501.
- ERB, M.; TON, J.; DEGENHARDT, J.; TURLINGS, C.J. (2008). Interactions between arthropod-induced aboveground and belowground defenses in plants. *Plant Physiol.*, 146: 867-874.
- ERB, M.; MELDAU, S.; HOWE, G.A. (2012). Role of phytohormones in insect-specific plant reactions. *TRENDS in Plant Science*, 17: 250-259.
- ETZLER, M.E. (1985). Plant lectins: molecular and biological aspects. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 36: 209-234.

- ETZLER, M.E. (1994). Isolation and characterization of subunits of DB58, a lectin from the stems and leaves of *Dolichos biflorus*. *Biochemistry*, 33: 9778-9783.
- FERREIRA, R.R.; CAVADA, B.S.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.A.; GOMES, J.G. (1996). Characteristics of the histamine release from ramster cheek pouch mast cells stimulated by lectins from Brazilian beans and concanavalin A. *Inflamm. Res.*, 45: 442-447.
- FITCHES, E.; WOODHOUSE, S.D.; EDWARDS, J.P.; GATEHOUSE, J.A. (2001). In vitro and in vivo binding of snowdrop (*Galanthus nivalis* agglutinin; GNA) and jackbean (*Canavalia ensiformis*; ConA) lectins with tomato moth (*Lacanobia oleracea*) larvae; mechanisms of insecticidal action. *J. Insect Physiol.*, 47: 777-787.
- FOUGÈRE, F.; LE RUDULIER, D.; STREETER, J.G. (1991). Effects of salt stress on amino acid, organic acid, and carbohydrate composition of roots, bacteroids, and cytosol of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol.*, 96: 1228-1236.
- FRAIRE-VELÁZQUEZ, S.; RODRÍGUEZ-GUERRA, R.; SÁNCHEZ-CALDERÓN, L. (2011). Abiotic and biotic stress response crosstalk in plants. In *Abiotic stress response in plants – Physiological, Biochemical and Genetic Perspectives*. Prof. Arun Shanker (Ed.). ISBN: 978-953-307-672-0.
- FREY, M.; STETTNER, C.; PARÉ, P.W.; SCHMELZ, E.A.; TUMLINSON, J.H.; GIERL, A. (2000). An herbivore elicitor activates the gene for indole emission in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 14801-14806.
- FUJITA, M.; FUJITA, Y.; NOUTOSHI, Y.; TAKAHASHI, F.; NARUSAKA, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. (2006). Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 9: 536-442.
- GADELHA, C.A.A.; MORENO, F.B.M.B.; SANTI-GADELHA, T.; CAJAZEIRAS, J.B.; ROCHA, B.A.M.; RUSTIGUEL, J.K.R.; FREITAS, B.T.; CANDURI, F.; DELATORRE, P.; AZEVEDO Jr, W.F.; CAVADA, B.S. (2005a). Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a lectin from *Canavalia maritima* seeds. *Acta Crystallogr.* F61, 87-89.
- GADELHA, C.A.A.; MORENO, F.B.M.B.; SANTI-GADELHA, T.; CAJAZEIRAS, J.B.; ROCHA, B.A.M.; ASSREUY, A.M.S.; MOTA, M.R.L.; PINTO, N.V.; MEIRELES, A.V.P.; BORGES, J.C.; FREITAS, B.T.; CANDURI, F.; SOUZA, E.P.; DELATORRE, P.; CRIDDLE, D.N.; AZEVEDO Jr., W.F.; CAVADA, B.S. (2005b). Native crystal structure of a nitric oxide-releasing lectin from seeds of *Canavalia maritima*. *J. Struct. Biol.*, 152: 185-194.
- GARCÍA-MUNIZ, N.; MARTÍNEZ-IZQUIERDO, J.A.; PUIGDOMÈNECH, P. (1998). Induction of mRNA accumulation corresponding to a gene encoding a cell wall hydroxyproline-rich glycoprotein from fungal elicitors. *Plant Mol. Biol.*, 38: 623-632.
- GEGG, C.V.; ROBERTS, D.D.; SEGEL, I.H.; ETZLER, M.E. (1992). Characterization of the adenine binding sites of two *Dolichos biflorus* lectins. *Biochemistry*, 31: 6938-6942.
- GEGG, C.V.; ETZLER, M.E. (1994). Photoaffinity labeling of the adenine binding sites of two *Dolichos biflorus* lectins. *J. Biol. Chem.*, 269: 5687-5692.

- GIRON, D.; FRAGO, E.; GLEVAREC, G.; PIETERSE, C.M.J.; DICKE, M. (2013). Cytokinins as key regulators in plant-microbe-insect interactions: connecting plant growth and defence. *Funct. Ecol.*, 27: 599-609.
- GOMES, J.C.; FERREIRA, R.R.; CAVADA, B.S.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.A. (1994). Histamine release induced by glucose (mannose)-specific lectins isolated from Brazilian beans. Comparison with Concanavalin A. *Agent Actions*, 41: 132-135.
- GOODSELL, D.S. (2010). Concanavalin A and circular permutation. *RSCB PDB Molecule of the Month* (www.pdb.org) doi: 10.2210/rcsb_pdb/mom_2010_4.
- GU, Y.; KAR, T.; SCHEINER, S. (1999). Fundamental properties of the CH---O interaction: is it a true hydrogen bond? *J. Am. Chem. Soc.*, 121: 9411-9422.
- HAMELRYCK, T.W.; LORIS, R.; BOUCKAERT, J.; DAO-THI, M.H.; STRECKER, G.; IMBERTY, A.; FERNANDEZ, E.; WYNS, L.; ETZLER, M.E. (1999). Carbohydrate binding, quaternary structure and a novel hydrophobic binding site in two legume lectin oligomers from *Dolichos biflorus*. *J. Mol. Biol.*, 286: 1161-1177.
- HARDMAN, K.D.; AINSWORTH, C.F. (1972). Structure of Concanavalin A at 2.4-Å resolution. *Biochemistry*, 11: 4910-4919.
- HARDMAN, K.D.; AINSWORTH, C.F. (1973). Binding of nonpolar molecules by crystalline Concanavalin A. *Biochemistry*, 12: 4442-4448.
- HASSEL, A.M.; AN, G.; BLEDSOE, R.K.; BYNUM, J.M.; CARTER III, H.L.; DENG, S.J.J.; GAMPE, R.T.; GRISARD, T.E.; MADAUSS, K.P.; NOLTE, R.T.; ROCQUE, W.J.; WANG, L.; WEAVER, K.L.; WILLIAMS, S.P.; WISELY, G.B.; XU, R.; SHEWCHUK, L.M. (2007). Crystallization of protein-ligand complexes. *Acta Cryst.*, D63: 72-79.
- HELLIWELL, J.R. (1992). Macromolecular crystallography with synchrotron radiation. Cambridge University Press.
- HEMPERLY, J.J.; MOSTOV, K.E.; CUNNINGHAM, B.A. (1982). *In vitro* translation and processing of a precursor of favin, a lectin from *Vicia faba*. *J. Biol. Chem.*, 257: 7903-7909.
- HERMS, D.A.; MATTSON, W.J. (1992). The dilemma of plants: to grow or defend. *The Quarterly Review of Biology*, 67: 283-335.
- HIGGINS, T.J.V.; CHANDLER, P.M.; ZURAWASKI, G.; BUTTON, S.C.; SPENCER, D. (1983). The biosynthesis and primary structure of pea seed lectin. *J. Bio. Chem.*, 258: 9544-9549.
- HIRSCH, A.M. (1999). Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2: 320-326.
- HODGE, S.; WARD, J.L.; BEALE, M.H.; BENNETT, M.; MANSFIELD, J.W.; POWELL, G. (2013). Aphid-induced accumulation of trehalose in *Arabidopsis thaliana* is systemic and dependent upon aphid density. *Planta*, 237: 1057: 1064.
- HOROWITZ, S.; TRIEVEL, R. (2012). Carbon-oxygen bonding in biological structure and function. *J. Biol. Chem.*, 287: 41576-41582.

- HOWE, G.A.; JANDER, G. (2008). Plant immunity to insect herbivores. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59: 41-66.
- HUANG, T.; JANDER, G.; DE VOS, M. (2011). Non-protein amino acids in plant defense against insect herbivores: representative cases and opportunities for further functional analysis. *Phytochemistry*, 72: 1531-1537.
- HUFFAKER, A.; PEARCE, G.; VEYRAT, N.; ERB, M.; TURLINGS, T.C.J.; SARTOR, R.; SHEN, Z.; BRIGGS, S.P.; VAUGHAN, M.M.; ALBORN, H.T.; TEAL, P.E.A.; SCHMELZ, E.A. (2013). Plant elicitor peptides are conserved signals regulating direct and indirect antiherbivore defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110: 5707-5712.
- HUTCHINSON, E.G.; THORTON, J.M. (1994). A revisited set of potentials for β -turn formation in proteins. *Protein Sci.*, 3: 2207-2216.
- IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. (1974). Abbreviations and symbols for description of conformation of polypeptide chains. ButterWorths, London.
- JACKES, A.V.; RIEGER, D.K.; MAESTRI, M.; LOPES, M.W.; PERES, T.V.; GONÇALVES, F.M.; PEDRO, D.Z.; TASCA, C.I.; LÓPEZ, M.G.; EGEA, J.; NASCIMENTO, K.S.; CAVADA, B.S.; LEAL, R.B. (2013). Lectin from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) protects hippocampal slices against glutamate neurotoxicity in a manner dependent of PI3K/Akt pathway. *Neurochem. Internat.*, 62: 836-842.
- JAIN, A.N. (2006). Scoring functions for protein-ligand docking. *Curr. Protein Pep. Sci.*, 7: 407-420.
- JANCARIK, J.; KIM, S.H. (1991). Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *J. Appl. Cryst.*, 24: 409-411.
- JANZEN, D.H.; JUSTER, H.B.; LIENER, I.E. (1976). Insecticidal action of the phytohemagglutinin in black beans on a bruchid beetle. *Science*, 192, 795-796.
- JIANG, J.; FAN, L.W.; WU, W.H. (2005). Evidences for involvement of endogenous cAMP in Arabidopsis defense responses to *Verticillium* toxins. *Cell Res.*, 15: 585-592.
- KABASCH, W.; SANDER, C. (1983). Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*, 22: 2577-2637.
- KANELLOPOULOS, P.N. (1996). The crystal structure of the complexes of Concanavalin A with 4'-nitrophenil- α -D-mannopyranoside and 4'-nitrophenil- α -D-glucopyranoside. *J. Struc. Biol.*, 116: 345-355.
- KAUSHIK, S.; MOHANTY, D.; SUROLIA, A. (2009). The role of metal ions in substrate recognition and stability of Concanavalin A: a molecular dynamics study. *Biophys. J.*, 96: 21-34.
- KENNEDY, J.F.; PALVA, P.M.G.; CORELLA, M.T.S.; CAVALCANTI, M.S.M.; COELHO, S.B.B. (1995). Lectins, versatile proteins of recognition: a review. *Carbohydrate Polymers*, 26: 219-230.
- KESSLER, A.; BALDWIN, I.T. (2002). Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 53: 299-328.

- KLEYWEGT, G.J. (2007). Crystallographic refinement of ligand complexes. *Acta Cryst.*, D63: 94-100.
- KOMATH, S.S.; KAVITHA, M.; SWAMY, M.J. (2006). Beyond carbohydrate binding: new directions in plant lectin research. *Org. Biomol. Chem.*, 4: 973-988.
- KRAUSPENHAAR, R.; RYPNIEWSKI, W.; KALKURA, N.; MOORE, K.; DE LUCAS, L.; STOEVA, S.; MIKHAILOV, A.; BOELTER, W.; BETZEL, C. (2002). Crystallization under microgravity of mistletoe lectin I from *Viscum album* with adenine monophosphate and the crystal structural at 1.9 Å resolution. *Acta Crystallogr.*, D58: 1704-1707.
- LATTMANN, E.E.; LOLL, P.J. (2008). Protein crystallography: a concise guide. The John Hopkins University Press.
- LAURIE, A.T.; JACKSON, R.M. (2005). Q-sitefinder: an energy-based method for the prediction of protein-ligand binding sites. *Bioinformatics*, 21: 1908-1916.
- LENGAUER, T.; RAREY, M. (1996). Computational methods for biomolecular docking. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 6: 402-406.
- LI, H.; ROBERTSON, A.D.; JENSEN, J.H. (2005). Very fast empirical prediction and rationalization of protein pKa values. *Proteins: Struct. Funct. Bioinform.*, 61: 704-721.
- LIS, H.; SHARON, N. (1998). Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chem. Rev.*, 98: 637-674.
- LORIS, R.; MAES, D.; POORTMANS, F.; WYNS, L.; BOUCKAERT, J. (1996). A structure of the complex between Concanavalin A and Methyl-3,6-di-O-(α -D-mannopyranosyl)- α -D-mannopyranoside reveals two binding modes. *J. Biol. Chem.*, 271: 30614-30618.
- LORIS, R.; HAMELRYCK, T.; BOUCKAERT, J.; WYNS, L. (1998). Legume lectin structure. *Biochim. Biophys. Acta*, 1383: 9-36.
- LÜ, X.; HAN, SC.; LI, LY.; GRENIER, S.; DE CLERCQ, P. (2012). The potential of threulose to replace insect hemolymph in artificial media for *Trichogramma dendrolimi* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Insect Sci.*, 00: 1-8.
- MA, W.; QI, Z.; SMIGEL, A.; WALKER, R.K.; VERMA, R.; BERKOWITZ, G.A. (2009). Ca²⁺, cAMP, and transduction of non-self perception during plant immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106: 20995-21000.
- MADDEN, D.R. (2002). The structure and function of glutamate receptor ion channels. *Nat. Rev. Neurosci.*, 3: 91-101.
- MALECKI, P.H.; RYPNIEWSKI, W.; SZYMAŃSKI, M.; BARCISZEWSKI, J.; MEYER, A. (2012). Binding of the plant hormone kinetin in the active site of Mistletoe lectin I from *Viscum album*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1824: 334-338.
- MALIARIK, M.J.; GOLDSTEIN, I.J. (1988). Photoaffinity labeling of the adenine binding site of the lectins from lima bean, *Phaseolus lunatus*, and the kidney bean, *Phaseolus vulgaris*. *J. Biol. Chem.*, 263: 11274-11279.

- MANDADI, K.K.; SCHOLTHOF, K.B.G. (2013). Plant immune responses against viruses: how does a virus cause disease? *Plant Cell*, 25: 1489-1505.
- MANDAL, D.K.; NIEVES, E.; BHATTACHARYYA, L.; ORR, J.A.; ROBOZ, J.; YU, K.-T.; BREWER, C.F. (1994). Purification and characterization of three isolectins of soybean agglutinin. Evidence for C-terminal truncation by electrospray ionization mass spectrometry. *Eur. J. Biochem.*, 221: 547-553.
- MANOJ, N.; SUGUNA, K. (2001). Signature of quaternary structure in the sequences of legume lectins. *Protein Engineering*, 14: 735-745.
- MARTIN, S.F.; CLEMENTS, J.H. (2013). Correlating structure and energetic in protein-ligand interactions: paradigms and paradoxes. *Annu. Rev. Biochem.*, 82: 267-293.
- McCORMICK, A.C.; UNSICKER, S.B.; GERSHENZON, J. (2012). The specificity of herbivory-induced plant volatiles in attracting herbivore enemies. *TRENDS Plant Sci.*, 17: 303-310.
- MEREWITZ, E.B.; DU, H.; YU, W.; LIU, Y.; GIANFAGNA, T.; HUANG, B. (2012). Elevated cytokinin content in *ipt* transgenic creeping bentgrass promotes drought tolerance through regulating metabolite accumulation. *J. Exp. Bot.*, 63: 1315-1328.
- MEYER, A.; RYPNIEWSKI, W.; SZYMAŃSKI, M.; VOELTER, W.; BARCISZEWSKI, J.; BETZEL, C. (2008). Structure of mistletoe lectin I from *Viscum Album* in complex with the phytohormone zeatin. *Biochim. Biophys. Acta*, 1784: 1590-1595.
- MICHIELS, K.; VAN DAMME, E.J.M.; SMAGGHE, G. (2010). Plant-insect interactions: what can we learn from plant lectins? *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 73: 193-212.
- MILLER, C.O.; SKOOG, F.; VON SALTZA, M.H.; STRONG, F.M. (1955). Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *J. Am. Chem. Soc.*, 77: 1392.
- MILNER-WHITE, E.J. (1990) Situations of gamma-turns in proteins. Their relation to alpha-helices, beta-sheets and ligand binding sites. *J. Mo. Biol.*, 216: 385-397.
- MIN, W.; DUNN, A.J.; JONES, D.H. (1992). Non-glycosylated recombinant pro-concanavalin A is active without polypeptide cleavage. *EMBO J.*, 11: 1303-1307.
- MITEVA, M.A.; TUFFÉRY, P.; VILLOUTREIX, B.O. (2005). PCE: web tools to compute protein continuum electrostatics. *Nucleic Acids Res.*, 33: W372-W375.
- MIRKOV, T.E.; WAHLSTROM, J.M.; HAGIWARA, K.; FINARDI-FILHO, F.; KJEMTRUP, S.; CHRISPEELS, M.J. (1994). Evolutionary relationship among proteins in the phytohemagglutinin-arcelin- α -amylase inhibitor family of the common bean and its relatives. *Plant Mol. Biol.*, 26 (4), 1103-1113.
- MOOTHO, D.N.; CANAN, B.; FIELD, R.A.; NAISMITH, J.H. (1999). Man α 1-2 Man α -OMe-concanavalin A complex reveals a balance of forces involved in carbohydrate recognition. *Glycobiology*, 9: 539-545.
- MOREIRA, R.A.; CORDEIRO, E.F.; CAVADA, B.S.; NUNES, E.P.; FERNANDES, A.G. & OLIVEIRA, J.T.A. (1995). Lectins and the chemotaxonomy of the sub-tribe Diocleinae (*Leguminosae* – *Phaseolae*). *R. Bras. Fisiol. Veg.*, 7: 7-14.

- MURDOCK, L.L.; SHADE, R.E. (2002). Lectins and protease inhibitors as plant defenses against insects. *J. Agric. Food Chem.*, 50: 6605-6611.
- MURSHUDOV, G.N.; SKUBÁK, P.; LEBEDEV, A.A.; PANNU, N.S.; STEINER, R.A.; NICHOLLS, R.A.; WINN, M.D.; LONG, F.; VAGIN, A.A. (2011). *REFMAC5* for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr.*, D67: 355-367.
- NAGANO, C.S.; CALVETE, J.J.; BARETTINO, D. PÉREZ, A.; CAVADA, B.S.; SANZ, L. (2008). Insights into the structural basis of the pH-dependent dimer-tetramer equilibrium through crystallographic analysis of recombinant *Diocleinae* lectins. *Biochem. J.*, 409: 417-428.
- NAISMITH, J.H.; FIELD, R.A. (1996). Structural basis of trimannoside recognition by Concanavalin A. *J. Biol. Chem.*, 271: 972-976.
- NEILSON, E.H.; GOODGER, J.Q.D.; WOODROW, I.E.; MØLLER, B.L. (2013). Plant chemical defense: at what cost? *TRENDS in Plant Science*, 18 (5): 250-258.
- NÓBREGA, R.B.; ROCHA, B.A.M.; GADELHA, C.A.A.; SANTI-GADELHA, T.; PIRES, A.F.; ASSREUY, A.M.S.; NASCIMENTO, K.S.; NAGANO, C.S.; SAMPAIO, A.H.; CAVADA, B.S.; DELATORRE, P. (2012). Structure of *Dioclea virgata* lectin: relations between carbohydrate binding site and nitric oxide production. *Biochimie*, 94: 900-906.
- NOWELL, P.C. (1960). Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in culture of animal and human leukocytes. *Cancer Res.*, 20: 462-466.
- OLIVEIRA, T.M.; DELATORRE, P.; ROCHA, B.A.M.; SOUZA, E.P.; NASCIMENTO, K.S.; BEZERRA, G.A.; MOURA, T.R.; BENEVIDES, R.G.; BEZERRA, E.H.S.; MORENO, F.B.M.B.; FREIRE, V.N.; AZEVEDO Jr., W.F.; CAVADA, B.S. (2008). Crystal structure of *Dioclea rostrata* lectin: insights into understanding the pH-dependent dimer-tetramer equilibrium and the structural basis for carbohydrate recognition in *Diocleinae* lectins. *J. Struct. Biol.*, 164: 177-182.
- OSBORN, T.C.; ALEXANDER, D.C.; SUN, S.S.M.; CARDONA, C.; BLISS, F.A. (1988). Insecticidal activity and lectin homology of arcelin seed protein. *Science*, 240: 207-210.
- PAIVA, P.M.G.; NAPOLEÃO, T.H.; SÁ, R.A.; COELHO, L.C.B.B. (2012). Insecticide activity of lectins and secondary metabolites. In *Insecticides – Advances in integrated pest management*, Dr. Farzana Perveen (Ed.). ISBN: 978-953-307-780-2.
- PALANIVELU, R.; BRASS, L.; EDLUND, A.F.; PREUSS, D. (2003). Pollen tube growth and guidance is regulated by *POP2*, an *Arabidopsis* gene that controls GABA levels. *Cell*, 114: 47-59.
- PARÉ, P.W.; TUMLINSON, J.H. (1999). Plant volatiles as a defense against insect herbivores. *Plant Physiol.*, 121: 325-331.
- PARK, SW.; VEPACHEDU, R.; SHARMA, N.; VIVANCO, J.M. (2004). Ribosome-inactivating proteins in plant biology. *Planta*, 219: 1093-1096.
- PAVONE, V.; GAETA, G.; LOMBARDI, A.; NASTRI, F.; MAGLIO, O.; ISERNIA, C.; SAVIANO, M. (1996). Discovering protein secondary structures: classification and description of isolated α -turns. *Biopolymers*, 38: 705-721.

- PEREZ, G.; PEREZ, C.; CAVADA, B.S.; MOREIRA, R.; RICHARDSON, M. (1991). Comparison of the amino acid sequences of the lectins from seeds of *Dioclea lehmanni* and *Canavalia maritima*. *Phytochemistry*, 30: 2619-2621.
- PETUKHOV, M.; RYCHKOV, G.; FIRSOV, L.; SERRANO, L. (2004). H-bonding in protein hydration revisited. *Protein Sci.*, 13: 2120-2129.
- PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, J.M. (1995). Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol.*, 109: 347-352.
- PEUMANS, W.J.; HAO, Q.; VAN DAMME, E.J.M. (2001). Ribosome-inactivating proteins from plants: more than RNA N-glycosidases?. *The FASEB Journal*, 15, 1493-1506.
- POWELL, H.R.; JOHNSON, O.; LESLIE, A.G.W. (2013). Autoindexing diffraction images with iMosflm. *Acta Crystallogr.*, D69: 1195-1203.
- PIETERSE, C.M.J.; DICKE, M. (2007). Plant interactions with microbes and insects: from molecular mechanisms to ecology. *TRENDS in Plant Sci.*, 12: 564-569.
- PIETERSE, C.M.J.; LEON-REYS, A.; VAN der ENT, S.; VAN WEES, S.C.M. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat. Chem. Biol.*, 5: 308-316.
- PIETERSE, C.M.J.; VAN der DOES, D.; ZAMIOUDIS, C.; LEON-REYS, A.; VAN WEES, S.C.M. (2012). Hormonal modulation of plant immunity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 28: 489-521.
- PINTO, N.V.; CAVADA, B.S.; BRITO, L.F.; PEREIRA, R.I.; DA SILVA, M.T.L.; CASTRO, R.R.; PIRES, A.F.; ASSREUY, AM.S. (2013). Effects of *Canavalia* lectins on acute inflammation in sensitized and non-sensitized rats. *Inflammation*, 36: 713-722.
- PRABU, M.M.; SANKARANARAYANAN, R.; PURI, K.D.; SHARMA, V.; SUROLIA, A.; VIJAYAN, J.; SUGUNA, K. (1998). Carbohydrate specificity and quaternary association in basic winged bean lectin: X-ray analysis of the lectin at 2.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 276: 787-796.
- RAJASHANKAR, K.R.; RAMAKUMAR, S. (1996). π -turns in proteins and peptides: classification, conformation, occurrence, hydration and sequence. *Protein Science*, 5: 932-946.
- RAMOS, M.V.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.A.; CAVADA, B.S.; ROUGÉ, P. (1996). The carbohydrate-binding specificity and molecular modeling of *Canavalia maritima* and *Dioclea grandiflora* lectins. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 91: 761-766.
- RAMOS, M.V.; BELTRAMINI, L.M.; MOREIRA, R.A. (2001). Macromolecular properties of *Diocleinae* lectins. *Protein Pept. Lett.*, 8: 399-406.
- RAMPUTH, A.; BOWN, A.W. (1996). Rapid γ -aminobutyric synthesis and the inhibition of the growth and development of oblique-banded leaf-roller larvae. *Plant Physiol.*, 111: 1349-1352.
- RASMANN, S.; KÖLLNER, T.G.; DEGENHARDT, J.; HILTPOLD, I.; TOEPFER, S.; KUHLMANN, U.; GERSHENZON, J.; TURLINGS, T.C. (2005). Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. *Nature*, 434: 732-737.

- REEKE, G.N., Jr.; BECKER, J.W. (1986). Three-dimensional structure of favin: saccharide binding-cyclic permutation in leguminous lectins. *Science*, 234: 1108-1111.
- RHODES, D.; HANDA, S.; BRESSAN, R.A. (1986). Metabolic changes associated with adaptation of plant cell to water stress. *Plant Physiol.*, 82: 890-903.
- RICHARDSON, J.S.; GETZOFF, E.D.; RICHARDSON, D.C. (1978). The β bulge: a common small unit of nonrepetitive protein structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 2574-2578.
- RICHARDSON, J.S. (2007). The anatomy and taxonomy of protein structure. *Adv. Prot. Chem.*, 34: 167-339.
- RINI, J.M. (1995). Lectin structure. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 24: 551-577.
- RITCHIE, D.W.; KEMP, G.J.L. (2000). Protein docking using spherical polar Fourier correlations. *Proteins: Struct. Funct. Genet.*, 39: 178-189.
- ROBERT-SEILANIAN, A.; NAVARRO, L.; BARI, R.; JONES, J.D.G. (2007). Pathological hormone imbalances. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 10: 372-379.
- ROBERTS, D.D.; GOLDSTEIN, I.J. (1982). Hydrophobic binding properties of the lectin from lima beans (*Phaseolus lunatus*). *J. Biol. Chem.*, 257: 11274-11277.
- ROBERTS, D.D.; GOLDSTEIN, I.J. (1983). Binding of hydrophobic ligands to plant lectins: titration with arylaminonaphthalenesulphonates. *Arch. Biochem. Biophys.*, 224: 479-484.
- ROBERTS, D.D.; ARJUNAN, P.; TOWNSEND, L.B.; GOLDSTEIN, I.J. (1986). Specificity of adenine binding to lima bean lectin. *Phytochemistry*, 25: 589-593.
- ROSS, G. (2011). Water: the most important molecule in drug discovery. *STAAR – St Annes' Academic Review*, 3: 9-12.
- ROSSMANN, M.G. (1972). The molecular replacement method. Gordon and Breach, London.
- RUSSI, M.A.; VANDRESEN-FILHO, S.; RIEGER, D.K.; COSTA, A.P.; LOPES, M.W.; CUNHA, R.M.S.; TEIXEIRA, E.H.; NASCIMENTO, K.S.; CAVADA, B.S.; TASCA, C.I. & LEAL, R.B. (2012). ConBr, a lectin from *Canavalia brasiliensis* seeds, protects against quinolinic acid-induced seizures in mice. *Neurochem. Res.*, 37: 288-297.
- SANDERS, D.A.R.; MOOTHOO, D.N.; RAFTERY, J.; HOWARD, A.J.; HELLIWELL, J.R.; NAISMITH, J.H. (2001). The 1.2 Å resolution structure of the ConA-dimannose complex. *J. Mol. Biol.*, 310: 875-884.
- SANZ-APARICIO, J.; HERMOSO, J.; GRANGEIRO, T.B.; CALVETTE, J.J.; CAVADA, B.S. (1997). The crystal structure of *Canavalia brasiliensis* lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct biological properties from Concanavalin A. *FEBS Letters*, 405: 114-118.
- ŠAŠEK, V.; NOVÁKOVÁ, M.; DOBREV, P.I.; VALENTOVÁ, O.; BURKETOVÁ, L. (2012). β -aminobutyric acid protects *Brassica napus* plants from infection by *Leptosphaeria maculans*. Resistance induction or a direct antifungal effect? *Eur. J. Plant Pathol.*, 133: 279-289.

- SCHEINER, S. (2009). Identification of spectroscopic patterns of CH---O H-bonds in proteins. *J. Phys. Chem. B*, 113: 10421-10427.
- SCHEINER, S. (2011). Weak H-bonds. Comparisons of CH---O to NH---O in proteins and PH---N to direct P---N interactions. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 13: 13860-13872.
- SCHMÜLLING, T. (2004). Cytokinin. In *Encyclopedia of Biological Chemistry* (Eds. Lennarz, W.; Lane, M.D.). Academic Press/Elsevier Science.
- SELMAR, D.; KLEINWÄCHTER, M. (2013). Stress enhances the synthesis of secondary plant products: the impact of stress-related over-reduction on the accumulation of natural products. *Plant Cell Physiol.*, 54: 817-826.
- SENEAR, D.F.; TELLER, D.C. (1981). Effects of saccharide and salt binding on dimer-tetramer equilibrium of Concanavalin A. *Biochemistry*, 20: 3083-3091.
- SHARMA, V.; SUROLIA, A. (1997). Analyses of carbohydrate recognition by legume lectins: size of the combining site loops and their primary specificity. *J. Mol. Biol.*, 267: 433-445.
- SHARON, N.; LIS, H. (2004). History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, 14: 53R-62R.
- SHELDON, P.S.; BOWLES, D.J. (1992). The glycoprotein precursor of concanavalin A is converted in an active lectin by deglycosylation. *EMBO J.*, 11: 1297-1301.
- SHELP, B.J.; BOWN, A.W.; McLEAN, M.D. (1999). Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. *TRENDS Plant Sci.*, 4: 446-452.
- SHELP, B.J.; BOWN, A.W.; FAURE, D. (2006). Extracellular γ -aminobutyrate mediates communication between plants and other organisms. *Plant Physiol.*, 142: 1350-1352.
- SHIBUYA, N.; MINAMI, E. (2001). Oligosaccharide signalling for defense responses in plant. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 59: 223-233.
- SIEGRIST, J.; OROBER, M.; BUCHENAUER, H. (2000). β -aminobutyric acid-mediated enhancement of resistance in tobacco to tobacco virus depends on the accumulation of salicylic acid. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 56: 95-106.
- SIVILOTTI, L.; NISTRI, A. (1991). GABA receptor mechanisms in the central nervous system. *Prog. Neurobiol.*, 36: 35-92.
- SRINIVAS, V.R.; BHANUPRAKASH REDDY, G.; CHITTOR, N.R.; SWAMINATHAN, P.; MITRA, N.; SUROLIA, A. (2001). Legume lectin family, the "natural mutants of the quaternary state", provide insights into the relationship between protein stability and oligomerization. *Biochim. Biophys. Acta*, 1527: 102-111.
- STEINER, T.; DESIRAJU, G.R. (1998). Distinction between the weak hydrogen bond and the van der Waals interactions. *Chem. Commun.*, 8: 891-892.
- STOITSOVA, S.R.; BOTEVA, R.N.; DOYLE, R.J. (2003). Binding of hydrophobic ligands by *Pseudomonas aeruginosa* PA-I lectin. *Biochim. Biophys. Acta*, 1619: 213-219.

- TERRA, W.R. (2001). The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 47: 47-61.
- TON, J.; JAKAB, G.; TOQUIN, V.; FLORS, V.; IAVICOLI, A.; MAEDER, M.N.; MÉTRAUX, JP.; MAUCH-MANI, B. (2005). Dissecting the β -aminobutyric acid-induced priming phenomenon in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 17: 987-999.
- TSAI, MF.; MCCARTHY, P.; MILLER, C. (2013). Substrate selectivity in glutamate-dependent acid resistance in enteric bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1301444110.
- TUMA, P.L.; HUBBARD, A.L. (2003). Transcytosis: crossing cellular barriers. *Physiol. Rev.*, 83: 871-932.
- UNSICKER, S.B.; KUNERT, G.; GERSHENZON, J. (2009). Protective perfumes: the role of vegetative volatiles in plant defense against herbivores. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 12: 479-485.
- VAN HUIJSDUIJNEN, R.A.M.; ALBLAS, S.W.; DE RIJK, R.H.; BOL, F. (1986). Induction by salicylic acid of pathogenesis-related proteins and resistance to alfalfa mosaic virus infection in various plant species. *J. Gen. Virol.*, 67: 2135-2143.
- VAN POECKE, R.M.; DICKE, M. (2004). Indirect defense of plants against herbivores: using *Arabidopsis thaliana* as a model plant. *Plant Biol.*, 6: 387-401.
- VANDENBORRE, G.; SMAGGHE, G.; VAN DAMME, E.J.M. (2011). Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. *Phytochemistry*, 72: 1538-1550.
- VARELA, E.S.; LIMA, J.P.M.S.; GALDINO, A.S.; PINTO, L.S.; BEZERRA, W.M.; NUNES, E.P.; ALVES, M.A.O.; GRANGEIRO, T.B. (2004). Relationships in subtribe Diocleinae (Leguminosae; Papilionoidae) inferred from internal transcribed spacer sequences from nuclear ribosomal DNA. *Phytochemistry*, 65: 59-69.
- VARGIN, A.; TEPLYAKOV, A. (1997). *MOLREP*: an automated program for molecular replacement. *J. Appl. Cryst.*, 30: 1022-1025.
- VASCONCELOS, I.M.; OLIVERIA, J.T.A. (2004). Antinutritional properties of plant lectins. *Toxicon*, 44: 385-403.
- VDOVENKO, S.; GERUS, I.; FEDORENKO, E.; KUKHAR, V. (2013). C-H...F hydrogen bond and integral intensities of vinyl C-H vibrations in push-pull-dimethylaminotrifluoromethyl ketone and its deuterated analog. *ISRN Spectroscopy*. Hindawi Publishing Corporation.
- VENKATACHALAM, C.M. (1968). Stereochemical criteria for polypeptides and proteins. V. Conformation of a system of three linked peptide units. *Biopolymers*, 6: 1425-1436.
- VIJAYAN, M.; CHANDRA, N. (1999). Lectins. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 9: 707-714.
- VRANOVA, V.; REJSEK, K.; SKENE, K.R.; FORMANEK, P. (2011). Non-protein amino acids: plant, soil and ecosystem interactions. *Plant Soil*, 342: 31-48.

- WALLACE, W.; SECOR, J.; SCHRADER, L. (1984). Rapid accumulation of γ -aminobutyric acid and alanine in soybean leaves in response to an abrupt transfer to lower temperature, darkness, or mechanical manipulation. *Plant Physiol.*, 75: 170-175.
- WANG, J.L.; McCLAIN, D.A.; EDELMAN, G.M. (1975). Modulation of lymphocyte mitogenesis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 72: 1917-1921.
- WHAL, M.C.; SUNDARALINGAM, M. (1997). C-H---O hydrogen bonding in biology. *TIBS*, 22: 97-102.
- WINK, M. (1988). Plant breeding: importance on plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *Theor. Appl. Genet.*, 75: 225-233.
- YANG, D.C.H.; GALL, W.E.; EDELMAN, G.M. (1974). Rotational correlation time of Concanavalin A after interaction with a fluorescent probe. *J. Biol. Chem.*, 249: 7018-7023.
- YOUNG, N.M.; OOMEN, R.P. (1992). Analysis of sequence variation among legume lectins. A ring of hypervariable residues forms the perimeter of carbohydrate-binding sites. *J. Mol. Biol.*, 228: 924-934.
- YOUNG, N.M.; WATSON, D.C.; YAGUCHI, M.; ADAR, R.; ARANGO, R.; RODRIGUEZ-ARANGO, E.; SHARON, N.; BLAY, P.K.S.; THIBAUT, P. (1995). C-terminal post-translational proteolysis of plant lectins and their recombinant forms expressed in *Escherichia coli*. Characterization of "ragged ends" by mass spectrometry. *J. Biol. Chem.*, 270: 2563-2570.
- ZHUANG, X.; FIESSELMANN, A.; ZHAO, N.; CHEN, H.; FREY, M.; CHEN, F. (2012). Biosynthesis and emission of insect herbivory-induced volatile indole in rice. *Phytochemistry*, 73: 15-22.