

DEREK BARROSO HOLANDA ASP VIEIRA

**CRISTALIZAÇÃO E RESOLUÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA
LECTINA DE *Canavalia maritima* (CONM) COMPLEXADA COM O PRIMER DA
INTERLEUCINA - 1 BETA**

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

João Pessoa – PB

2014

DEREK BARROSO HOLANDA ASP VIEIRA

**CRISTALIZAÇÃO E RESOLUÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA
LECTINA DE *Canavalia maritima* (CONM) COMPLEXADA COM O PRIMER DA
INTERLEUCINA - 1 BETA**

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 parte dos requisitos para obtenção do título de **MESTRE EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

Orientador: Prof. Dr. Plínio Delatorre

João Pessoa - PB

2014

V658c Vieira, Derek Barroso Holanda Asp.

Cristalização e resolução da estrutura tridimensional da lectina de *Canavalia maritima* (ConM) complexada com o primer da interleucina - 1 Beta / Derek Barroso Holanda Asp Vieira.- João Pessoa, 2014.

120f. : il.

Orientador: Plínio Delatorre

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN

1. Biologia celular e molecular. 2. Lectinas. 3. *Canavalia maritima*. 4. Nucleotídeo. 5. Primer

UFPB/BC

CDU: 576+577.2(043)

DEREK BARROSO HOLANDA ASP VIEIRA

Dissertação de Mestrado avaliada em ____/ ____/ ____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Plínio Delatorre
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – Universidade Federal da
Paraíba
Orientador

Prof^a. Dr^a. Patrícia Maria Guedes Paiva
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia – Universidade Federal de
Pernambuco
Examinadora Externa

Prof^a. Dr^a. Tatiane Santi Gadelha
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – Universidade Federal da
Paraíba
Examinadora Interna

Prof. Dr. Clayton Zambeli Oliveira
Departamento de Biologia Molecular – Universidade Federal da Paraíba
Suplente

*Dedico este trabalho à minha fonte de Amor,
aos meus Pais.*

*São as nossas escolhas,
mais do que as nossas capacidades,
que mostram quem realmente somos.*

J. K. Rowling

AGRADECIMENTOS

Diante de tantos agradecimentos que são necessários, o primeiro e o principal de todos, é a Deus. Diante de tantos momentos ao longo desses dois anos, Ele foi o único que esteve comigo em todos os momentos: nas alegrias, nas tristezas, nas dificuldades e nas dúvidas. Tenho plena convicção de que se tive forças para estar escrevendo este texto, foi porque Ele fez possível. Junto a Ele agradeço à minha Santíssima, a qual sou devoto desde pequeno, por sempre ter-se feito presente em minha casa e minha família.

Gostaria de agradecer àqueles que representam o amor para mim, meus pais, Vanda Vieira e Nils Vieira. Agradeço do fundo do meu coração aos dois, por sempre estarem presentes na minha vida, por sempre se dedicarem para dar o melhor a mim e aos meus irmãos. Se hoje sou o que sou e estou onde estou, é graças ao ensinamento e a persistência deles. Agradeço aos meus irmãos, Camille e Edwin, por todos os momentos que sempre vivemos juntos, pelo cuidado que sempre tiveram pelo irmão caçula e por toda a preocupação que tiveram na construção desse trabalho, sem nem mesmo saber nada sobre biologia molecular. Agradeço ainda a todos os parentes da minha terra natal, Rio Grande do Sul, os quais sempre me desejam coisas boas e torcem pelo meu sucesso.

Agradeço a Universidade Federal da Paraíba, por ser minha “segunda casa” desde a graduação e pela oportunidade de adquirir conhecimentos nesta Instituição e aplicá-los na pesquisa científica. Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, agradeço imensamente por tudo o que aprendi, pela dedicação dos professores e funcionários. À CAPES, agradeço o auxílio financeiro dado ao longo desses dois anos.

Agradeço ao Prof. Dr. Plínio Delatorre, por ter sido meu orientador nos últimos 5 anos e ter transmitido muito conhecimento para mim. Agradeço pela sua paciência, especialmente neste trabalho, e por estar sempre disposto a me ajudar. À prof^a Dr^a Tatiane Santi Gadelha, por ter aceitado o convite para banca e por sempre estar disposta em ajudar e tirar dúvidas, tanto na sala de aula como nos corredores do departamento. À prof^a Dr^a Patrícia Maria Guedes Paiva, por também ter aceitado o convite para banca e ajudar na construção deste trabalho com as suas observações.

Aos demais professores do programa, muito obrigado por toda dedicação e transmissão de conhecimentos. Aos funcionários, gostaria de agradecer principalmente ao “Seu Bosco” por tantas vezes ter me socorrido na parte técnica e também à secretária Ludmilla, por sempre estar disposta a ajudar, ser muito prestativa e ter uma paciência enorme com todos.

Agradeço também ao pessoal do LBMEO. Ao Ronaldo, por em tão pouco tempo se mostrar tão prestativo, ajudado na parte de informática e sempre dando apoio e perguntando sobre o andamento do trabalho; Caetano, por sempre estar disposto a ajudar e transmitir seu grande conhecimento sobre os programas para resolução de estruturas, grande parte do que sei, foi graças a ele; Raphael, por estar sempre disposto a tirar as dúvidas, perguntar como anda o trabalho e dando dicas muito valiosas; Paulo Jota, desde a graduação sempre me ajudou nos experimentos e foi um grande parceiro, também muito importante para a realização deste trabalho.

Gostaria de agradecer também à turma do mestrado 2012.2, por todos os momentos que passamos juntos e das alegrias compartilhadas, principalmente com o pessoal da “granolagem” (Sandro, Isis, Rachel, Talita e Layanne), mas agradeço especialmente a Rachel e Isis, pois foi graças a elas que consegui iniciar esta etapa, passamos quatro meses estudando, abdicando de finais de semanas, todo o conteúdo para prova e se não fosse com elas não teria conseguido.

Agradeço aos meus amigos, Amri Máximo, Maria Gabriela, Tito Andrade, Pedro Luz, Patrícia Petraglia, Jordana Carvalho, Laerte Xavier, Cyntya Sousa, Elói Matias, Vinicius de Moraes, Larissa Medeiros, Camila Costa, Camila Lenbel, Neusa Kaline, Mayara Costa, Amanda Luziêk, Gilliany Fernandes e à todo pessoal do MD e EJC, pois são aqueles que estão sempre dispostos a ajudar, sempre presentes com uma palavra de conforto, com o apoio na hora do meu desespero, aqueles com quem compartilho minhas alegrias e que se preocuparam tanto quanto eu para concretização deste trabalho.

Por fim, quero agradecer a todos aqueles não mencionados aqui, mas que de certa forma contribuíram bastante para este trabalho e para a conclusão desta etapa.

RESUMO

Lectinas de leguminosas são historicamente reconhecidas como proteínas de ligação a carboidratos e essa propriedade é ligada à maioria das suas atividades biológicas, tais como pró e antiinflamatórias, apoptose e mecanismos mitogênicos. No entanto, vários estudos demonstraram a capacidade destas proteínas de se ligarem a diversos outros compostos, tais como fitohormônios e moléculas hidrofóbicas, embora a relevância biológica destas interações permaneça indefinida. Muitas reações biológicas envolvem a interação de proteínas com ácidos nucleicos e a interação da proteína com o DNA desempenha um papel chave em toda a regulação celular e das funções vitais. No presente trabalho relatamos a estrutura cristalina da ConM, uma lectina isolada de sementes de *Canavalia maritima*, em complexo com o primer da Interleucina – 1 β . Um cristal cúbico, pertencente ao grupo espacial F23, foi obtido através do método da difusão de vapor e submetido à difração de raios X. Na estrutura, o mapa de densidade eletrônica correspondente a quatro nucleotídeos do primer da interleucina-1 β foi encontrado na interface do dímero não-canônico. A estabilização dos nucleotídeos envolve pontes de hidrogênio e forças eletrostáticas com os aminoácidos His127, Ser110, Lys114, Ser190, Asp192, Thr194, His51 e Ser190. Com base nestes resultados cristalográficos e em uma simulação de docking molecular, é hipotetizado que a lectina pode funcionar como um fator de transcrição, o que poderia nos ajudar a entender algumas de suas atividades biológicas.

Palavras-chave: Lectinas, *Canavalia maritima*, Nucleotídeo, Primer.

ABSTRACT

Legume lectins are historically recognized as carbohydrate-binding proteins, and this property is roughly linked to the majority of their biological activities, such as pro and antiinflammatory processes, apoptosis and mitogenic mechanisms. However, several studies have demonstrated the capability of these proteins to bind diverse other compounds, such as phytohormones and hydrophobic molecules, although the biological relevance of these interactions remains elusive. Many biological reactions involve proteins interactions with nucleic acids and the protein interaction with DNA plays a key role in the cellular regulation and all vital functions. In the present work, it is reported the crystal structure of ConM, a lectin isolated from *Canavalia maritima* seeds, in complex with Interleukine – 1 β primer. A cubic crystal, belonging to the F23 space group, was obtained by the diffusion vapor method and submitted to X-ray diffraction. In the structure, an electron density map corresponding to four nucleotides from the interleukin-1 β primer was found in the interface of ConM non-canonical dimer. The nucleotides stabilization involves H-bonds and electrostatic forces with the amino acids His127, Ser110, Lys114, Ser190, Asp192, Thr194, His51 and Ser190. Based on these crystallographic results and in a molecular docking simulation, it is hypothesized that the lectin may function as a transcription factor, which could help us to understand some of their biological activities.

Keywords: Lectins, *Canavalia maritima*, Nucleotides, Primer.

LISTA DE ABREVIATURAS

Asp	Aspartato
His	Histidina
Lys	Lisina
Ser	Serina
Thr	Treonina

LISTA DE SIGLAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
IL-1β	Interleucina 1 Beta
ConM/AIA	Lectina de <i>Canavalia maritima</i> complexada com Ácido Indolacético
ConBn	Lectina de <i>Canavalia bonariensis</i>
ConBr	Lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i>
ConA	Lectina de <i>Canavalia ensiformes</i> ou Concanavalina A
ConG	Lectina de <i>Canavalia grandiflora</i>
ConM	Lectina de <i>Canavalia maritima</i> ou Concanavalina M
ConM/dinucleotide	Lectina de <i>Canavalia maritima</i> complexada com dinucleotídeo
ConM/IL-1β	Lectina de <i>Canavalia maritima</i> complexada com o primer da Interleucina 1 Beta
Dviol	Lectina de <i>Dioclea violacea</i>
Dvirg	Lectina de <i>Dioclea virgata</i>
PHA-E	Lectina de <i>Phaseolus vulgaris</i>
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral Alfa

LISTA DE SÍMBOLOS

Å	Ångström
CaCl₂	Cloreto de Cálcio
MnCl₂	Cloreto de Manganês
pH	Potencial Hidrogeniônico

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Interações lectina-carboidrato -----	18
Figura 2. Representação de aglutinação das hemácias pelas lectinas -----	19
Figura 3. Classificação das lectinas -----	19
Figura 4. Monômero da ConA -----	23
Figura 5. Estrutura do DNA -----	25
Figura 6. Retículo cristalino e cela unitária -----	28
Figura 7. Diagrama de fases para cristalização de macromoléculas -----	30
Figura 8. Técnicas de difusão de vapor -----	32
Figura 9. Placa de cristalização -----	32
Figura 10. Ilustração do método da gota suspensa -----	33
Figura 11. Geração de um padrão de difração-----	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sistemas cristalográficos	29
--	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO -----	16
1.1 Lectinas -----	17
1.1.1 Lectinas de plantas -----	20
1.1.2 Lectinas de leguminosas -----	21
1.1.3 Concanavalina M (ConM) -----	22
1.1.3 Lectinas e algumas atividades biológicas -----	24
1.1.3.1 Complexo lectina-DNA -----	24
1.1.3.2 Lectinas e ações inflamatórias -----	25
1.1.3.3 Lectinas mitogênicas-----	26
1.2 Cristalografia por difração de raios X -----	27
1.2.1 Cristalização -----	27
1.2.2 Método da difusão de vapor -----	31
1.2.4 Cocristalização -----	33
1.2.5 Difração de raios X -----	34
2. OBJETIVOS -----	36
2.1 Objetivo geral -----	37
2.2 Objetivos específicos -----	37
3. RESULTADOS -----	38
4. CONCLUSÕES -----	101
5. REFERÊNCIAS -----	103
6. ANEXOS -----	110

1. Introdução

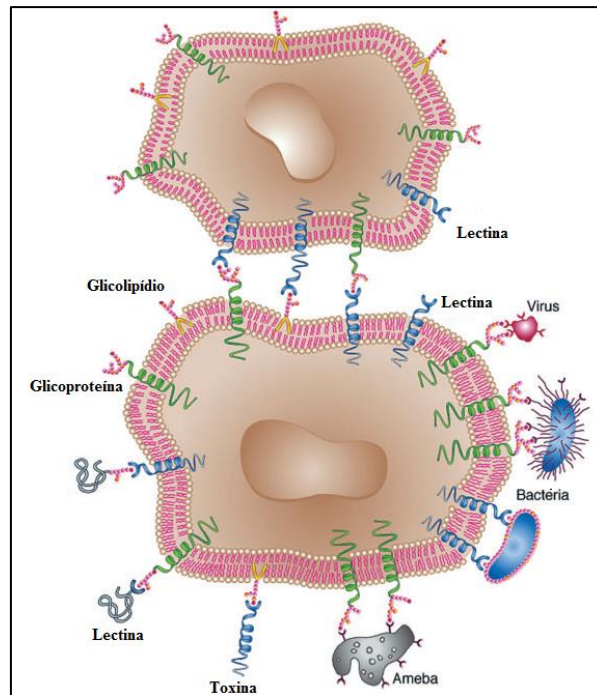
1.1 Lectinas

Proteínas que são capazes de interagir com carboidratos encontram-se distribuídas nas mais diversas formas de vida e reações. Um exemplo dessas proteínas são as lectinas, que cada vez mais vem ganhando destaque no mundo científico devido às suas características, propriedades, funções e importância. No final do século XIX havia evidências de proteínas que eram capazes de aglutinar eritrócitos, característica que as denominaram de hemaglutininas ou fitohemaglutininas, por serem extraídas de plantas.

Stilmark em 1888 apresentou uma hemaglutinina altamente tóxica, conhecida como ricina (SHARON; LIS, 2004). Algumas proteínas interagem com eritrócitos humanos de forma diferente, podendo ser específicos para A, B e O ou interagir da mesma forma com todos os eritrócitos (VAN DAMME et al., 2008). Essa característica sugeriu o termo lectina, que vem do latim *legere*, que significa “selecionar”, adotado por diversos pesquisadores (HAMID et al., 2013). Graças à descoberta de Stilmark, foi iniciada a identificação dessas proteínas, purificação e a caracterização de suas propriedades biológicas (SINGH; SARATHI, 2012). Sendo assim, lectinas são proteínas que apresentam pelo menos um sítio não catalítico que se ligam a mono ou oligossacarídeos de maneira reversível, com alta especificidade (PEUMANS; VAN DAMME, 1995; LIS; SHARON, 1998).

As lectinas são encontradas em animais vertebrados, invertebrados, microrganismos, vírus e frequentemente na superfície das células ou intracelularmente. São capazes de interagir com os componentes de fluidos biológicos, atuando como moléculas de reconhecimento dentro da célula e decodificando a informação biológica que é apresentada sob a forma de glicoconjugados (SHARON; LIS, 2004; SINGH et al., 2011; RIBEIRO et al., 2012). A variabilidade de glicanos na superfície das células permite que elas funcionem como moléculas de sinalização e interajam com receptores presentes na superfície celular, sendo de extrema importância em muitos processos biológicos (Figura 1) (SINGH et al., 2011, ABDON et al., 2012; RIBEIRO et al., 2012; SILVA et al., 2012). Além disso, elas podem se ligar a receptores de membrana e estimular a ativação de linfócitos, induzir o crescimento celular e a proliferação celular (MACIEL, 2002). Podem servir também como cofatores de outros sistemas de reconhecimento, sendo utilizadas como ferramentas significativas em diagnósticos clínicos e na elucidação de estruturas de proteínas e carboidratos (LAKHTIN et al., 2011).

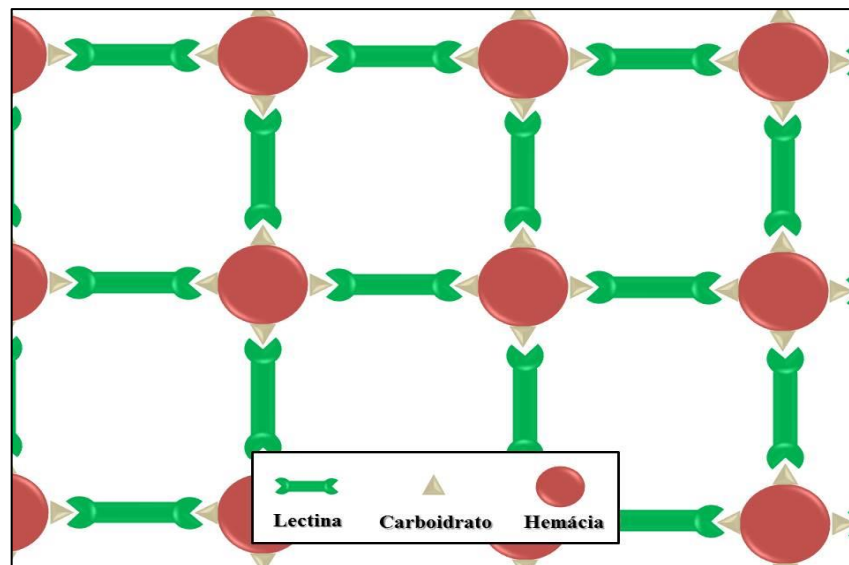
Figura 1. Interações lectina-carboidrato: Representação das interações lectina-carboidrato na superfície celular, nos diversos tipos de células.



Fonte: Adaptado de SHARON; LIS (2004).

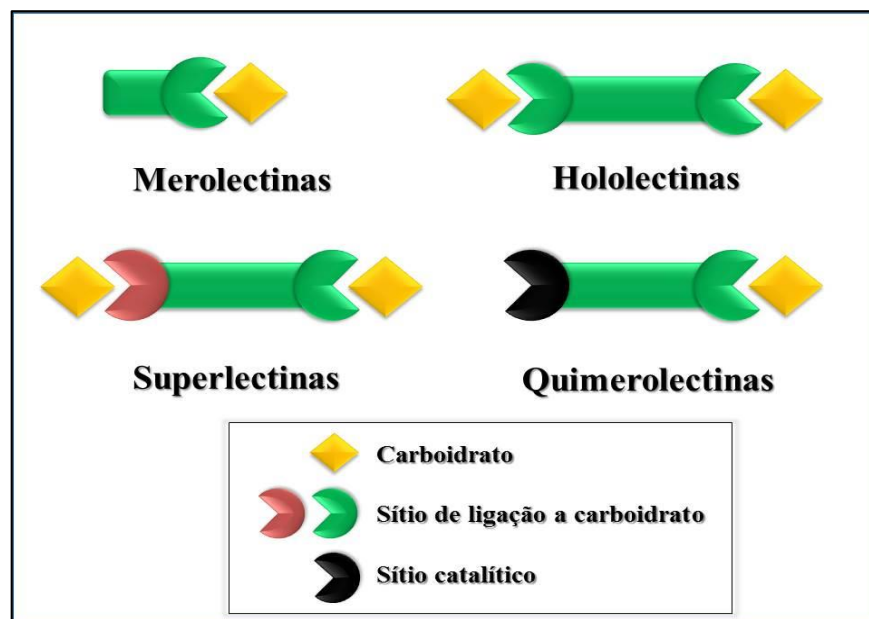
As lectinas se ligam a porções de carboidratos nas superfícies celulares de eritrócitos e dessa maneira os aglutinam, sem alterar as propriedades dos carboidratos (HAMID et al., 2013). O efeito da aglutinação das células pode ser visto na Figura 2. São classificadas quanto a sua estrutura: Merolectinas, Hololectinas, Quimerolectinas e Superlectinas (Figura 3). As merolectinas são pequenas e apresentam apenas um sítio de ligação a carboidratos, por isso não são capazes de precipitar gliconjugados ou aglutinar células. As hololectinas apresentam domínio de ligação a carboidrato contendo dois ou mais domínios que podem ser idênticos ou homólogos, essa característica permite que aglutinem células e precipitem glicoconjugados. A maioria das lectinas isoladas pertence a este grupo. As quimerolectinas apresentam o domínio de ligação a carboidratos e outro domínio com atividade catalítica ou outra atividade biológica. As superlectinas apresentam dois domínios de ligação a carboidrato, sendo específicos a diferentes açúcares (PEUMANS; VAN DAMME, 1995; JIANG et al., 2010; VANDENBORRE et al., 2011).

Figura 2: Representação de aglutinação dos eritrócitos pelas lectinas: As proteínas interagem com carboidratos específicos da membrana celular.



Fonte: Adaptado de KENEDY et al. (1995).

Figura 3: Classificação das lectinas.



Fonte: Adaptado de PEUMANS; VAN DAMME (1995).

A intensificação dos estudos moleculares dessas proteínas gera o entendimento de suas atividades moleculares. Os primeiros estudos variavam da determinação das sequências primárias à determinação da estrutura em 3D, sendo grande parte desses estudos com lectinas de plantas. O número de sequências e estruturas determinadas tem aumentado, permitindo a identificação de homologias de sequências primárias entre essas proteínas (SHARON; LIS,

2004). Nas duas últimas décadas, muitas lectinas em diversas espécies de plantas foram identificadas e mostraram estruturas moleculares e afinidades por açúcares de maneira bem diversa (MICHIELS et al., 2010). Muitos domínios de reconhecimento a carboidrato tem sido detectados entre as diversas lectinas, cada qual apresentando um padrão invariante de resíduos de aminoácidos altamente conservados em um espaço característico (SHARON; LIS, 2004). Assim, esse grupo tem sido alvo de grandes estudos científicos, servindo para avaliação e entendimento de diversas funções nos sistemas biológicos.

Nos últimos anos, um grande número dessas proteínas tem sido isoladas, tanto de animais quanto de vegetais e suas estruturas tridimensionais determinadas. Dentre as diversas atividades que as lectinas apresentam, algumas podem ter mecanismos de ação no que se diz respeito ao câncer, inflamação, propriedades antibacterianas, entre outros (SINGH; SARATHI, 2012).

1.1.1 Lectinas de Plantas

As lectinas de plantas são consideradas um grupo bem heterogêneo de proteínas, pois estudos comparativos bioquímicos mostram que elas diferem uma das outras no que se diz respeito às propriedades bioquímicas e físico-químicas, estruturas moleculares, atividade biológica, além da especificidade e propriedade de ligação à carboidratos (VAN DAMME et al., 2004; JIANG et al., 2010). Índícios moleculares, bioquímicos, celulares, fisiológicos, evolucionários, indicam que as mesmas apresentam papel importante na defesa de planta (VANDEBORRE et al., 2011), são encontradas em quase todos os vegetais e a maioria estão presentes nos cotilédones das sementes (SINGH; SARATHI, 2012).

Com algumas exceções, as lectinas são as únicas proteínas de plantas que são capazes de reconhecer e se ligar à gliconjugados presentes na superfície de microrganismos. Além da diversidade quanto à estrutura e famílias das lectinas, a grande distribuição dessas moléculas no mundo das plantas mostra que são importantes fisiologicamente, indicando que durante o processo evolutivo, diferentes lectinas podem ter se adaptado a uma única função em diferentes tecidos ou espécies (ETZLER, 1985). Tem sido especulado que as lectinas podem servir como proteínas de reserva das plantas, muitas apresentando comportamento semelhante à outras proteínas de reserva (KOMATH et al., 2006). As lectinas podem ser isoladas a partir de tecidos de armazenamento em plantas (sementes ou tecidos de armazenamento vegetativo), onde elas contribuem para uma grande proporção de proteína no tecido.

Apesar de muitos estudos das lectinas de plantas, a função fisiológica não é muito bem compreendida (VAN DAMME et al., 2004). Pelo fato de não estimularem células de plantas, imagina-se que elas não tenham sido selecionadas pela evolução para este propósito, mas sim para defesa contra microrganismos patogênicos (SHARON, 2007; VANDEBORRE et al., 2011). Isso é corroborado pela ideia que a maioria das lectinas de plantas sejam destinadas a entrarem em contato com glicanos, atuando no reconhecimento ou na defesa (VAN DAMME et al., 2004).

Atualmente é difícil achar uma forma que seja bem aceita para classificação das lectinas de plantas. Algumas tentativas foram feitas utilizando alguns critérios de classificação, algumas baseadas na especificidade por carboidratos e outras baseadas nas estruturas tridimensionais dessas proteínas. Mas uma é baseada tanto nas relações sorológicas quanto na similaridade de sequências, de acordo com as suas relações evolucionárias (JIANG et al., 2010). Baseado nesse critério essas lectinas de plantas podem ser compreendidas em pelo menos doze famílias distintas nas suas relações estruturais e evolucionárias mostrando que as plantas desenvolveram um número limitados de motivos que se ligam a carboidrato (MITRA et al., 2002; VAN DAMME et al., 2004; JIANG et al., 2010). Dentre as famílias, encontramos as lectinas de leguminosas.

1.1.2 Lectinas de leguminosas

As sementes de leguminosas são ricas em lectinas e muitas dessas proteínas já foram bem caracterizadas e são escolhidas para estudos moleculares devido a facilidade de serem purificadas em grande quantidade, a sua especificidade a carboidratos e a conservação da sua sequência (LORIS et al., 2004). No mundo vegetal, estão distribuídas em várias espécies de plantas e são usadas como modelos em estudos estruturais (NÓBREGA et al., 2012; BEZERRA et al., 2013; DELATORRE et al., 2013).

A especificidade das lectinas por carboidratos permite a caracterização de complexos de carboidratos e glicoconjugados e vem sendo estudada através da cristalografia de raios X (LORIS et al., 1998). Essa família mostra níveis altos de similaridade e diferenças significantes nas suas atividades biológicas (CAVADA et al., 2001; NÓBREGA et al., 2012) assim apresentam a estrutura terciária bastante similares, mas tem uma grande variação nas associações quaternárias (SHARON, 2007), como por exemplo, algumas lectinas estão envolvidas com o estímulo de secreção de histamina e a produção de óxido nítrico (GADELHA et al., 2005), enquanto outras podem estar envolvidas no crescimento de

bactérias que estão presentes na associação simbiótica das raízes das leguminosas, melhorando a qualidade dessa interação (SHARON, 2007; VASCONCELOS et al., 2013). De acordo com Cavada et al (2001), as interações no sítio de ligação ao carboidrato podem ser a resposta para elucidar a correlação entre as suas estruturas e as suas funções fisiológicas, mas alguns pesquisadores relatam que além da ligação ao carboidrato, as lectinas são capazes de interagir com ligantes hidrofóbicos que se ligam em locais específicos da proteína (KOMATH et al., 2006). Estudos estruturais mostram um sítio de ligação à adenina em cavidades hidrofóbicas, importante para o transporte da mesma em reações fisiológicas (SHETTY et al., 2013).

As lectinas são de interesse de estudo não apenas por suas propriedades de se ligar a carboidratos, mas também pelo fato de que juntamente com esse potencial, são capazes de aglutinar células e precipitar carboidratos multivalentes. São proteínas oligoméricas, podendo formar dímeros ou tetrâmeros e apresentam múltiplos sítios de ligação (LORIS et al., 1998). Várias lectinas da família *Fabaceae* tem sido isoladas e caracterizadas inclusive as que estão presentes nas sementes da subtribo Diocleinae. Dentre as lectinas dessa subtribo, a mais estudada em suas aplicações biológicas é a ConA (Concanavalina A) (BITTIGER e SCHNEBLI, 1976), primeira a ter sua estrutura tridimensional resolvida (EDELMAN et al., 1972), é conhecida por seus efeitos anti-proliferativos e citotóxicos em diferentes tipos de células cancerígenas, inclusive na indução de autofagia em células deste mesmo tipo (ROY et al., 2014). Outra lectina que vem sendo bastante estudada e caracterizada nos últimos anos é a *Concanavalina M*.

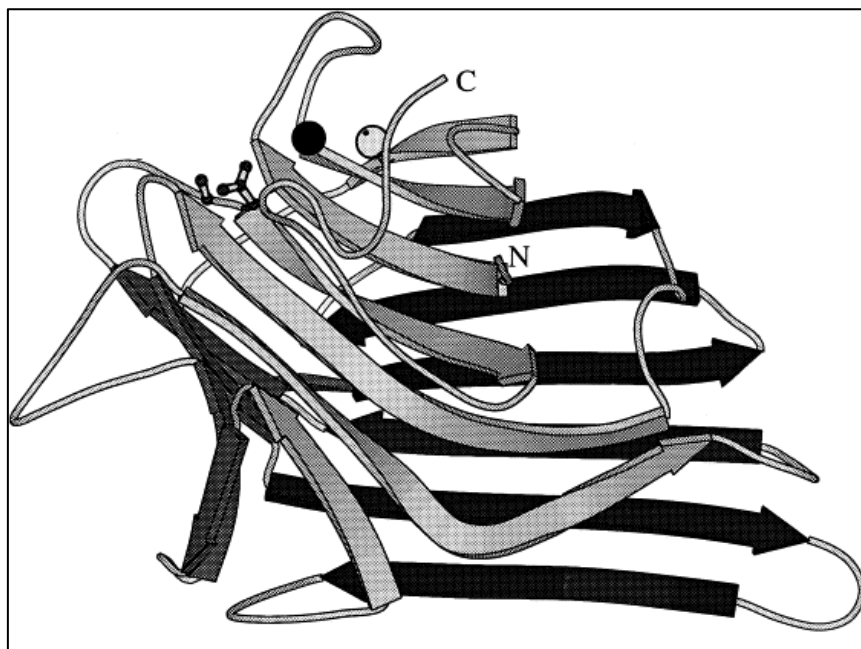
1.1.2.1 Concanavalina M (ConM)

A lectina Concanavalina M (ConM) é obtida da semente da planta *Canavalia maritima* que é conhecida popularmente como feijão de praia (em inglês “bay bean”). Ocorre em todo o mundo, principalmente em locais tropicais e subtropicais costeiros, consegue sobreviver em períodos de secas, sendo facilmente encontrada na areia da praia, dunas e arbustos costeiros. O gênero *Canavalia* pertence à subtribo Diocleinae e apresenta várias características morfológicas o que faz com que sirvam como referência de rápida identificação para outros gêneros que pertencem a mesma subtribo (MATOS et al., 2004).

A ConM foi purificada por Perez et al., 1991 e tem uma massa de 25.5 kDa por monômero. O monômero da lectina é composto por 237 resíduos de aminoácidos, constituído por três folhas beta antiparalelas, sendo seis fitas na folha de “trás”, sete fitas na folha da

“frente” e uma folha menor com cinco fitas. Esse monômero é chamado de “Jelly roll”, conservado na maioria das lectinas de leguminosas (Figura 4). O arranjo biológico ConM apresenta dímeros canônicos, caracterizado por 12 fitas beta, resultado do alinhamento lado a lado antiparalelo das folhas de “trás”. São compostas por 2 ou 4 subunidades, apresentando um sítio de ligação a carboidrato bem conservado assim como sítio de ligação a metais (cálcio e manganês) (LORIS et al., 1998; BRINDA et al., 2004).

Figura 4: Monômero da ConA. As seis fitas da folha de “trás” estão em preto, as sete fitas da folha da “frente” em cinza claro e a folha menor com cinco fitas está em cinza forte. Os íons cálcio e manganês estão representados pelas esferas preta e cinza.



Fonte: Adaptado de LORIS et al. (1998).

Gadelha et al. (2005) cristalizaram, resolveram a estrutura tridimensional desta lectina e observaram que a mesma apresenta 98% de similaridade na sua sequência de aminoácidos quando comparada com a ConA. Sabe-se que as pequenas mudanças nas sequências dos aminoácidos, principalmente mudanças relacionadas ao sítio de ligação ao carboidrato, devem ser responsáveis pelas mudanças de atividades biológicas, como no caso da propriedade de liberação de óxido nítrico no músculo liso (GADELHA et al., 2005). Ramos et al., 1996 relatou que a ConM apresenta similaridade quando comparada a outras espécies de lectinas, nas interações com outros mono, oligossacarídeos e glicanos, dados corroborados por Delatorre et al. (2006), quando esta lectina foi cocrystalizada e resolvida, complexada com maltose e trealose. A ConM também é capaz de reduzir a expressão de genes que codificam

enzimas relacionadas a adesão, formação e regulação de biofilmes de bactérias (CAVALCANTE et al., 2013).

O aprimoramento dos estudos dessa lectina visa entender as suas afinidades e mostrar o quanto essas pequenas diferenças entre as lectinas ConA-like podem alterar a atividade biológica e melhorar a especificidade de ligação por glicanos na superfície celular, além de correlacionar essas ligações às atividades biológicas em sistemas fisiológicos diferentes (DELATORRE et al., 2006).

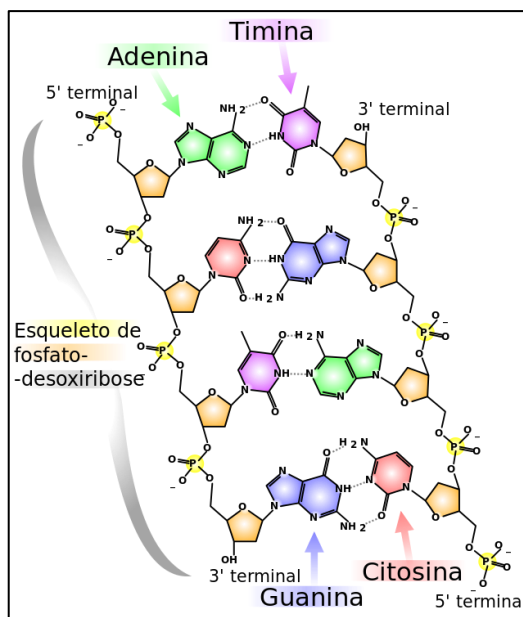
1.1.3. Lectinas e algumas atividades biológicas

1.1.3.1. Complexo Lectina-DNA

Muitos processos biológicos envolvem a interação de proteínas com ácidos nucleicos, como por exemplo, aqueles relacionados com a expressão gênica (BLOOMFIELD et al., 2000). A molécula de DNA é capaz de interagir especificamente ou não com diferentes proteínas (BREITWIESER, 2003). O DNA é um polímero linear que consiste de repetições de unidades nucleotídicas, assume uma forma de dupla hélice, devido ao arranjo feito pelos seus componentes. São formados por bases heterocíclica (Adenina, Citosina, Guanina ou Timina), por um açúcar desoxirribose e por um grupamento fosfato, estando os dois últimos voltados para o exterior da dupla hélice do DNA (WATSON e CRICK, 1953). A sua estrutura tridimensional é decorrente das características químicas e estruturais de suas cadeias polipeptídicas, as quais são mantidas juntas por pontes de hidrogênio (Figura 5). “*Primers*” (ou iniciadores) são segmentos de ácidos nucleicos que servem como ponto inicial para a síntese de DNA e são fundamentais para o processo de replicação (ALBERTS et al., 2010).

O estudo da interação dessa macromolécula com proteínas em organismos tem recebido mais atenção devido à importância desse tipo de ligação, pois a interação dessa molécula com proteínas desempenha papéis nas funções vitais e regulação celular, sendo uma das macromoléculas fundamentais nos organismos (WIENHUES et al., 1987; BLOOMFIELD et al., 2000; BREITWIESER, 2003).

Figura 5. Estrutura do DNA: Estrutura de uma molécula de DNA com quatro possíveis nucleotídeos compostos por uma base nitrogenada, um açúcar desoxirribose e um grupamento fosfato.



Fonte: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/52/DNA_chemical_structure_pt.svg

Lectinas de leguminosas apresentam a habilidade de se ligar fortemente à molécula de DNA e esse complexo formado é capaz de ser recuperado de forma intacta, não alterando os componentes dessa macromolécula (BREITWIESER, 2003), fazendo com que essas proteínas sejam ótimas mediadoras de moléculas de DNA na célula. Em condições experimentais, lectinas como ConA, ConBr, ConBn, ConM, ConG, Dviol, Dvirg e PHA-E são capazes de se ligarem a DNA, de uma forma rápida e a ligação não seria sequência-específica. De acordo com Breitwieser (2003), a lectina na forma de dímero ou tetrâmero oferece mais de um sítio de ligação ao DNA, sendo a forma tetramérica com mais chances de se ligar a mais DNA. A habilidade de se ligar a fragmentos de DNA ajuda a entender os prováveis mecanismos nas atividades biológicas, incluindo o aumento de citocinas como a IL-1 β nos processos inflamatórios ou apoptóticos (DUJMOVIC et al., 2009; ZHAO et al., 2013).

1.1.3.2 Lectinas e ações inflamatórias

O processo inflamatório é a primeira defesa fisiológica no corpo humano (LEE et al., 2010) e todos os processos vasculares são modulados por vários mediadores químicos, incluindo citocinas. A interleucina 1 (IL-1) é uma família de citocinas que tem um papel importante na cascata imunoinflamatória (DUJMOVIC et al., 2009). A família IL-1 apresenta

duas formas: IL-1 α e IL-1 β . IL-1 β apresenta diversas atividades inflamatórias e imunomodulatórias, está envolvida em ativação de linfócitos, em inflamação, proliferação celular, diferenciação, apoptose e progressão de tumores, é produzida por monócitos, macrófagos, por células T, células endoteliais e entre outros (ZHAO et al., 2013). É sugerido que essas proteínas possam ativar a cascata de mediadores inflamatórios com a participação de histamina, citocinas primárias (IL-1 e TNF- α) e canais de cloreto de prostaglandina (FERNANDES, 2008).

As lectinas da família *Fabaceae* podem apresentar ações pró ou anti-inflamatórias, dependendo da via de administração da mesma. Quando administradas localmente, apresentam atividades pró-inflamatória e imunoestimuladora (ALENCAR et al., 2003, 2004). Quando testadas in vivo, algumas lectinas apresentam atividade edematogênica em paralelo com o aumento da permeabilidade vascular (ASSREUY et al., 2009), e a ConM contribui nesse processo por meio da liberação de óxido nítrico no relaxamento endotelial (GADELHA et al., 2005). Esses efeitos foram vistos através da interação entre o domínio lectínico com resíduos de carboidratos presentes nas membranas de células da inflamação induzindo a ativação ou inibição da migração de neutrófilos (FIGUEIREDO et al., 2009).

A lectina ConM apresenta efeitos pró-inflamatórios quando administrada por injeção intraplantar em ratos (FERNANDES, 2008). Alguns estudos demonstraram a importância do sítio de ligação a carboidrato das lectinas no efeito inflamatório nas ações pró (ALENCAR et al., 2005b; FREIRE et al., 2003) e anti-inflamatória (SANTI-GADELHA et al., 2006; ABRANTES et al., 2013). Apesar da similaridade das lectinas de Canavalia, elas apresentam diferentes atividades e potência na inflamação, sendo a ConM a mais diferenciada nesse aspecto (ASSREUY et al. 2009), isso poderia ser justificado pela distância filogenética quando comparada com outras espécies (SOL et al., 2006).

1.1.3.3 Lectinas mitogênicas

Algumas lectinas de plantas apresentam características mitogênicas. A lectina da PHA (*Phaseolus vulgaris*) foi o primeiro agente mitogênico descoberto (NOWELL, 1960), o que levou ao descobrimento de outras lectinas mitogênicas, como a ConA (HARRIS; ROBSON, 1963), que é capaz de estimular a síntese de DNA nos linfócitos T (COELHO; GIRLAT, 1976). São conhecidas como mitógenos, por induzir a proliferação celular pela ligação à diversas glicoproteínas na superfície celular (MACIEL, 2002), podendo ser usadas em estudos envolvendo doenças humanas e anomalia cromossomal, além de poderem elucidar alguns

mecanismos de ativação de linfócitos, ajudando a entender mais sobre o desenvolvimento e o crescimento celular (VIKRAM et al., 2010).

Dentre o diverso mundo da família das leguminosas, há registros de algumas lectinas que induzem a resposta mitogênica, como a lectina glucosamina-específica (CHAN et al., 2010) e galactose-específica (WONG et al., 2006) das sementes de *Phaseolus vulgaris*; lectinas de semente da *Parkia speciosa* apresentam efeitos em linfócitos humanos (SUVACHITTANONT e JARANCHAVANAPET, 2000); lectinas de *Cratylia mollis* além de ter atividade mitogênica, também estimulam a produção de citocinas em esplenócitos (MELO et al., 2011).

Dentro da subtribo Diocleinae, a ConA foi a primeira lectina de planta que foi inibida por açúcares simples, concluindo que a hemaglutinação e a atividade mitogênica estão relacionadas com a atividade de ligação ao carboidrato; além disso, essa foi a primeira evidência que os glicoconjugados da superfície celular estavam envolvidos na atividade mitogênica (KILPATRICK, 1999). Enquanto a ConM apresenta 98% de homologia com a ConA (GADELHA et al., 2005), a ConBr (*Canavalia brasiliensis*) apresenta 99% (CAVADA et al., 2001), sendo esta última dotada de efeitos similares no reconhecimento de células por receptores distintos de superfície celular (SILVA et al., 2011) aos descritos da ConA. A grande diversidade entre as proteínas desta tribo pode explicar as diferenças nas suas atividades mitogênicas.

1.2 Cristalografia por difração de raios X

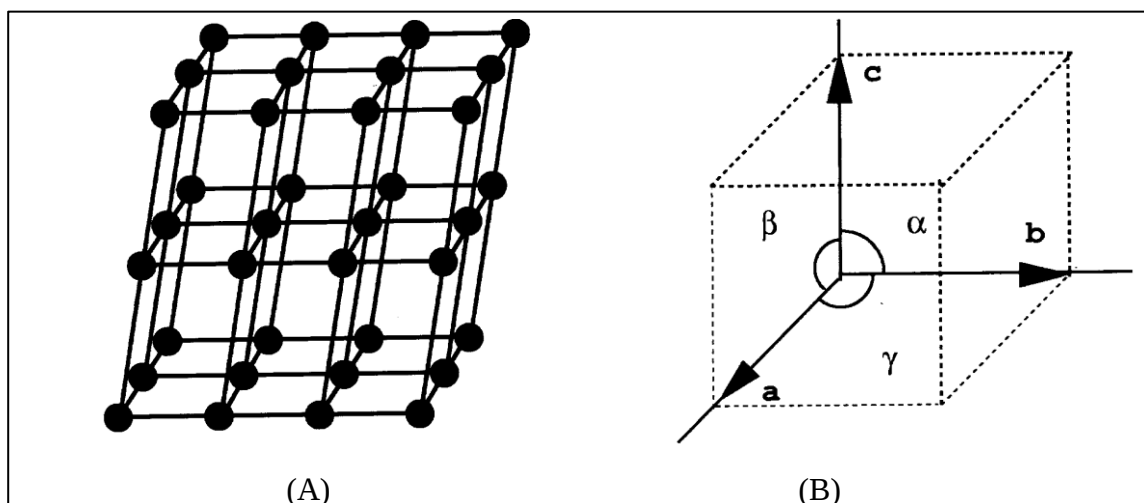
1.2.1 Cristalização

A principal técnica para a resolução da estrutura tridimensional de macromoléculas biológicas é chamada de cristalografia por difração de raios X (BLUNDELL E JOHNSON, 1976; DRENTH, 2007; MCPHERSON, 2003). É o método mais comum de se obter modelos detalhados de grandes moléculas, permitindo a resolução individual de átomos, através da interpretação da difração de raios X por diversas moléculas idênticas arranjadas em um cristal (RHODES, 2006). Os cristais fornecem padrões de difração de raios-X, servindo como dados que permitem a visualização das macromoléculas ou complexos contidos no cristal estudado (MCPHERSON e GAVIRA, 2014). Desde a primeira resolução estrutural de uma proteína, milhares de macromoléculas biológicas tiveram suas estruturas tridimensionais determinadas (RHODES, 2006).

Sob certas circunstâncias, algumas substâncias moleculares, inclusive proteínas, se solidificam para formar cristais e adotar uma ou algumas orientações idênticas. Um cristal é um arranjo de moléculas ordenado, que interagem por interações não covalentes. São característicos pelo seu tamanho e também por serem muito frágeis. Essa fragilidade se deve às fracas interações que existem nas macromoléculas, são principalmente pontes de hidrogênio intervindo com moléculas de água e é o que mantém essa estrutura cristalina. Por isso, o ambiente em que os cristais devem permanecer deve ser saturado de solvente, pois caso contrário, a desidratação levará à quebra dessas ligações e à destruição do cristal (RHODES, 2006). Além disso, cristais de macromoléculas são sensíveis à temperatura e não resistem à longa exposição de radiação (MCPHERSON e GAVIRA, 2014).

Cristais apresentam um alto grau de ordenação interna, sendo formados por repetições translacionais de átomos ou moléculas em todas as direções (Figura 6A). Os detalhes das posições atômicas são determinados por análise da estrutura do cristal, que corresponde com o grau de ordem cristalina (MCPHERSON e GAVIRA, 2014). A sua regularidade interna é descrita por uma pequena unidade de volume uniforme, chamada de cela unitária (DELATORRE, 2001). Cada uma delas é o menor e o elemento mais simples que pode ser usado para representar o cristal como um todo, já que o cristal é formado por muitas células unitárias (RHODES, 2006). É caracterizada por três vetores a , b e c que definem suas arestas e pelos ângulos α , β e γ existentes entre elas (Figura 6B) (DELATORRE, 2001). Cristais de macromoléculas são compostos por cerca de 50% do solvente (podendo haver variação, dependendo da molécula específica).

Figura 6. Retículo cristalino e cela unitária: (A) Referente a um retículo cristalino tridimensional (B) Referente a uma cela unitária.



Adaptado de DELATORRE et al., 2001.

No cristal, a proteína ou o ácido nucleico apresenta extensos espaços intersticiais, por onde moléculas pequenas, solventes e outros fluidos se difundem livremente (MCPHERSON e GAVIRA, 2014). Para formar uma rede cristalina ordenada, os átomos buscam um empacotamento de menor energia para proporcionar um posicionamento simétrico entre as moléculas. A simetria de uma célula unitária é descrita pelo seu grupo espacial, representado por um símbolo críptico que indica o tipo de rede cristalina e as operações simétricas (RHODES, 2006). A mesma pode assumir até sete sistemas cristalográficos, sendo essa limitação dada por elementos simétricos (Tabela 1) (DRENTH, 2007).

Nos métodos mais comuns de cristalização, a proteína purificada é dissolvida em um tampão aquoso contendo o precipitante como, por exemplo, o sulfato de amônio ou polietileno glicol, a uma concentração inferior a necessária para precipitar a proteína (RHODES, 2006). As moléculas devem ser trazidas a um estado de supersaturação para que possam surgir cristais. Essa supersaturação pode ser alcançada por evaporação lenta do solvente, por variações em diversos parâmetros, tais como pH, temperatura e força iônica, ou por uma precipitação controlada, lenta, da solução aquosa, sob condições que não desnaturem a proteína, uma vez que geralmente são desnaturadas pelo calor ou exposição à solventes orgânico (RHODES, 2006; MCPHERSON e GAVIRA, 2014).

Tabela 1. Sistemas cristalográficos.

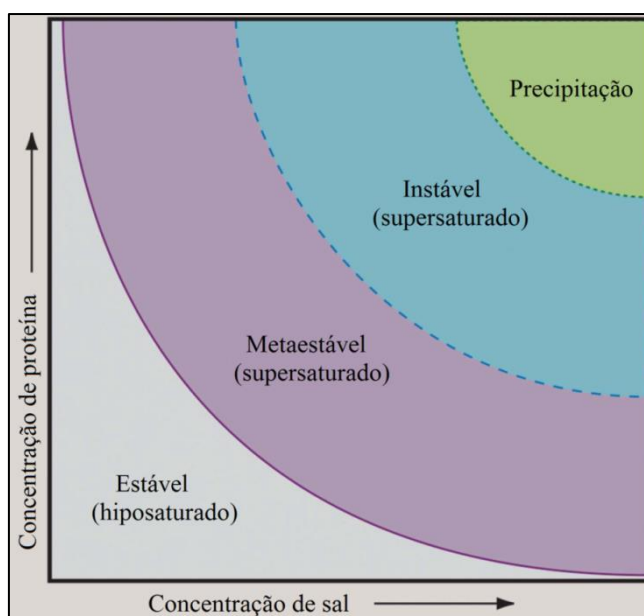
Sistema cristalográfico	Condições impostas na geometria da cela	Ponto mínimo de simetria de grupo
Triclínico	Nenhum	1
Monoclínico	$\alpha = \gamma = 90^\circ$ (b é o único eixo) ou $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ (c é o único eixo)	2
Orthorhombico	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	222
Tetragonal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

Fonte: Adaptado de DRENTH (2007).

Os precipitantes de macromoléculas podem se enquadrar em quatro categorias: Sais, solventes orgânicos, polímeros de cadeia longa e polímeros de baixo peso molecular (MCPHERSON e GAVIRA, 2014). Destes, os compostos iônicos (sais) ajudam na precipitação através de um processo chamado de “salting out”, assim como solventes orgânicos, porém, os últimos podem frequentemente interagir com porções hidrofóbicas das proteínas e causar a sua desnaturação (RHODES, 2006).

A cristalização ocorre em três passos básicos: nucleação, crescimento e o término do crescimento do cristal. A nucleação compreende em uma das fases mais problemáticas, pois representa a primeira fase de transição das moléculas que vão passar de um estado de desordem, para um de ordem (MCPHERSON e GAVIRA, 2014). É um pré-requisito para ocorrer a cristalização e requer condições diferentes das necessárias para o crescimento. Uma vez que a nucleação é formada, o crescimento ocorre espontaneamente (DUCRUIX e GIEGÉ, 1999; CHAYEN, 2005; RHODES, 2006). O processo de cristalização pode ser ilustrado através de um diagrama de fases (Figura 7), ele permite uma maneira de quantificar a influência de parâmetros como a concentração da proteína, precipitantes, aditivos, pH e temperatura na produção de cristais (CHAYEN, 2005; MCPHERSON e GAVIRA, 2014).

Figura 7: Diagrama de fases para cristalização de macromoléculas. São mostradas quatro áreas: Precipitação, uma área de alta supersaturação onde a proteína irá precipitar; Instável, área de supersaturação moderada, onde nucleação espontânea ocorre; Metaestável, os cristais são estáveis e podem crescer, mas a nucleação não ocorrerá; Estável, as proteínas estão dissolvidas e não irão cristalizar.



Fonte: Adaptado de CHAYEN, 2005; MCPHERSON e GAVIRA, 2014.

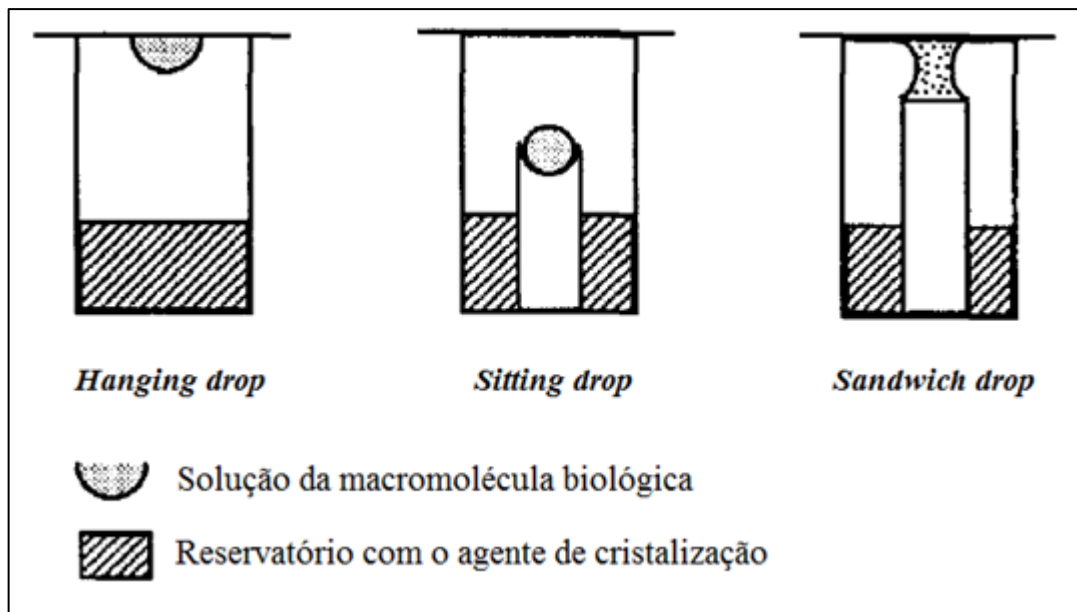
1.2.2 Método da difusão de vapor

Existem diversas técnicas para a cristalização de macromoléculas biológicas, todas com um mesmo objetivo. A mais utilizada é chamada de difusão de vapor, que consiste em uma gota com a macromolécula que se deseja obter o cristal, com o agente de cristalização e aditivos, equilibrada contra um reservatório contendo a solução do agente de cristalização a uma concentração mais alta do que na gota (RHODES, 2006). O objetivo principal é alterar o ambiente para que a solubilidade da proteína na amostra seja reduzida, tornando a solução supersaturada (MCPHERSON e GAVIRA, 2014).

O equilíbrio vai ocorrer através da difusão das espécies voláteis, que consistem na água e nos solventes orgânicos. Como o precipitante é o soluto principal, a difusão de vapor no sistema fechado resulta na transferência da água da solução da proteína para a solução no reservatório, até que a concentração seja a mesma nas duas soluções (RHODES, 2006). Uma vez que o equilíbrio da gota ocorre através da troca de vapor de água, o volume da gota diminui e há um aumento nas concentrações de todos os constituintes da gota de cristalização, provocando uma mudança lenta em parâmetros cinéticos. A supersaturação da gota leva a mesma ao estado sólido ou na forma de precipitado ou cristal (DUCRUIX e GIEGÉ, 1999). Quando o sistema chega ao equilíbrio, a transferência da água para e a solução da proteína é mantida na concentração do precipitante (RHODES, 2006). Esse princípio se aplica para as gotas suspensas (*hanging drops*), gotas sentadas (*sitting drops*) e gotas sanduíches (*sandwich drops*) (Figura 8), sendo a mais utilizada a difusão de vapor em gota suspensa. Os experimentos são feitos em placas de acrílico, vendidas comercialmente como Placas Linbro® (Figura 9). As placas apresentam 24 poços rotulados A, B, C e D verticalmente e 1-6 horizontalmente. Cada poço tem aproximadamente 2 mL e um diâmetro interno de 16mm (DUCRUIX e GIEGÉ, 1999).

Uma quantidade da solução da proteína, formando uma pequena gota, é colocada em uma lamínula siliconizada de 22mm de diâmetro, já que essas lamínulas em contato com soluções macromoleculares devem ser colocadas de uma maneira a obter uma superfície hidrofóbica (DUCRUIX e GIEGÉ, 1999). Juntamente à essa gota, é misturada, em mesma quantidade, a solução do reservatório, dando uma concentração de 50% do que é preciso para a cristalização da proteína. Essa solução (gota) é suspendida sob a lamínula siliconizada, colocada sobre um reservatório e é selado por uma graxa de vácuo (RHODES, 2006) (Figura 10).

Figura 8. Técnicas de difusão de vapor: Representação esquemática do Hanging drop, sitting drop e sandwich drop.



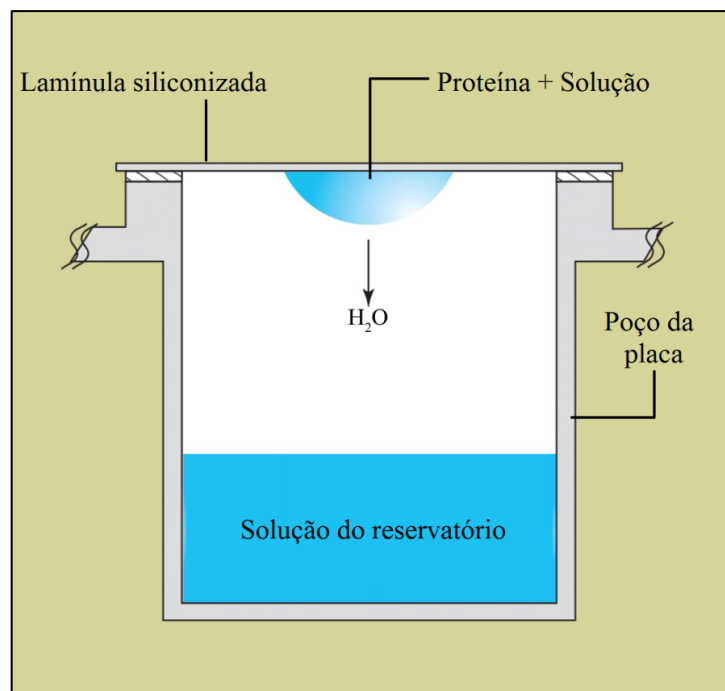
Fonte: Adaptado de DUCRUIX e GIEGÉ, 1999.

Figura 9. Placa de cristalização: Referente a uma placa Linbro®.



Fonte: <http://hamptonresearch.com/img/product/250/0000000114-250.jpg>

Figura 10: Ilustração do método da gota suspensa. A gota fica suspensa em uma lamínula siliconizada contra a solução do reservatório.



Adaptado de MCPHERSON e GAVIRA, 2014.

1.2.4 Cocrystalização

Além da busca pela estrutura nativa de uma proteína, é de interesse obter cristais de proteínas em complexo com alguns ligantes, como cofatores, substratos análogos, inibidores e efetores alostéricos, já que muitos mecanismos biológicos envolvem interações entre as proteínas, sendo necessário um conhecimento estrutural. A determinação da estrutura desse complexo revela detalhes que podem ajudar no entendimento da interação e da função da proteína (DUCRUIX e GIEGÉ, 1999; RHODES, 2006).

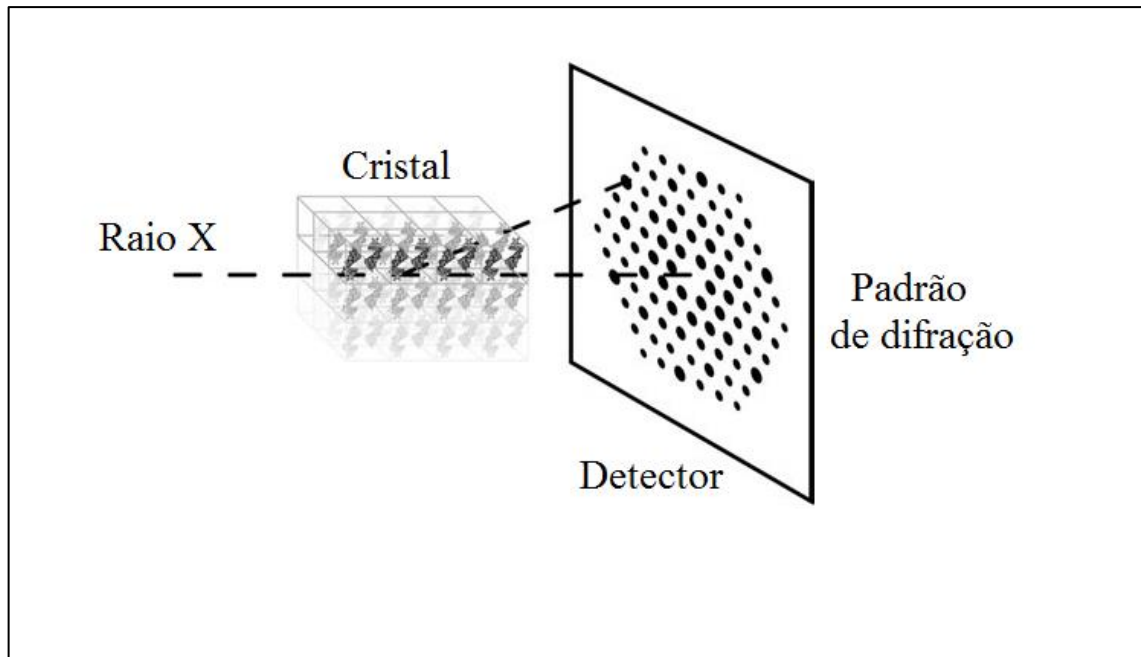
É possível obter cristais de proteína com um ligante, através de um processo chamado de cocrystalização, que consiste na cristalização da proteína com o seu ligante. Este é o único método que permite obter cristais de complexos de proteínas com grandes ligantes como ácidos nucleicos e outras proteínas (RHODES, 2006; DRENTH, 2007). Existem ainda outras maneiras de se conseguir cristais com seus ligantes. As proteínas apresentam os seus sítios funcionais na forma de cristal e assim o ligante pode difundir e se ligar nesses sítios através de canais de água no cristal. Quando a porção de interesse é um ligante pequeno como nucleotídeos ou pequenos oligonucleotídeos, às vezes é possível difundi-los em um cristal receptor. Esse processo é chamado de “soaking” (RHODES, 2006).

1.2.5 Difração de raios X

Raios X são radiações eletromagnéticas de comprimento de onda de 0,1-100 Å. Estes são produzidos quando uma partícula de alta energia cinética é rapidamente desacelerada, bombardeando um alvo metálico com elétrons produzidos por um filamento aquecido e acelerado por um campo elétrico. Quando esse elétron de alta energia colide com um elétron do átomo do material, é liberado na forma de fotoelétron. Em seguida, um elétron de um orbital mais alto cai em uma vacância, emitindo seu excesso de energia como um fóton de raios X (BLEICHER e SASAKI, 2000; RHODES, 2006). Existe ainda outra fonte de produção de raios X não convencional que é a fonte de radiação síncrotron. Nesta fonte há uma intensa radiação eletromagnética que é produzida por elétrons de alta energia em um acelerador de partículas, apresentando todos os comprimentos de onda. As partículas são injetadas em um anel de armazenamento com uma estrutura circular, diretamente de um acelerador linear ou de um “booster” onde os elétrons ganham energia e atingem velocidades próximas à da luz (RHODES, 2006; DRENTH, 2007).

Para a coleta de dados um cristal é colocado entre uma fonte de raios X e um detector, recebendo os raios vindos desta fonte onde ocorre a interação dos raios X com a distribuição eletrônica da carga do retículo cristalino. Muitos raios difratados diferentes emergem do cristal e são capturados pelo detector apresentando pontos pretos, que é onde os raios colidiram. Esses pontos são chamados de reflexões. A distribuição das cargas eletrônicas faz com que a superposição de espalhamentos de raios X forme regiões de interferência, produzindo um padrão de difração, com o seu arranjo regular de pontos (Figura 11). Um scanner mede as posições e intensidades de cada reflexão e manda essa informação digital para um computador para análises. Os espalhamentos das ondas provenientes de diversos planos atômicos faz com que seja gravada uma imagem em uma placa fotográfica, graças à natureza eletromagnética dos raios-X, que se é permitido a formação da imagem do padrão de difração. A análise do padrão de difração obtido é fundamental para a resolução de sua estrutura tridimensional (BLUNDELL e JOHNSON, 1976; MCPHERSON, 2003; RHODES, 2006; LATTMAN e LOLL, 2008).

Figura 11. Geração de um padrão de difração: Representação da geração de um padrão de difração a partir de uma difração de raios X.



Adaptado de LATTMAN e LOLL, 2008.

2.Objetivos

2.1 Objetivo geral

- Cristalizar e resolver estruturalmente a lectina de *Canavalia maritima* complexada com o primer da Interleucina 1- β (IL-1 β).

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a condição inicial de cristalização da lectina de *Canavalia maritima* complexada com o primer da IL-1 β ;
- Resolver tridimensionalmente a estrutura da *Canavalia maritima* complexada com o primer da IL-1 β ;
- Determinar o local da interação do primer com a proteína e identificar os aminoácidos responsáveis pela interação;
- Realizar um docking molecular do primer da IL-1 β com a lectina de *Canavalia maritima*;
- Relacionar a interação da proteína/primer com a atividade biológica das lectinas.

3. Resultados

Estrutura cristalina da lectina de *Canavalia maritima* (ConM) complexada com um dinucleotídeo e complexada com o primer da interleucina-1 β

Derek Barroso Holanda Asp Vieira¹, Bruno Anderson Matias da Rocha², Claudener Souza Teixeira^{2,3}, José Caetano da Silva Filho², Eleonidas Moura Lima¹, Carlos Alberto de Almeida Gadelha¹, Benildo Sousa Cavada² and Plínio Delatorre^{a*}

1) Departamento de Biologia Molecular, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil.

2) Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil.

3) Unidade Descentralizada de Campos Sales, Universidade Regional do Cariri, Campos Sales, Brasil.

Contato. Tel./fax: +558332167787.

E-mail: pldelatorre@gmail.com (P. Delatorre).

Submetido na Process Biochemistry

Lectinas de leguminosas são historicamente reconhecidas como proteínas de ligação a carboidratos e essa propriedade é ligada à maioria das suas atividades biológicas, tais como pró e antiinflamatórias, apoptose e mecanismos mitogênicos. No entanto, vários estudos demonstraram a capacidade destas proteínas de se ligarem a diversos outros compostos, tais como fitohormônios e moléculas hidrofóbicas, embora a relevância biológica destas interações permaneça indefinida. No presente trabalho, nós estendemos esse espectro de parceiros químicos, relatando duas estruturas cristalinas da ConM, uma lectina isolada de sementes de *Canavalia maritima*, em complexo com oligonucleotídeos. Em uma estrutura, o mapa de densidade eletrônica correspondente a dois nucleotídeos de adenina ligados covalentemente foi encontrado na cavidade central polar do tetrâmero de lectina, enquanto que no segundo, um fragmento de quatro nucleotídeos do primer da interleucina-1 β foi encaixado em um mapa de densidade eletrônica presente na interface do dímero não-canônico da ConM. A estabilização dos oligonucleotídeos envolve pontes de hidrogênio e forças eletrostáticas com um resíduo de histidina específico. Com base nestes resultados cristalográficos e em uma simulação de docking molecular, é hipotetizado que a lectina pode funcionar como um fator de transcrição, o que poderia nos ajudar a entender algumas de suas atividades biológicas.

Palavras-chave: Lectinas, *Canavalia maritima*, dinucleotídeo, primer, histidina

1. Introdução

Proteínas que podem interagir com carboidratos estão distribuídas nas mais diversas formas de vida. Entre elas estão as lectinas que podem ser encontradas em vertebrados, invertebrados, microrganismos e vírus. Elas são proteínas que tem pelo menos um sítio não-catalítico que se liga a mono ou oligossacarídeos reversivelmente e com alta especificidade [1, 2]. No reino vegetal, estão distribuídos nas mais diversas espécies de plantas [3]. Lectinas de plantas são consideradas um grupo de proteínas heterogêneo e estudos comparativos bioquímicos mostram claramente que elas diferem uma das outras no que se diz respeito às propriedades físico-químicas e bioquímicas, estrutura molecular, atividade biológica, especificidade e propriedade de ligação a carboidrato [4, 5]. Elas podem ser achadas na superfície celular ou intracelular, sendo capazes de interagir com componentes dos fluídos biológicos, para atuar como moléculas de reconhecimento dentro da célula e decifrar a informação biológica que é apresentada na forma de glicoconjugados, células ou organismos [6, 7, 8]. A variabilidade de glicanos da superfície celular permite que eles funcionem como moléculas sinalizadoras e a interação com lectinas são passos cruciais em muitos processos biológicos [9, 10].

Lectinas de leguminosas são as mais estudadas lectinas de plantas, sendo usadas como modelos em estudos estruturais [11, 12, 13]. Essas lectinas podem apresentar atividades anti ou pró-inflamatórias, dependendo da via de administração, quando administrada localmente apresenta atividade pró-inflamatória e imunoestimulante [14, 15].

O gênero *Canavalia*, que pertence à tribo Diocleinae, destacada por diversos caracteres morfológicos que definem essas plantas como uma entidade taxonômica homogênea, servem como referência para rápida identificação de outros gêneros que fazem parte desta subtribo [16]. A lectina de *Canavalia maritima* (ConM) apresentou efeitos pró-

inflamatórios quando administrado por injeção subcutânea intraplantar em ratos [17]. Alguns estudos avaliaram a importância da especificidade do sítio de ligação a carboidratos das lectinas na inflamação, nas ações pró [18, 19] ou anti-inflamatória [20, 21]. O processo inflamatório é a primeira defesa fisiológica no corpo humano [22] e todos os processos vasculares são modulados por vários mediadores químicos, incluindo citocinas. Interleucina-1 é uma família de citocinas que tem um papel importante na cascata imunoinflamatória [23]. Sabe-se que a família IL-1 apresenta duas formas: IL-1 α e IL-1 β . IL-1 β tem diversas atividades inflamatórias e imunomodulatórias, é produzida por monócitos, macrófagos, células T, células endoteliais e outros [24]. É sugerido que essa proteína possa ativar uma cascata de mediadores inflamatórios com participação da histamina, citocina primária (IL-1 e TNF- α) e canais de cloreto de prostaglandina [17]. A ConM contribui no processo por meio da liberação de óxido nítrico no relaxamento de anéis da aorta de ratos [25]. A maioria das citocinas apresentam meia-vida pequena [26] porque elas são produzidas na resposta imune, por isso não são estocadas em proteínas pré-formadas, elas precisam ser sintetizadas por transcrição gênica [27]. Através de um estímulo, sinais são enviados para o núcleo para induzir o precursor da IL-1 β de 31 kDa e em seguida se localiza no citosol na sua forma biológica inativa; passa a ser a forma ativa de 17.5 kDa quando clivada por caspases-1 no citoplasma [24].

Algumas lectinas de plantas tem propriedades mitogênicas, a lectina PHA (*Phaseolus vulgaris*) foi o primeiro agente mitogênico a ser descoberto [28] que levou à descoberta de outras lectinas mitogênicas como a ConA [29], que é capaz de estimular a síntese de DNA em linfócitos T [30]. Essas lectinas podem ser usadas para estudar doenças humanas, anormalidades cromossômicas e podem elucidar alguns mecanismos da ativação de linfócitos, ajudando a entender o crescimento e desenvolvimento celular [31]. ConA foi a primeira lectina de planta que foi inibida por açúcares simples, concluindo que a

hemaglutinação e atividade mitogênica estão relacionadas com a atividade de ligação a carboidrato, além disso, essa foi a primeira evidência que glicoconjugados da superfície celular estão envolvidos na atividade mitogênica [32]. Apesar de estruturas semelhantes, as proteínas tem diferentes propriedades mitogênicas, devido a suas diferentes especificidades a carboidratos [33].

Muitas reações biológicas envolvem a interação de proteínas com ácidos nucleicos, tais como aquelas relacionadas com a expressão gênica [34]. A molécula de DNA é capaz de interagir com muitas proteínas diferentes, especificamente ou não [35]. A interação da proteína com o DNA desempenha um papel chave em toda regulação celular das funções vitais e isso faz com que seja uma das mais fundamentais macromoléculas nos organismos vivos [36].

Durante as últimas décadas o estudo do DNA, especialmente em relação à interação dessa molécula com proteínas em organismos, tem recebido uma atenção particular, porque uma vez que essa interação ocorre, a transferência dessa molécula para o interior das células seria facilitado [37,35]. Investigações anteriores demonstraram que as lectinas de leguminosas são capazes de se ligar à molécula de DNA [35], mas a base estrutural para este reconhecimento permanece indefinida. Este estudo mostra a estrutura cristalina dos complexos ConM/dinucleotídeo e ConM/primer e propõe uma possível interação lectina-DNA.

2. Materiais e métodos

2.1. Cristalização e coleta de dados

A lectina purificada de *Canavalia maritima* (ConM) foi obtida de acordo com Gadelha e colaboradores [25]. A ConM liofilizada foi solubilizada a uma concentração de 10mg/mL em 1mM Tris-HCl pH 7.6 contendo 5mM CaCl₂, 5mM MnCl₂. Dinucleotídeos de fragmentos de DNA de *Bauhinia variegata* a uma concentração de 5mM foi usada para experimentos de co-cristalização com a ConM. Um co-cristal foi obtido na condição #44 (0,2 M Formato de Magnésio) da Hampton Research Screen I kit. Os dados da difração de raios X foram coletados de um único cristal a uma temperatura de 100K a um comprimento de onda de 1.4727 Å usando fonte de radiação sincrotron (Estação MX1 – Laboratório Nacional de Luz Sincrotron-LNLS, Campinas, Brasil). Previamente, o cristal foi banhado em uma solução crioprotetora (condição de cristalização e glicerol). Um conjunto de dados completos (120 imagens), a uma distância de 110 mm do detector, foi coletado usando MarMosaic 165 CCD (MAR research), com um tempo de exposição de 42.5 segundos por imagem e oscilação de 1°.

Em outro experimento, a lectina foi solubilizada em 0,1M Tris-HCl pH 7.6 a uma concentração final de 10mg/mL e foi co-cristalizada com 5mM do primer da Interleucina-1β (5'CCTGCAATTGACAGAGAGCTCCC' – Síntese Biotecnologia LTDA). Co-cristais foram obtidos na condição #12 (0.2 M Cloreto de Magnésio hexahidratado, 0.1 M HEPES sodium 7,5, 30% v/v 2-Propanol) da Hampton Research Screen I kit. Os dados da difração foram coletados nas mesmas condições do cristal ConM-dinucleotídeo usando a fonte de radiação sincrotron (Estação MX2 – Laboratório Nacional de Luz Síncrotron -LNLS, Campinas, Brasil). Um conjunto de dados completo (120 imagens), a uma distância de 189mm do detector, foi coletado usando MarMosaic 225 CCD (MAR research), com um tempo de exposição de 60 segundos por imagem e oscilação de 1°.

Os dados de difração de raios X foram indexados, integrados e escalonados usando os programas MOSFLM [38] e SCALA [39]. O co-cristal ConM/dinucleotídeo apresentou grupo

especial ortorrômbico I222, enquanto o complexo ConM/IL-1 β apresentou grupo espacial cúbico F23.

2.2. Substituição molecular e refinamento

As estruturas cristalinas ConM/dinucleotídeo e ConM/IL-1 β foram resolvidas por substituição molecular usando o programa Molrep software [40]. A ConM nativa (PDB code 2CWM) foi usada como modelo de procura para ConM/dinucleotídeo para a solução de substituição molecular. A ConM complexada com dimanosídeo man1-4man-OMe (PDB code 2P34) foi usado para ConM/IL-1 β . Os valores de Score e wRfac estão na tabela 1. Os modelos moleculares foram submetidos a diversos ciclos de refinamento de corpo rígido e posicional usando o programa Refmac [41]. O mapa de densidade eletrônica foi gerado e visualizado no programa Coot [42]. A região de loop (resíduos 117 a 122) mostrou baixa densidade eletrônica nas duas estruturas como já reportado em outros estudos [43, 11]. O fragmento de DNA em cada estrutura foi encaixado no mapa de densidade eletrônica, 137 e 101 moléculas de água foram adicionadas aos complexos ConM/dinucleotídeo e ConM/IL-1 β , respectivamente. A estrutura foi submetida a refinamentos “twin” e anisotrópico. Ambos os modelos foram visualizados pelo PyMOL.[44]

2.3. Docking molecular

Investigamos como o primer completo poderia se ligar a lectina no arranjo biológico. O primer modelo do 3-D foi gerado por 3D-DART server [45], e foi subsequente submetido a uma simulação do docking molecular com um dímero canônico (PDB code 2CWM) usando o HEX program versão 6.3 [46].

3. Resultados

3.1. Estrutura Geral

Os parâmetros de cela para o cristal ortorrômbico da estrutura ConM/dinucleotídeo foram: $a = 140.6 \text{ \AA}$, $b = 140.5 \text{ \AA}$, $c = 199.0 \text{ \AA}$, o coeficiente de Matthews foi $3.22 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$ indicando a presença de seis monômeros na unidade assimétrica. As estatísticas finais do refinamento e da estrutura são mostradas na tabela 1. A estrutura refinada do complexo em seu arranjo biológico é um tetrâmero, consistindo de dois dímeros canônicos ligados por pontes salinas entre fitas β e por interações da ConM/dinucleotídeo. As coordenadas atômicas para a estrutura foram depositadas no Protein Data Bank (PDB) com código de acesso 4TYS.

Os parâmetros de cela para o cristal cúbico da ConM/IL-1 β foram: $a = 192.2 \text{ \AA}$, $b = 192.2 \text{ \AA}$, $c = 192.2 \text{ \AA}$, o coeficiente de Matthews foi $2.96 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$ indicando a presença de dois monômeros na unidade assimétrica. O arranjo biológico é um tetrâmero, que é estabilizado por pontes salinas e pela interação entre a lectina e o primer. As estatísticas finais do refinamento e da estrutura são mostradas na tabela 1. As coordenadas do ConM/IL-1 β foram depositadas no Protein Data Bank (PDB) com o código de acesso 4TZD.

3.2. Interações da ConM/dinucleotídeo

A densidade eletrônica do dinucleotídeo contornada a 3σ foi encontrada na região polar central da cavidade do tetrâmero (Figura 1). O ligante forma pontes de hidrogênio com His127 das cadeias A, D e E. Os átomos N1, N6 e N7 da Adenina 1 formam pontes de hidrogênio com His 127/A de $3.2 \text{ \AA}$, $3.0 \text{ \AA}$ e $3.1 \text{ \AA}$. O átomo de oxigênio da Pentose 1 (O3) forma ponte de hidrogênio com His 127/E de $3.4 \text{ \AA}$. O átomo de oxigênio (O2) do

grupamento fosfato interage por pontes de hidrogênio com His 127/D de 2.8 Å. Os átomos O3 e O4 da pentose 2 interagem respectivamente com His 127/D e His 127/E, por pontes de hidrogênio de 2.6 Å e 2.8 Å. Os átomos da adenina 2, N3 e N9 interagem com His 127/E por pontes de hidrogênio de 2.3 Å e 3.0 Å, respectivamente. Algumas interações do complexo ConM/dinucleotídeo são mostrados na Fig. 1B e na tabela 2.

3.3 Interações da ConM/IL-1 β

A densidade eletrônica do primer da IL-1 β contornada a 3 σ foi encontrada entre o dímero não-canônico da lectina, onde apenas quatro nucleotídeos foram encaixados. Os fragmentos do primer foram encaixados no mapa de densidade eletrônica e submetido a um ciclo de refinamento posicional (Fig. 2A). Os nucleotídeos (GCTC) são fragmentos do primer próximo da porção 3'. O primer deve ter sido fragmentado durante o processo de cristalização ou foi perdido nos experimentos de difração. Os nucleotídeos são estabilizados por interações de Van der Waals e pontes de hidrogênio. O dinucleotídeo Citosina/Timina forma pontes de hidrogênio com His127, Ser110, Asp192, Thr194, His51 da cadeia A, e Ser190 da cadeia D (Fig. 2B), enquanto que o Guanina/Citosina dinucleotídeo forma pontes de hidrogênio com Lys114, Ser190 da cadeia A e His127, Asp192 da cadeia D (Fig. 3). Todas as medidas estão na tabela 2.

3.4 Docking molecular da ConM com o primer da Interleucina-1 β

Uma vez que a estrutura cristalina do complexo ConM/IL-1 β apresentou apenas quatro nucleotídeos em um arranjo não biológico da lectina, nos investigamos através da simulação do docking molecular, como o primer completo poderia se ligar na lectina em um arranjo

biológico, chamado de dímero canônico. O melhor resultado mostrou que os nucleotídeos do primer interagem com His127, His51 e Lys114 das duas cadeias do dímero. O valor de energia (E value) foi -577.65 Kcal/mol (Fig.4).

4. Discussão

Lectinas podem decodificar a informação contida na estrutura de oligossacarídeos da superfície celular [47], elas podem se ligar a receptores na membrana e estimular a ativação de linfócitos, induzir o crescimento celular e a proliferação celular [48]. IL-1 β , produzida por macrófagos e linfócitos B, é uma citocina que está envolvida na ativação de linfócitos assim como na inflamação, proliferação celular, diferenciação, apoptose e progressão de tumor [24]. As lectinas de plantas possuem atividades antitumorais via morte celular programada [49] e é sugerido que esse efeito esteja associado com a habilidade de modular o crescimento, diferenciação, proliferação e apoptose, mediada por receptores de superfície celular [50]. Além disso, alguns estudos usando a lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr), indicam um papel na indução da apoptose pela ligação das lectinas a receptores glicosilados na superfície das células tumorais [51]. Lectinas de leguminosas são capazes de se ligar e formar complexos com o DNA [35]. As informações corroboraram com os dados obtidos nesse trabalho, que lectinas são capazes de interagir com ácidos nucleicos, assim sugerimos uma possível interação estrutural entre lectina-DNA.

Analises dos dados cristalográficos da ConM/dinucleotídeo mostra densidades na região central do tetrâmero da proteína. O dinucleotídeo livre interage com três resíduos His127 presentes nessa região. Similarmente, os dados cristalográficos da ConM/IL-1 β mostram densidades na região central do dímero não-canônico da proteína. Na estrutura, o primer interage com His127, Ser110, Asp192, Thr194, His51, Lys114, Ser190 da cadeia A e

His127, Ser190, Asp192 da cadeia D. O docking molecular mostrou que o primer pode interagir com a ConM pela His127 (Fig. 4) e pode interagir com His51 e Lys114 também, de cada cadeia na forma de dímero, próxima a região onde encontramos as densidades dos nucleotídeos. De acordo com esses resultados, é claro que essa região ajuda na interação graças aos aminoácidos. A serina e treonina pertencem ao grupo polar, e a histidina ao grupo carregado positivamente, então, é sugerido que o sucesso da ligação deva ocorrer pela diferença entre as cargas, uma vez que a molécula de DNA é predominantemente negativa e o reconhecimento dos ácidos nucleicos envolvem interações específicas entre as macromoléculas de diferentes propriedades eletrostáticas [35]. Para ser reconhecido por proteínas, um número de cadeias laterais de aminoácidos podem servir para formar pontes de hidrogênio com o DNA [52] e um número de aminoácidos envolvidos nessa interação é mais frequente como Gln, Glu, Ser, Lys, Asn, Arg, Thr, His e Cys [36].

Lectinas da tribo Diocleinae tem sido estudadas e análises das sequências mostram que essas lectinas apresentam similaridades [53]. A sequência da ConM mostrou 98% de homologia com a ConA [25] e essas análises de sequências de aminoácidos mostram que os resíduos His127, Ser110, Thr194, Ser190, His51 e Lys114 são conservados nessas lectinas que são as que interagem com os fragmentos de primer e com o dinucleotídeo livre. O aminoácido Asp192 é o único que não é conservado em todas as lectinas (ausente na ConA e ConBr), no entanto é do grupo dos carregados negativamente, mas interage com a molécula através de pontes de hidrogênio. Ser110 e Thr194 também ajudam a estabilizar a região hidrofóbica nas interações da ConM/AIA (Ácido Indolacético) [13].

A interação ConM/IL-1 β pode funcionar como fator de transcrição, podendo aumentar a produção de pro-IL-1 β , uma vez que a pro-IL-1 β é precursora do IL-1 β [24], para participar de atividades como inflamação, proliferação celular, progressão de tumor e apoptose. Por outro lado, ConM/dinucleotídeo e a interação do primer podem funcionar como agentes

mitogênicos também, porque lectinas mitogênicas podem induzir a proliferação celular, elucidando alguns mecanismos como o crescimento celular e desenvolvimento [48, 31] e as lectinas de plantas já mostram essas características [29, 54, 55, 31, 56].

Bases nitrogenadas e fosfatos do DNA podem ser considerados fortes candidatos para mediar a ligação entre a molécula e a lectina [35]. Nos dois complexos (ConM/IL-1 β e ConM/dinucleotídeo) todas as bases dos nucleotídeos interagiram com a His127 de diferentes cadeias por pontes de hidrogênio. Além disso, algumas lectinas de leguminosas apresentam melhor interação com pequenas sequências, o que pode explicar a interação com primers e fragmentos de DNA [35].

ConM assume uma oligomerização tetramérica e os arranjos tetraméricos das lectinas “ConA-like” são bem conhecidos e já foram mostrados por cromatografia, eletroforese e espectrometria de massa [57]. A habilidade das lectinas de formar tetrâmeros pode ser fisiologicamente relevante em ligação a receptores [25]. O equilíbrio dímero-tetrâmero também depende na conformação dos resíduos de histidina ou asparagina na posição 131, que são determinantes para permitir a interação entre os dímeros e o tetrâmero, porque a conformação de aminoácidos pode alterar a oligomerização das lectinas de Dicoileinae [58, 59].

Delatorre e colaboradores [13] mostraram que na região simétrica da lectina ConM, quatro moléculas de AIA ligaram na região central do tetrâmero e esse arranjo ajuda na estabilização através de interações hidrofóbicas entre essas moléculas. Nós sugerimos que a presença do dinucleotídeo livre na região central também ajuda na estabilização da estrutura do tetrâmero. Quando a estrutura tetramérica da ConM/IL-1 β é gerada por simetria cristalográfica, podemos ver que os nucleotídeos podem formar uma estrutura similar à dupla fita na região central do tetrâmero, isso pode proporcionar interações entre a lectina e a dupla fita do DNA (Fig. 5).

De acordo com Breitwieser [35], algumas lectinas de leguminosas, incluindo a ConM, são capazes de interagir com DNA e formar complexos. Apesar de algumas pequenas diferenças na sua sequência primária e na estrutura tridimensional, este grupo de proteínas difere em várias propriedades biológicas, que as tornam um modelo excelente para as relações de funções relacionadas com a estrutura [58, 59, 53]. Elas tem a capacidade para interagir fortemente com a molécula de DNA e o complexo pode ser recuperado intacto, não alterando os componentes da macromolécula [35], mas isso nunca foi observado estruturalmente, até agora.

Essa interação torna estas proteínas boas mediadoras das moléculas de DNA nas células. Sabe-se que a ConA induz a autofagia, estimulada pela ligação à glicoproteínas ou polissacarídeos da superfície celular e depois internalizada na célula pela endocitose mediada por clatrina [60, 61]. Uma vez que as lectinas de leguminosas podem ser internalizadas, é sugerido que estas interações entre as lectinas e DNA podem interferir em mecanismos, agindo como um fator de transcrição. De outro modo, a capacidade de se ligar a fragmentos de DNA ajuda a compreender algumas atividades biológicas, incluindo o aumento de IL-1 β em processos inflamatórios, apoptose e mecanismos mitogênicos. No entanto, estes estudos ainda precisam ser investigados para melhor entendimento.

5. Agradecimentos

Esse estudo foi parcialmente financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Gostaríamos de agradecer também ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Campinas-Brasil. P.D., B.A.M.R. e B.S.C. são pesquisadores do CNPq.

6. Referências

- [1] Peumans WJ, Van Damme EJM. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiology* 1995; 109:347-352.
- [2] Lis H, Sharon N. Lectins: Carbohydrate-specific Proteins that Mediate Cellular Recognition. *Chemical Reviews* 1998; 98:637-674.
- [3] Calvete JJ, Thole HH, Raida M, Urbanke C, Romero A, Grangeiro TB, Ramos MV, Almeida da Rocha IM, Guimarães FN, Cavada BS. Molecular Characterization and Crystallization of Diocleinae lectins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1999; 1430: 367-375.
- [4] Van Damme EJM, Barre A, Rougé P, Peumans WJ. Cytoplasmic/nuclear plant lectins: A New Story. *Trends in Plant Science* 2004; 9: 484-489.
- [5] Jiang SY, Ma Z, Ramachandran S. Evolutionary history and stress regulation of the lectin superfamily in higher plants. *BMC Evolutionary Biology*, 2010; 10:79-102.
- [6] Sharon N, Lis H. History of Lectins: From Hemagglutinins to Biological Recognition Molecules. *Glycobiology* 2004; 14:53–62.
- [7] Singh RS, Bhari R, Kaur HP. Characteristics of yeast lectins and their role in cell-cell interactions. *Biotechnology Advances* 2011; 29:726-731.
- [8] Ribeiro A, Catarino S, Ferreira RB.. Multiple lectin detection by cell membrane affinity binding. *Carbohydrate Research* 2012; 352: 206-210.
- [9] Abdon APV, Souza GC, Souza LNC, Vasconcelos RP, Castro CA, Guedes MM, Lima RCP, Moreira RA, Monteiro-Moreira ACO, Campos AR. Gastroprotective Potential of Frutalin, a D-galactose Binding Lectin, Against Ethanol-induced Gastric Lesions. *Fitoterapia* 2012; 83:604-608.
- [10] Silva HC, Nagano CS, Souza LAG, Nascimento KS, Isidro R, Delatorre P, Rocha BAM, Sampaio AH, Assreuy AMS, Pires AF, Damasceno LEA, Marques-Domingos GFO, Cavada

- 350 BS. Purification and Primary Structure Determination of a Galactose-Specific Lectin From
 351 *Vatairea guianensis* Aublet Seeds That Exhibits Vasorelaxant effect. *Process Biochemistry*
 352 2012; 47:2347-2355.
- 353 [11] Nóbrega RB, Rocha BAM, Gadelha CAA, Santi-Gadelha T, Pires AF, Assreuy MAS,
 354 Nascimento KR, Nagano CS, Sampaio AH, Cavada BS, Delatorre P. Structure of
 355 Diocleavirgatalectin: relation between carbohydrate binding site and nitric oxide production,
 356 *Biochimie* 2012; 94:900-906.
- 357 [12] Bezerra MJ, Rodrigues NV, Pires A de F, Bezerra GA, Nobre CB, Alencar KL, Soares
 358 PM, do Nascimento KS, Nagano CS, Martins JL, Gruber K, Sampaio AH, Delatorre P, Rocha
 359 BA, Assreuy AM, Cavada BS. Crystal structure of Diocleaviolacealelectin and a comparative
 360 study of vasorelaxant properties with *Dioclea rostrata* lectin. *International Journal of*
 361 *Biochemistry & CellBiology* 2013; 45:807-815.
- 362 [13] Delatorre P, Silva-Filho JC, Rocha BA, Santi-Gadelha T, da Nóbrega RB, Gadelha
 363 CA, do Nascimento KS, Nagano CS, Sampaio AH, Cavada BS. Interactions between indole-
 364 3-acetic acid (IAA) with a lectin from *Canavalia maritima* seeds reveal a new function for
 365 lectins in plant physiology. *Biochimie* 2013; 95:1697-1703.
- 366 [14] Alencar NM, Assreuy AM, Alencar VB, Melo SC, Ramos MV, Cavada BS, Cunha
 367 FQ, Ribeiro RA. The galactose-binding lectin from *Vatairea macrocarpa* seeds induces in
 368 vivo neutrophil migration by indirect mechanism. *International Journal of Biochemistry &*
 369 *Cell Biology* 2003; 35:1674-81.
- 370 [15] Alencar NM, Assreuy AM, Criddle DN, Souza EP, Soares PM, Havt A, Aragão
 371 KS, Bezerra DP, Ribeiro RA, Cavada BS. *Vaitarea macrocarpa* induces paw edema with
 372 leucocyte infiltration. *Protein & Peptide Letters* 2004; 11:195-200.

- 373 [16] Matos AB, Artiles GR, Valdés LH, Oliver PH. Revisión Taxonômica del Género
374 Canavalia DC. (Leguminosae-Papilionoideae) em Cuba, Revista de la Academia Colombiana
375 de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales 2004; 28:157-75.
- 376 [17] Fernandes DC. Avaliação da lectina de *Canavalia maritima* Thours, em evento vascular
377 da inflamação aguda. Brasil: Universidade Federal do Ceará; Dissertação (Mestrado
378 Acadêmico em Ciências Fisiológicas); 2008.
- 379 [18] Alencar VB, Alencar NM, Assreuy AM, Mota ML, Brito GA, Aragão KS, Bittencourt
380 FS, Pinto VP, Debray H, Ribeiro RA, Cavada BS. Pro-inflammatory effect of *Arum*
381 *maculatum* lectin and role of resident cells. International Journal of Biochemistry & Cell
382 Biology 2005b; 37:1805-1814.
- 383 [19] Freire MG, Desouza IA, Silva AC, Macedo ML, Lima MS, Tamashiro WM, Antunes
384 E, Marangoni S. Inflammatory responses induced in mice by lectin from *Talisia esculenta*
385 seeds. Toxicon 2003; 42:275-280.
- 386 [20] Santi-Gadelha T, de Almeida Gadelha CA, Aragão KS, de Oliveira CC, Lima Mota
387 MR, Gomes RC, de Freitas Pires A, Toyama MH, de Oliveira Toyama D, de Alencar
388 NM, Criddle DN, Assreuy AM, Cavada BS. Purification and biological effects of *Araucaria*
389 *angustifolia* (Araucariaceae) seeds lectin. Biochemical and Biophysical Research
390 Communications 2006; 350:1050-55.
- 391 [21] Pinto NV, Cavada BS, Brito LF, Pereira RI, da Silva MT, Castro RR, de Freitas Pires
392 A, Assreuy AM. Effects of *Canavalia* lectins on acute inflammation in sensitized and non-
393 sensitized rats. Inflammation 2013; 36:713-722.
- 394 [22] Lee CJ, Chen LG, Liang WL. Anti-inflammatory effects of *Punica granatum* Linne in
395 vitro and in vivo. Food Chemistry 2010; 118:315-322.
- 396 [23] Dujmovic I, Mangano K, Pekmezovic T, Quattrocchi C, Mesaros S, Stojavljevic
397 N, Nicoletti F, Drulovic J. The analysis of IL-1 beta and its naturally occurring inhibitors in

- multiple sclerosis: the elevation of IL-1 receptor antagonist and IL-1 receptor type II after steroid therapy. *Journal of Neuroimmunology* 2009; 207:101-106.
- [24] Zhao R, Zhou H, Su SB. Critical role for interleukin-1 β in the progression of autoimmune diseases. *International Immunopharmacology* 2013; 17:658-669.
- [25] Gadelha CA, Moreno FB, Santi-Gadelha T, Cajazeiras JB, Rocha BA, Assreuy AM, Lima Mota MR, Pinto NV, Passos Meireles AV, Borges JC, Freitas BT, Canduri F, Souza EP, Delatorre P, Criddle DN, de Azevedo WF Jr, Cavada BS.. Native Crystal Structure of a Nitric Oxide-releasing Lectin from the Seeds of *Canavalia maritima*, *Journal of Structural Biology* 2005; 152:185-194.
- [26] Tarrant JM. Blood Cytokines as Biomarkers of In Vivo Toxicity in Preclinical Safety Assessment: Considerations for Their Use. *Toxicological Sciences* 2010; 117:4–16.
- [27] Wahab S, Hussain A. Cytokines as targets for immunomodulation. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 2013; 5: 60-64.
- [28] Nowell PC. Phytohemagglutinin: An initiator of mitosis in cultures of normal human leucocytes. *Cancer Research* 1960; 20:462-464.
- [29] Harris H, Robson EB. Precipitin reactions between extracts of seeds of *Canavalia ensiformis* (Jack Bean) and normal and pathological serum proteins. *Vox Sang* 1963; 8:348-355.
- [30] Coelho AM, Giralt EG. Loss of mitogenic activity by immobilized lectins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1976; 72:790-795.
- [31] Vikram D, Kshitija D, Jatinder S, Kumar SA, Kumar AS, Singh KS. Purification and characterization of an Antiproliferative and mitogenic plant lectin from tubers of *Arisaema speciosum*. *Pharmacognosy Journal* 2010; 2:266–277.
- [32] Kilpatrick DC. Mechanisms and Assessment of Lectin-Mediated Mitogenesis. *Molecular Biotechnology* 1999; 11:55 – 65.

- 423 [33] Borrebaeck CAK, Rougé P. Mitogenic properties of structurally related *Lathyrus* Lectins.
424 Archives of Biochemistry and Biophysics 1986; 248:30-34.
- 425 [34] Ducruix A, Giegé R. Crystallization of Nucleic Acids and Proteins: A Practical
426 Approach, 2nd edition, New York, Oxford University Press; 1999.
- 427 [35] Breitwieser OV. Leguminous Lectins Bind Non-specifically to DNA. Germany: Faculty
428 of the University of Cologne; Dissertation (Doctorate in Mathematics and Natural Sciences);
429 2003.
- 430 [36] Bloomfield VA, Donald M, Crothers DM, Tinoco Jr I. Nucleic Acids: Structure,
431 Properties and Functions. University Science Books-California-USA; 2000.
- 432 [37] Wienhues U, Hosokawa K, Höveler A, Siegmann B, Doerfler W. Laboratory Methods: A
433 Novel Method for Transfection and Expression of Reconstituted DNA-protein Complexes in
434 Eukaryotic Cells. DNA 1987; 6:81-89.
- 435 [38] Leslie AGW. User Guide, MOSFLM Version 5.50. MRC Laboratory of Molecular
436 Biology, Cambridge, England; 1997.
- 437 [39] Collaborative Computacional Project, Number 4. The CCP4 Suite: Programs for
438 Crystallography. ActaCrystallographica 1994; 50:760–763.
- 439 [40] Vargin A, Teplyakov A. MOLREP: An Automated Program for Molecular
440 Replacement. Journal of Applied Crystallography, 1997; 30:1022–1025.
- 441 [41] Murshudov GN, Skubák P, Lebedev AA, Pannu NS, Steiner RA, Nicholls RA, Winn
442 MD, Long F, Vagin AA. REFMAC5 For the Refinement of Macromolecular Crystal
443 Structures. ActaCrystallographica 2011; 67:355-367.
- 444 [42] Emsley P, Cowtan K. Coot: Model-building Tools for Molecular Graphics. Acta
445 Crystallographica, 2004; 60:2126–2132.

- 446 [43] Delatorre P, Rocha BA, Souza EP, Oliveira TM, Bezerra GA, Moreno FB, Freitas
447 BT, Santi-Gadelha T, Sampaio AH, Azevedo WF Jr, Cavada BS. Structure of a lectin from
448 Canavalia gladiata seeds: new structural insights for old molecules, BMC Structural Biology
449 2007; 7:52-60.
- 450 [44] Delano WL. The PyMol Molecular Graphics System, Schrodinger, LLC; 2004.
- 451 [45] Dijk MV, Bonvin AMJJ. 3-D-DART: a DNA structure modeling server. Nucleic Acids
452 Research, 37 (web server Issue): W235-W239doi:10.1093/nar/gpk287.
- 453 [46] Ritchie DW, Kemp GJL. Protein docking using spherical polar Fourier correlations,
454 Proteins, 2000; 39:178–194, 2000.
- 455 [47] Sanz-Aparicio J, Hermoso J, Grangeiro TB, Calvete JJ, Cavada BS. The crystal structure
456 of Canavalia brasiliensis lectin suggests a correlation between its quaternary conformation
457 and its distinct lectin biological properties from Concanavalin A. FEBS Letters, v.405, p. 114-
458 118, 1997.
- 459 [48] Maciel EVM. Determinação do efeito mitogênico das lectinas de *cratylia mollis* sobre
460 linfócitos humanos utilizando um método colorimétrico. Brasil: Universidade Federal de
461 Pernambuco; Dissertação (Mestrado Acadêmico em Bioquímica); 2002.
- 462 [49] Li CY. Galanthusnivalis agglutinin (GNA)-related lectins: traditional proteins,
463 burgeoning drugs. CurrentChemicalBiology, 2009; 3:324–33.
- 464 [50] Castillo-Villanueva A, Abdullaev F. Lectinas Vegetales y sus Efectos em el
465 Cáncer. Revista de Investigación Clínica 2005; 57:55-64.
- 466 [51] Barbosa T, Arruda S, Cavada B, Grangeiro TB, de Freitas LA, Barral-Netto M. In Vivo
467 Lymphocyte Activation and Apoptosis by Lectins of the Diocleinae Subtribe. Memórias do
468 Instituto Oswaldo Cruz 2001; 95: 673-678.

- 469 [52] Sauer RT, Jordan SR, Pabo CO. Lambda Repressor: A Model System for Understanding
470 Protein-DNA Interactions and Protein Stability. *Advances in Protein Chemistry* 1990; 40:1-
471 61.
- 472 [53] Perez G, Perez C, Sousa-Cavada B, Moreira R, Richardson M.. Comparison of the
473 Amino Acid Sequences of the Lectins from Seeds of *Dioclea lehmanni* and *Canavalia*
474 *maritima*. *Phytochemistry* 1991; 30:2619-2621.
- 475 [54] Suvachittanont W, Jaranchavanapet P. Mitogenic effect of *Parkia speciosa* seed lectin on
476 human lymphocytes. *Planta Medica* 2000; 66:699-704.
- 477 [55] Wong JH, Wong CC, Ng TB. Purification and characterization of a galactose-
478 speciclectin with mitogenic activity from pinto beans. *Biochemica et Biophysica Acta* 2006;
479 1760:808–813.
- 480 [56] Chan YS, Wong JH, Fang EF, Pan W, Ng TB. Isolation of a glucosamine binding
481 leguminous lectin with mitogenic activity towards splenocytes and anti-proliferative activity
482 towards tumor cells. *Plos one* 2012; 7:1-13.
- 483 [57] Delatorre P, Rocha BA, Gadelha CA, Santi-Gadelha T, Cajazeiras JB, Souza
484 EP, Nascimento KS, Freire VN, Sampaio AH, Azevedo WF Jr, Cavada BS. Crystal Structure
485 of a Lectin From *Canavaliamaritima* (ConM) in Complex with Trehalose and Maltose
486 Reveals Relevant Mutation in ConA-like Lectins. *Journal of Structural Biology* 2006;
487 154:280-286.
- 488 [58] Cavada BS, Barbosa T, Arruda S, Grangeiro TB, Barral-Netto M.. Revisiting Proteus:
489 Do Minor Changes in Lectin Structure Matter in Biological Activity? Lessons From and
490 Potential Biotechnological Uses of the Diocleinae Subtribe Lectins, *Current Protein & Peptide*
491 *Science* 2001; 2:123–135.
- 492 [59] Moreno FB, Delatorre P, Freitas BT, Rocha BA, Souza EP, Facó F, Canduri F, Cardoso
493 AL, Freire VN, Lima Filho JL, Sampaio AH, Calvete JJ, De Azevedo WF Jr, Cavada

BS.Crystallization and Preliminary X-ray diffraction Analysis of the Lectin from *Canavalia gladiata* Seeds. *Acta Crystallographica* 2004; 60:1493–1495.

[60] Chang CP, Yang MC, Liu HS, Lin YS, Lei HY. Concanavalin A induces autophagy in hepatoma cells and has a therapeutic effect in a murine in situ hepatoma model. *Hepatology* 2007; 45:286–296.

[61] Lei HY, Chang CP. Induction of Autophagy by Concanavalin A and Its Application in Anti-Tumor Therapy. *Autophagy* 2007; 4:402-404.

Fig.1. (A) Dinucleotídeo posicionado no mapa de densidade eletrônica e a His127 de cada cadeia. (B) Algumas interações entre o dinucleotídeo e a His das cadeias A e E

Fig. 2: (A) Fragmentos do primer da Interleucina-1 β entre os dímeros não-canônicos. (B) O dinucleotídeo CT forma pontes de hidrogênio com His 127, Ser 110, Asp 192, Thr 194, His 51 da cadeia A, e Ser 190 da cadeia D.

Fig. 3: O dinucleotídeo GC forma pontes de hidrogênio com Lys 114, Ser 190 da cadeia A e His 127, Asp 192 da cadeia D.

Fig. 4: (A) Docking molecular do dímero da ConM (2CWM) com o primer da interleucina-1 β (Verde). (B) Interação do primer com His 127 da cadeia A (laranja). (C) Primer interagindo com His 127 da cadeia D (cinza).

Fig. 5: Estrutura tetramérica da ConM/IL-1 β gerada por simetria cristalográfica. O dinucleotídeo forma uma estrutura similar à dupla fita na região central do tetrâmero.

544 **Tabela 1. Valores relacionados à coleta de dados, refinamento e qualidade das**
 545 **estruturas.**

Parâmetros	ConM/IL-1 β	ConM/dinucleotídeo
<i>Coleta de dados</i>		
Grupo especial	F23	I222
Parâmetros Cella Unitária (Å)		
A	192.2	140.6
B	192.2	140.6
C	192.2	199.0
Total de reflexões	24.627	409.180
Número de reflexões únicas	9.205	32.858
Limites de resolução (Å)	48.06-3.20 Å	38.29 - 3.20 Å
R _{merge} (%)	14.0 (43.9)	22.5 (31.3)
Completeza (%)	94.7 (97.6)	99.3 (99.3)
Multiplicidade	2.7	3.9
(I)/ σ	5.7 (2.1)	3.82 (2.0)
Comprimento de onda (Å)	1.42	1.42
Número de monômeros na unidade assimétrica	2	6
<i>Substituição molecular</i>		
wR _{fac} /Coeficiente de correlação	43.4/61.3	44.1/41.7
<i>Refinamento</i>		
R _{factor} (%)	24.70	21.62
R _{free} (%)	31.49	26.71

Número de moléculas de água	101	137
-----------------------------	-----	-----

Gráfico de Ramachandran

Resíduos em região mais favoráveis (%)	83.8	88.24
Resíduos em regiões favoráveis (%)	16.20	11.76
Resíduos em regiões não favoráveis (%)	0	0

546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564

565 **Tabela 2.** Distância dos átomos entre o dinucleotídeo, IL-1 β e resíduos de aminoácidos.

Resíduo de Aminoácido	Cadeia	Molécula	Átomo	Distância Aminoácido – molécula
Dinucleotídeo				
HIS 127	A	Adenina 1	N1	3.2 Å
			N6	3.0 Å
			N7	3.1 Å
	D	Grupamento Fosfato	O2	2.8 Å
		Pentose 2	O3	2.6 Å
	E			O4
		Pentose 1	O3	3.4 Å
		Adenina 2	N3	2.3 Å
			N9	3.0 Å
IL - 1β				
HIS 127	A	Citosina 1	O2	3.1 Å
			N1	3.0 Å
	D	Guanina	N9	2.8 Å
			N7	2.9 Å
SER 110	A	Pentose 1	O3	2.3 Å
ASP 192	A	Grupamento fosfato 1	OP2	2.7 Å
			OP2	2.9 Å
	D	Grupamento	OP2	2.9 Å

		fosfato 2	OP2	3.1 Å
THR 194	A	Grupamento fosfato 1	OP1	3.3 Å
SER 190	A	Grupamento fosfato terminal 2	OP1	3.3 Å
		Citosina 2	N4	3.4 Å
	D	Grupamento fosfato terminal 1	OP1	3.0 Å
HIS 51	A	Timina	O2	2.8 Å
LYS 114	A	Pentose 2	O4	3.2 Å
		Grupamento fosfato 2	OP1	2.8 Å

566

567

568

569

570

571

572

573

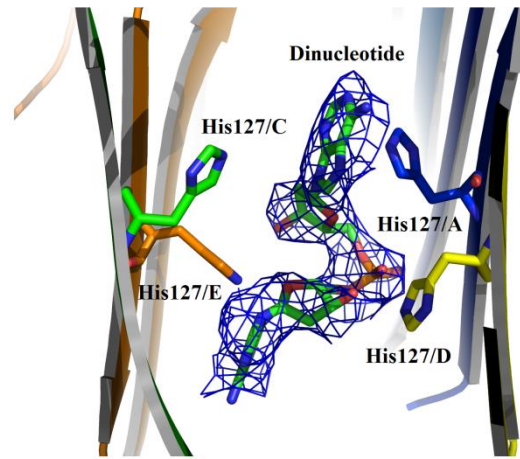
574

575

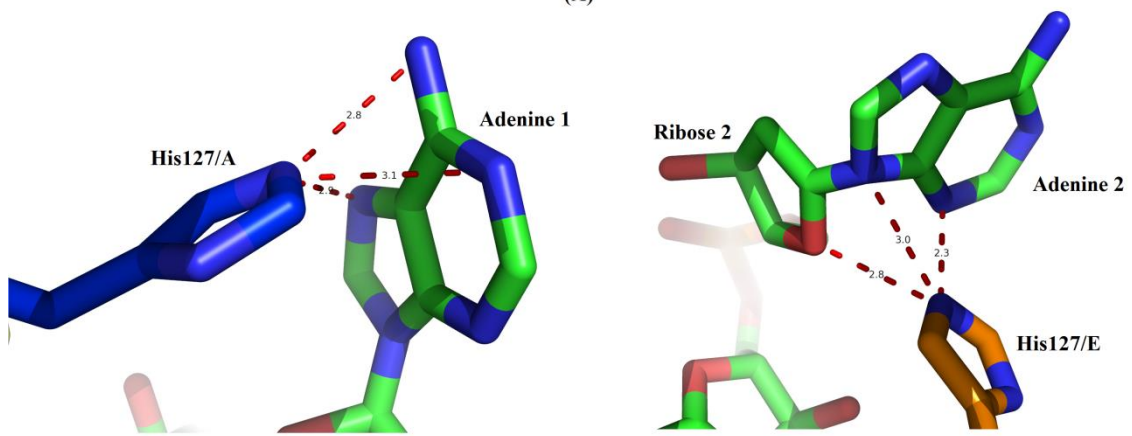
576

577

578



(A)



(B)

579

580

581

582

583

584

585

586

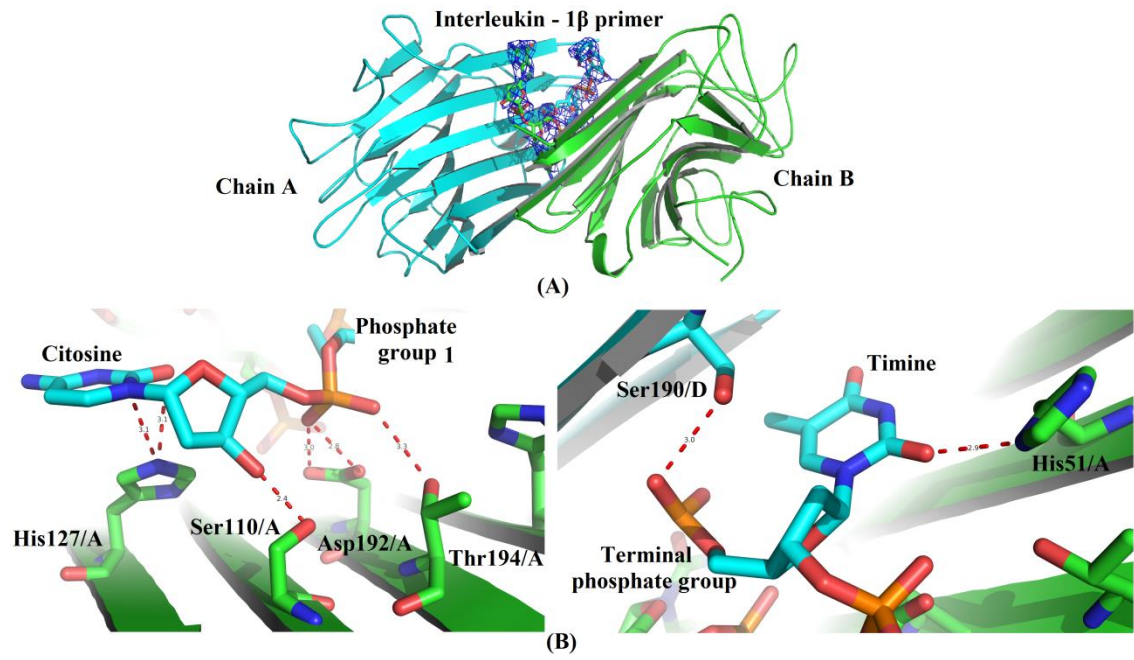
587

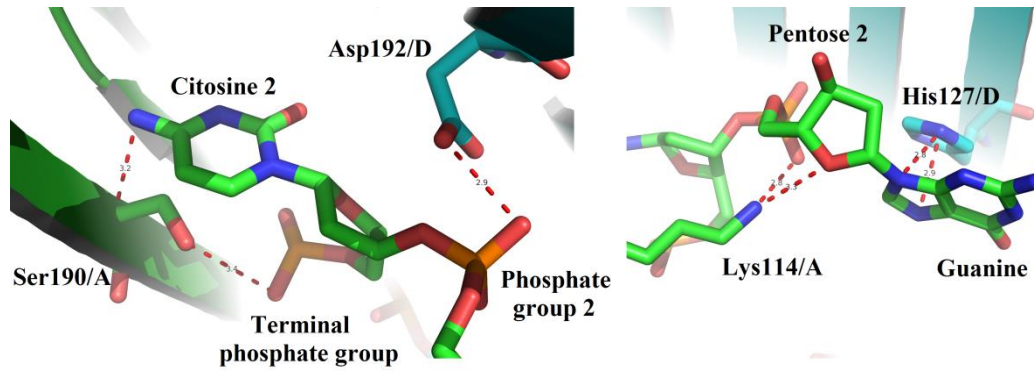
588

589

590

591





609

610

611

612

613

614

615

616

617

618

619

620

621

622

623

624

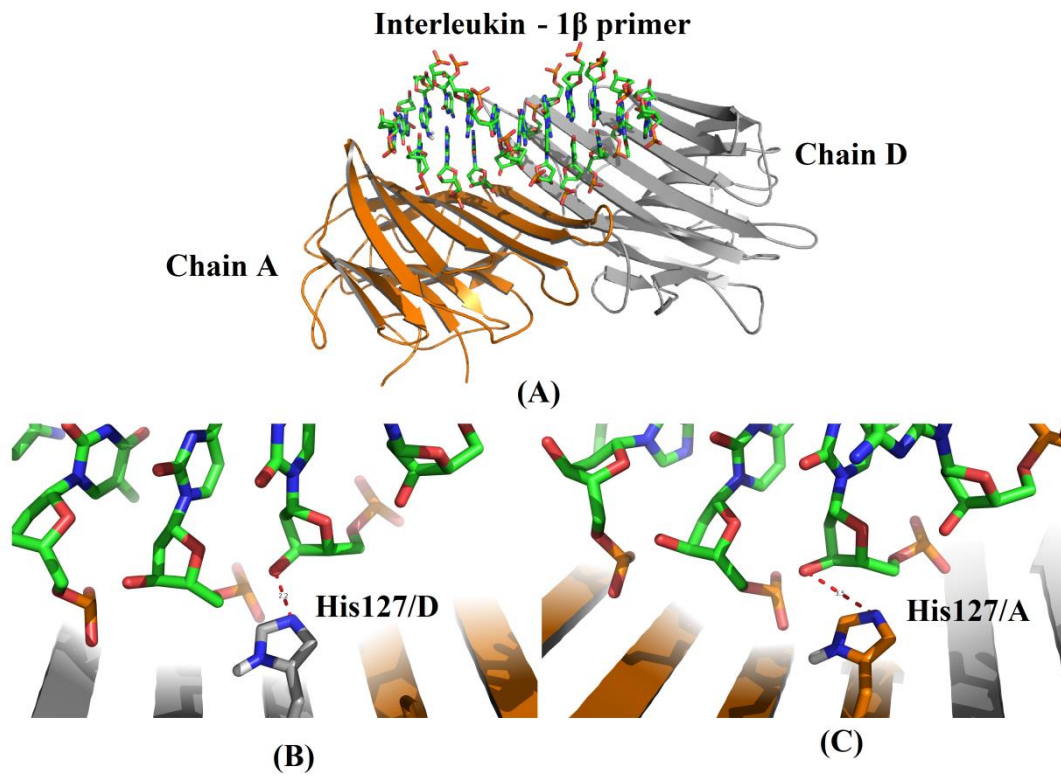
625

626

627

628

629



630

631

632

633

634

635

636

637

638

639

640

641

642

643

644



645

646

647

648

649

650

651

652

653

654

655

656

657

658

659

660

661

662

Crystal structures of *Canavalia maritima* lectin (ConM) in complex with a dinucleotide
and with interleukin-1 β primer

**Derek Barroso Holanda Asp Vieira¹, Bruno Anderson Matias da Rocha², Claudener
Souza Teixeira^{2,3}, José Caetano da Silva Filho², Eleonidas Moura Lima¹, Carlos Alberto
de Almeida Gadelha¹, Benildo Sousa Cavada² and Plínio Delatorre^{a*}**

1) Departamento de Biologia Molecular, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa,
Brazil.

2) Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará,
Fortaleza, Brazil.

3) Unidade Descentralizada de Campos Sales, Universidade Regional do Cariri, Campos
Sales, Brazil.

Corresponding author. Tel./fax: +558332167787.

E-mail address: pldelatorre@gmail.com (P. Delatorre).

Legume lectins are historically recognized as carbohydrate-binding proteins, and this property is roughly linked to the majority of their biological activities, such as pro- and antiinflammatory processes, apoptosis and mitogenic mechanisms. However, several studies have demonstrated the capability of these proteins to bind diverse other compounds, such as phytohormones and hydrophobic molecules, although the biological relevance of these interactions remains elusive. In the present work, we extend this spectrum of chemical partners reporting two crystal structures of ConM, a lectin isolated from *Canavalia maritima* seeds, in complex with oligonucleotides. In one structure, an electron density map corresponding to two covalently linked adenine nucleotides was found in the polar central cavity of the lectin tetramer, while in the second one a fragment of four nucleotides from the interleukin-1 β primer was fitted in an electron density map present in the interface of ConM non-canonical dimer. The oligonucleotides stabilization involves H-bonds and electrostatic forces with a specific histidine residue. Based on these crystallographic results and in a molecular docking simulation, it is hypothesized that the lectin may function as a transcription factor, which could help us to understand some of their biological activities.

Keywords: Lectins, *Canavalia maritima*, dinucleotides, primer, histidine

1. Introduction

Proteins that can interact with carbohydrates are distributed in the most diverse forms of life. Among them are lectins that can be found in vertebrates, invertebrates, microorganisms and viruses. They are proteins that have at least one non-catalytic site which binds to mono or oligosaccharides reversibly and with high specificity [1, 2]. In the plant kingdom, are widely distributed in various species of plants [3]. Plant lectins are considered a very heterogeneous group of proteins, once comparative biochemical studies clearly show that they differ from each other as regards the biochemical and physicochemical properties, molecular structure, biological activity, specificity and property binding to carbohydrates [4, 5]. They can be found on the cell surface or intracellular, being able to interact with components of biological fluids, to act as recognition molecules within the cell and decrypt the biological information that is presented in the form of glycoconjugates molecules, cells or organisms [6, 7, 8]. The variability of glycans on the cell surface allow them to function as signaling molecules and interaction with lectins are crucial steps in many biological processes [9, 10].

Legume lectins are the best studied plant lectins, being used as model in structural studies [11, 12, 13]. These lectins may exhibit anti or pro-inflammatory actions, depending upon the route of administration, when administered locally have pro-inflammatory and immunostimulating activity [14, 15].

Canavalia genus, which belongs to Diocleinae tribe, stands by several morphological characters that define these plants as a homogeneous taxonomic entity, which serves as a reference for quick identification of other genres that are part of this subtribe [16]. *Canavalia maritima* Lectin (ConM) had pro-inflammatory effects when administered by subcutaneous intraplantar injection in rats [17]. Some studies evaluated the importance of the carbohydrate

binding site on the effects of lectins in inflammation, in the pro [18, 19] or anti-inflammatory actions [20, 21]. The inflammatory process is the first physiological defense in the human body [22] and all vascular processes are modulated by various chemical mediators, including the cytokines. Interleukin-1 is a family of cytokines that plays an important role in the immunoinflammatory cascade [23]. It is known that the IL-1 family has two forms: IL-1 α and IL-1 β . IL-1 β has several inflammatory and immunomodulatory activities, it is produced by monocytes and macrophages and also by T cells, endothelial cells and others [24]. It is suggested that this protein may activate a cascade of inflammatory mediators with participation of histamine, cytokines primary (IL-1 and TNF- α) and prostaglandin chloride channels [17]. ConM contribute in this process by means of nitric oxide release in relaxation endothelial rat aortic rings [25]. Most cytokines have short half-lives [26] because they are produced in immune response, that is why they are not stored as preformed proteins, they have to be synthesized by gene transcription [27]. Through a stimulus, signals are sent to the nucleus to induce the 31kDa IL-1 β precursor and then localizes in the cytosol in its biologically inactive form; it turns the 17.5kDa IL-1 β active form when cleaved by caspases-1 in the cytoplasm [24].

Certain plant lectins have mitogenic characteristics, PHA (*Phaseolus vulgaris*) lectin was the first mitogenic agent discovered [28] and this discovery led to other mitogenic lectins like ConA [29], that are capable to stimulate DNA synthesis in T lymphocytes [30]. These lectins can be used to study human diseases and chromosomal abnormality and can elucidate some mechanisms of lymphocyte activation, helping to understand about cell growth and development [31]. ConA was the first plant lectin that was inhibited by simple sugars, concluding that hemagglutination and mitogenic activity are related to the carbohydrate binding activity, moreover, that was the first evidence that glycoconjugates from the cell-surface were involved in the mitogenic activity [32]. Despite the similar structures, the

proteins have different mitogenic properties due to their different carbohydrate specificities [33].

Many biological reactions involve protein interaction with nucleic acids, such as those related to the expression of the genetic message [34]. The DNA molecule is able to interact with many different proteins, specifically or not [35]. The protein interaction with the DNA macromolecule plays a key role in all cellular and regulation of vital functions and this makes one of the most fundamental macromolecules in living organisms [36].

Thus, during the last decades the study of DNA, especially in relation to the interaction of this molecule and proteins in organisms has received particular attention, because once this interaction happens, the molecule transfer into the cells would be facilitated [37,35]. Previous investigations showed that legume lectins are able to bind to the DNA molecule [35], but the structural basis for this recognition remains elusive. This study shows the ConM/dinucleotide and ConM/primer crystals structures complexes and propose a possible Lectin-DNA interaction.

2. Material and methods

2.1. Crystallization and X-ray data collection

The purified lectin from *Canavalia maritima* (ConM) was obtained according to Gadelha and coworkers [25] The lyophilized ConM was solubilized to a concentration of 10 mg/mL in 1mM Tris-HCl buffer pH 7.6 containing 5 mM CaCl_2 and 5 mM MnCl_2 . Dinucleotides from *Bauhinia variegata* DNA fragments at a concentration of 5mM were used for co-crystallization experiments with ConM. Co-crystal was obtained in condition #44 (0.2 M Magnesium formate dehydrate) from Hampton Research Screen I. X-ray diffraction data

was collected from single crystals at 100K, at a wavelength of 1.4727 Å using synchrotron radiation source (MX1 station - Brazilian Synchrotron Light Laboratory-LNLS, Campinas, Brazil). Previously, the crystals were bathed in a cryoprotection solution (crystallization solution and glycerol). A complete data set (120 frames), at a distance of 110 mm from the detector, was collected using a MarMosaic 165 CCD (MAR research), with an exposure time of 42.5 seconds per image and an oscillation of 1°.

In another experiment, the lectin solubilized in 0.1 M Tris-HCl buffer pH 7.6 to a final concentration of 10 mg/mL was co-crystallized with 5 mM of Interleukin-1 β primer (5'CCTGCAATTGACAGAGAGCTCCC3' – Síntese Biotecnologia LTDA). Co-crystals was obtained condition #12 (0.2 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.1 M HEPES sodium 7.5, 30% v/v 2-Propanol) from Hampton Research Screen I kit. X-ray diffraction data was collected in the same conditions of ConM-dinucleotides crystals using synchrotron radiation source (MX2 station - Brazilian Synchrotron Light Laboratory-LNLS, Campinas, Brazil). A complete data set (120 frames), at a distance of 189mm from the detector, was collected using a MarMosaic225 CCD (MAR research), with an exposure time of 60 seconds per image and oscillation of 1°.

The X-ray diffraction data were indexed, integrated and scaled using MOSFLM [38] and SCALA [39] programs. The ConM/dinucleotide co-crystal showed orthorhombic space group I222, while the ConM/IL-1 β complex showed cubic space group F23.

2.2. Molecular replacement and refinement

The ConM/dinucleotide and ConM/IL-1 β crystal structures were solved by molecular replacement using the Molrep software program[40]. The native ConM (PDB code 2CWM) was used as search model for ConM/dinucleotide, while ConM complexed with dimmanoside

Man1-4Man-OMe (PDB code 2P34) was used for ConM/IL-1 β . Score and wRfact values for both procedures are listed in table 1. The molecular models were subjected to several cycles of rigid body refinement and positional refinement using Refmac program[41]. The electron density maps were generated and visualized using Coot program [42]. The loop region (117 to 122 residues) show low electron density in both structures how reported by other studies [43, 11]. The DNA fragment in each structure was fitted in electron density map, being added 137 and 101 water molecules in ConM/dinucleotide and ConM/IL-1 β complexes, respectively. The former crystal structure was subjected to a twin and anisotropic refinement. Both final models were visualized with PyMOL[44].

2.3. Molecular Docking

We investigated how the complete primer could bind to the lectin biological assembly. The primer 3-D model was generated by 3D-DARTserver [45] and was subsequently subjected to molecular docking simulation with ConM canonical dimer (PDB code 2CWM) using HEX program version 6.3 [46]

3. Results

3.1. Overall structure

The unit cell parameters for the orthorhombic crystal structure of the ConM/dinucleotide were as follows: $a = 140.6 \text{ \AA}$, $b = 140.5 \text{ \AA}$, $c = 199.0 \text{ \AA}$. Matthews coefficient was $3.22 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$ indicating the presence of six monomers in the asymmetric unit. The final refinement statistics and structure analysis are shown in Table 1. The refined

structure of this complex is a tetramer in biological assembly consisting of two “canonical” dimers linked by salt bridges between β strands and by ConM/dinucleotide interactions. The atomic coordinates for the structure were deposited in the Protein Data Bank (PDB) with the access code 4TYS.

The unit cell parameters for the cubic crystal structure of the ConM/IL-1 β were as follows: $a = 192.2 \text{ \AA}$, $b = 192.2 \text{ \AA}$, $c = 192.2 \text{ \AA}$. Matthews coefficient was $2.96 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$ indicating the presence of two monomers in the asymmetric unit. The biological assembly is a tetramer, which are linked by salt bridges and primer-lectin interactions. The final refinement statistics and structure analysis are shown in Table 1. The ConM/IL-1 β coordinates are deposited in the Protein Data Bank (PDB) with the access code 4TZD.

3.2. ConM/2-AMP Interactions

The dinucleotide electron density map contoured at 3σ was found in the polar central cavity of the ConM tetramer structure (figure 1). The ligand form H-bonds with His127 from chains A, D and E. The atoms N1, N6 and N7 from Adenine 1 establishes H-bonds with His 127/A of the $3.2 \text{ \AA}$, $3.0 \text{ \AA}$ and $3.1 \text{ \AA}$. Pentose 1 oxygen (O3) atom establishes H-bond with His 127/E of the $3.4 \text{ \AA}$. The oxygen (O2) atom of phosphate group interacts by H-bond with His 127/D at $2.8 \text{ \AA}$. The pentose 2 interacts with His 127/D and His 127/E O3 and O4 atom respectively, by H-bond of $2.6 \text{ \AA}$ and $2.8 \text{ \AA}$. The N3 and N9 adenine 2 atoms interacts with His 127/E by H-bond of $2.3 \text{ \AA}$ and $3.0 \text{ \AA}$, respectively. Some ConM/dinucleotide interactions are shown in Fig. 1B and Table 2.

3.3 ConM/IL-1 β Interactions

The IL-1 β primer electron density map contoured at 3 σ was found between the non-canonical dimer of the lectin, where only four nucleotides were fitted. Primer fragments were fitted in the electron density map and submitted to one cycle of the positional refinement (Fig. 2A). The nucleotides (GCTC) are fragments of the primer near the 3' portion. The primer must have fragmented during the crystallization process or was missed in diffraction experiments. The nucleotides are stabilized by van der Waals and hydrogen bonds interactions. The Cytosine/Thymine dinucleotide form H-bonds with His127, Ser110, Asp192, Thr194 and His51 from chain A and Ser190 from chain D (Fig. 2B), while the Guanine/Cytosine dinucleotide form H-bonds with Lys114 and Ser190 from chain A and His127 and Asp192 from chain D (Fig. 3). All measures are in table 2.

3.4 Molecular Docking of ConM with interleukin-1 β primer

Once the crystal structure of ConM/IL-1 β complex presented only four nucleotides in a non-biological assembly of the lectin, we investigated by molecular docking simulation how the complete primer could bind the lectin assembled in a biological form, namely the canonical dimer. The best result showed that the nucleotides from the primer make interactions with the His127, His51 and Lys114 from both chains of the dimer. The E value was -577.65 Kcal/mol (Fig.4).

4. Discussion

Lectins can decode the information contained in the structure of the oligosaccharides on the cell surface [47]. They can bind to membrane receptors and stimulate lymphocytes activation, induce cell growth and cell proliferation [48]. IL-1 β produced by macrophages and

B lymphocytes is a cytokine and it is involved in lymphocytes activation, as well in inflammation, cell proliferation, differentiation, apoptosis and tumor progression [24]. Plant lectins possess antitumor activities via targeting programmed cell death [49] and it is suggested that this effect is associated with the ability to modulate growth, differentiation, proliferation and apoptosis, mediated by surface receptors [50]. Moreover, some studies, using the *Canavalia brasiliensis* lectin (ConBr), indicate a role in apoptosis induction by lectin binding to glycosylated receptors on the surface of tumor cells [51]. Legume lectins are able to bind and form complexes with DNA [35]. These information are corroborated with the data obtained in this work, which lectins are capable of interacting with nucleic acid, thus we propose a possible structural lectin–DNA interaction.

Crystallographic data analysis of ConM/dinucleotide shows densities in the central region of the protein tetramer. The free dinucleotide interacts with three His127 residues present in that region. Similarly, crystallographic data analysis of ConM/IL-1 β shows densities in the central region of the protein non-canonical dimer. In the structure, the primer interacts with His127, Ser110, Asp192, Thr194, His51, Lys114, Ser190 from chain A and His127, Ser190, Asp192 from chain D. The molecular docking showed that the primer may interact with the ConM by His127 (Fig. 4) and may interact with His51 and Lys114 as well, from each chain in a dimer form, close to the region where we found the nucleotides densities. According to these results it is clearly that this region helps the interaction because of the amino acids. Serine and threonine belong to the polar group, and the histidine and lysine amino acids belong to the group of positively charged amino acids, thus, it is suggested that the connection success may occur by the difference between the charges, since the DNA molecule is predominantly negative and nucleic acids recognition involves specific interactions between macromolecules of different electrostatic properties [32]. To be recognized by proteins, a number of amino acid side chains may serve to make the hydrogens

bonds to the DNA [52] and a number of amino acids involved in these linkages in protein-DNA are more frequently such as Gln, Glu, Ser, Lys, Asn, Arg, Thr, His and Cys [36].

Lectins from the Diocleinae tribe has been studied and analysis of amino acid sequences show that these lectins have similarities [53]. The ConM sequence showed a 98% of homology to ConA [25] and these amino acid sequence analysis shows that His127, Ser110, Thr194, Ser190, His51 and Lys114 residues are conserved in these lectins which interact with the primer fragments and the free dinucleotide. The Asp192 amino acid is the only one that is not conserved in all lectins (absent in ConA and ConBr), although it is from the negatively charged group, it interacts with the molecule by H-bonds. The Ser110 and Thr194 amino acids also help to stabilize the hydrophobic pocket in the ConM/IAA interactions [13].

The ConM/IL-1 β primer interaction indicates that lectins can function as a transcription factor. It may enhance the pro-IL-1 β production, since the pro-IL-1 β is the IL-1 β precursor [24], to participate in activities such as inflammation, cell proliferation, tumor progression and apoptosis. In other hand, the ConM/dinucleotide and the primer interaction may function as mitogenic agents too, because mitogenic lectins can induce cell proliferation, elucidate some mechanisms like cell growth and development [48, 31] and the plant lectins have shown these characteristics already [29, 54, 55, 31, 56],

Nitrogen bases and phosphates in DNA can be considered strong candidates for mediating the binding between the molecule and lectin [35]. In both complexes (ConM/IL-1 β and ConM/dinucleotide) all bases of the nucleotides interact with His127 from different chains by H-bonds. Furthermore, some legume lectins have better interaction with small DNA sequences, which could explain the interactions with primers and DNA fragments [35].

ConM assumes a biological tetrameric oligomerization and this assembly in ConA-like lectins is well known and have been shown by chromatography, electrophoresis and mass

spectrometry [57]. The lectins ability to form tetramers can be physiologically relevant in receptor binding [25]. The dimer-tetramer equilibrium also depends on the conformation of Histidine or Asparagine residues in position 131, which are determinant to permit the interactions between the dimers and the tetramer assembly, because the structural conformation of amino acids may alter the oligomerization of Dicoleinae lectins [58,59].

Delatorre and colleagues [13] showed that in the symmetric region of the ConM lectin, four IAA (Indole Acetic Acid) molecules bind to the tetramer in the central region and this arrangement helps to stabilize through hydrophobic interactions between these molecules. We suggest that the presence of the free dinucleotide in the central region also helps to stabilize the structure of the tetramer. When the tetrameric structure of ConM/IL-1 β is generated by crystallographic symmetry we can see that the dinucleotide may form a structure similar to a double strand in the tetramer central region, this can provide interactions between the lectin and the DNA in the double strand form (Fig. 5).

According to Breitwieser [35], several legume lectin, including ConM, are able to interact with DNA and form complexes. Despite some minor differences in their primary sequence and three-dimensional structure, this group of proteins differs in several biological properties, which make them an excellent model for the relations of functions related to the structure [58, 59, 53]. They have the ability to interact strongly with the DNA molecule and the complex can be recovered intact, not altering the components of the macromolecule [35], but it has never been seen structurally until now.

This interaction makes these proteins as good mediators of the DNA molecules in the cells. It is known that ConA induces autophagy, stimulated by the binding to the cell surface glycoprotein or polysaccharide and then internalized into the cell, through clathrin-mediated endocytosis [60, 61]. Once legume lectins can be internalized into the cell, we suggest that the interactions between these proteins and DNA may interfere in all this mechanisms, acting like

a transcriptional factor. Otherwise, the ability to bind to DNA fragments helps to understand, some biological activities, including the enhancing of the IL-1 β in inflammatory processes, apoptosis and mitogenic mechanisms. However, these studies still need to be investigated for better understanding.

5. Acknowledgments

This study was partly funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). We also thank to Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Campinas-Brazil. P.D., B.A.M.R. and B.S.C. are senior investigators of CNPq.

6. References

- [1] Peumans WJ, Van Damme EJM. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiology* 1995; 109:347-352.
- [2] Lis H, Sharon N. Lectins: Carbohydrate-specific Proteins that Mediate Cellular Recognition. *Chemical Reviews* 1998; 98:637-674.
- [3] Calvete JJ, Thole HH, Raida M, Urbanke C, Romero A, Grangeiro TB, Ramos MV, Almeida da Rocha IM, Guimarães FN, Cavada BS. Molecular Characterization and Crystallization of Diocleinae lectins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1999; 1430: 367-375.
- [4] Van Damme EJM, Barre A, Rougé P, Peumans WJ. Cytoplasmic/nuclear plant lectins: A New Story. *Trends in Plant Science* 2004; 9: 484-489.
- [5] Jiang SY, Ma Z, Ramachandran S. Evolutionary history and stress regulation of the lectin superfamily in higher plants. *BMC Evolutionary Biology*, 2010; 10:79-102.

- 326 [6] Sharon N, Lis H. History of Lectins: From Hemagglutinins to Biological Recognition
327 Molecules. *Glycobiology* 2004; 14:53–62.
- 328 [7] Singh RS, Bhari R, Kaur HP. Characteristics of yeast lectins and their role in cell-cell
329 interactions. *Biotechnology Advances* 2011; 29:726-731.
- 330 [8] Ribeiro A, Catarino S, Ferreira RB.. Multiple lectin detection by cell membrane affinity
331 binding. *Carbohydrate Research* 2012; 352: 206-210.
- 332 [9] Abdon APV, Souza GC, Souza LNC, Vasconcelos RP, Castro CA, Guedes MM, Lima
333 RCP, Moreira RA, Monteiro-Moreira ACO, Campos AR. Gastroprotective Potential of
334 Frutalin, a D-galactose Binding Lectin, Against Ethanol-induced Gastric Lesions. *Fitoterapia*
335 2012; 83:604-608.
- 336 [10] Silva HC, Nagano CS, Souza LAG, Nascimento KS, Isídoro R, Delatorre P, Rocha BAM,
337 Sampaio AH, Assreuy AMS, Pires AF, Damasceno LEA, Marques-Domingos GFO, Cavada
338 BS. Purification and Primary Structure Determination of a Galactose-Specific Lectin From
339 *Vatairea guianensis* Aublet Seeds That Exhibits Vasorelaxant effect. *Process Biochemistry*
340 2012; 47:2347-2355.
- 341 [11] Nóbrega RB, Rocha BAM, Gadelha CAA, Santi-Gadelha T, Pires AF, Assreuy MAS,
342 Nascimento KR, Nagano CS, Sampaio AH, Cavada BS, Delatorre P. Structure of
343 Diocleavirgatalectin: relation between carbohydrate binding site and nitric oxide production,
344 *Biochimie* 2012; 94:900-906.
- 345 [12] Bezerra MJ, Rodrigues NV, Pires A de F, Bezerra GA, Nobre CB, Alencar KL, Soares
346 PM, do Nascimento KS, Nagano CS, Martins JL, Gruber K, Sampaio AH, Delatorre P, Rocha
347 BA, Assreuy AM, Cavada BS. Crystal structure of Diocleaviolacealectin and a comparative
348 study of vasorelaxant properties with *Dioclea rostrata* lectin. *International Journal of*
349 *Biochemistry & CellBiology* 2013; 45:807-815.

- 350 [13] Delatorre P, Silva-Filho JC, Rocha BA, Santi-Gadelha T, da Nóbrega RB, Gadelha
351 CA, do Nascimento KS, Nagano CS, Sampaio AH, Cavada BS. Interactions between indole-
352 3-acetic acid (IAA) with a lectin from *Canavalia maritima* seeds reveal a new function for
353 lectins in plant physiology. *Biochimie* 2013; 95:1697-1703.
- 354 [14] Alencar NM, Assreuy AM, Alencar VB, Melo SC, Ramos MV, Cavada BS, Cunha
355 FQ, Ribeiro RA. The galactose-binding lectin from *Vatairea macrocarpa* seeds induces in
356 vivo neutrophil migration by indirect mechanism. *International Journal of Biochemistry &*
357 *Cell Biology* 2003; 35:1674-81.
- 358 [15] Alencar NM, Assreuy AM, Criddle DN, Souza EP, Soares PM, Havt A, Aragão
359 KS, Bezerra DP, Ribeiro RA, Cavada BS. *Vatairea macrocarpa* induces paw edema with
360 leucocyte infiltration. *Protein & Peptide Letters* 2004; 11:195-200.
- 361 [16] Matos AB, Artiles GR, Valdés LH, Oliver PH. Revisión Taxonômica del Género
362 *Canavalia* DC. (Leguminosae-Papilionoideae) em Cuba, *Revista de la Academia Colombiana*
363 *de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* 2004; 28:157-75.
- 364 [17] Fernandes DC. Avaliação da lectina de *Canavalia maritima* Thours, em evento vascular
365 da inflamação aguda. Brasil: Universidade Federal do Ceará; Dissertação (Mestrado
366 Acadêmico em Ciências Fisiológicas); 2008.
- 367 [18] Alencar VB, Alencar NM, Assreuy AM, Mota ML, Brito GA, Aragão KS, Bittencourt
368 FS, Pinto VP, Debray H, Ribeiro RA, Cavada BS. Pro-inflammatory effect of *Arum*
369 *maculatum* lectin and role of resident cells. *International Journal of Biochemistry & Cell*
370 *Biology* 2005b; 37:1805-1814.
- 371 [19] Freire MG, Desouza IA, Silva AC, Macedo ML, Lima MS, Tamashiro WM, Antunes
372 E, Marangoni S. Inflammatory responses induced in mice by lectin from *Talisia esculenta*
373 seeds. *Toxicon* 2003; 42:275-280.

- 374 [20] Santi-Gadelha T, de Almeida Gadelha CA, Aragão KS, de Oliveira CC, Lima Mota
 375 MR, Gomes RC, de Freitas Pires A, Toyama MH, de Oliveira Toyama D, de Alencar
 376 NM, Criddle DN, Assreuy AM, Cavada BS. Purification and biological effects of *Araucaria*
 377 *angustifolia* (Araucariaceae) seeds lectin. *Biochemical and Biophysical Research*
 378 *Communications* 2006; 350:1050-55.
- 379 [21] Pinto NV, Cavada BS, Brito LF, Pereira RI, da Silva MT, Castro RR, de Freitas Pires
 380 A, Assreuy AM. Effects of *Canavalia* lectins on acute inflammation in sensitized and non-
 381 sensitized rats. *Inflammation* 2013; 36:713-722.
- 382 [22] Lee CJ, Chen LG, Liang WL. Anti-inflammatory effects of *Punica granatum* Linne in
 383 vitro and in vivo. *Food Chemistry* 2010; 118:315-322.
- 384 [23] Dujmovic I, Mangano K, Pekmezovic T, Quattrocchi C, Mesaros S, Stojasavljevic
 385 N, Nicoletti F, Drulovic J. The analysis of IL-1 beta and its naturally occurring inhibitors in
 386 multiple sclerosis: the elevation of IL-1 receptor antagonist and IL-1 receptor type II after
 387 steroid therapy. *Journal of Neuroimmunology* 2009; 207:101-106.
- 388 [24] Zhao R, Zhou H, Su SB. Critical role for interleukin-1 β in the progression of autoimmune
 389 diseases. *International Immunopharmacology* 2013; 17:658-669.
- 390 [25] Gadelha CA, Moreno FB, Santi-Gadelha T, Cajazeiras JB, Rocha BA, Assreuy
 391 AM, Lima Mota MR, Pinto NV, Passos Meireles AV, Borges JC, Freitas BT, Canduri
 392 F, Souza EP, Delatorre P, Criddle DN, de Azevedo WF Jr, Cavada BS.. Native Crystal
 393 Structure of a Nitric Oxide-releasing Lectin from the Seeds of *Canavalia maritima*, *Journal of*
 394 *Structural Biology* 2005; 152:185-194.
- 395 [26] Tarrant JM. Blood Cytokines as Biomarkers of In Vivo Toxicity in Preclinical Safety
 396 Assessment: Considerations for Their Use. *Toxicological Sciences* 2010; 117:4–16.
- 397 [27] Wahab S, Hussain A. Cytokines as targets for immunomodulation. *International Journal*
 398 *of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 2013; 5: 60-64.

- 399 [28] Nowell PC. Phytohemagglutinin: An initiator of mitosis in cultures of normal human
400 leucocytes. *Cancer Research* 1960; 20:462-464.
- 401 [29] Harris H, Robson EB. Precipitin reactions between extracts of seeds of *Canavalia*
402 *ensiformis* (Jack Bean) and normal and pathological serum proteins. *Vox Sang* 1963; 8:348-
403 355.
- 404 [30] Coelho AM, Giralt EG. Loss of mitogenic activity by immobilized lectins. *Biochemical*
405 *and Biophysical Research Communications* 1976; 72:790-795.
- 406 [31] Vikram D, Kshitija D, Jatinder S, KumarSA, Kumar AS, Singh KS. Purification and
407 characterization of an Antiproliferative and mitogenic plant lectin from tubers of
408 *Arisaemaspeciosum*. *Pharmacognosy Journal* 2010; 2:266–277.
- 409 [32] Kilpatrick DC. Mechanisms and Assessment of Lectin-Mediated Mitogenesis. *Molecular*
410 *Biotechnology* 1999; 11:55 – 65.
- 411 [33] Borrebaeck CAK, Rougé P. Mitogenic properties of structurally related *Lathyrus* Lectins.
412 *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1986; 248:30-34.
- 413 [34] Ducruix A, Giegé R. *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins: A Practical*
414 *Approach*, 2nd edition, New York, Oxford University Press; 1999.
- 415 [35] Breitwieser OV. *Leguminous Lectins Bind Non-specifically to DNA*. Germany: Faculty
416 of the University of Cologne; Dissertation (Doctorate in Mathematics and Natural Sciences);
417 2003.
- 418 [36] Bloomfield VA, Donald M, Crothers DM, Tinoco Jr I. *Nucleic Acids: Structure,*
419 *Properties and Functions*. University Science Books-California-USA; 2000.
- 420 [37] Wienhues U, Hosokawa K, Höveler A, Siegmann B, Doerfler W. *Laboratory Methods: A*
421 *Novel Method for Transfection and Expression of Reconstituted DNA-protein Complexes in*
422 *Eukaryotic Cells*. *DNA* 1987; 6:81-89.

- 423 [38] Leslie AGW. User Guide, MOSFLM Version 5.50. MRC Laboratory of Molecular
424 Biology, Cambridge, England; 1997.
- 425 [39] Collaborative Computacional Project, Number 4. The CCP4 Suite: Programs for
426 Crystallography. *ActaCrystallographica* 1994; 50:760–763.
- 427 [40] Vargin A, Teplyakov A. MOLREP: An Automated Program for Molecular
428 Replacement. *Journal of Applied Crystallography*, 1997; 30:1022–1025.
- 429 [41] Murshudov GN, Skubák P, Lebedev AA, Pannu NS, Steiner RA, Nicholls RA, Winn
430 MD, Long F, Vagin AA. REFMAC5 For the Refinement of Macromolecular Crystal
431 Structures. *ActaCrystallographica* 2011; 67:355-367.
- 432 [42] Emsley P, Cowtan K. Coot: Model-building Tools for Molecular Graphics. *Acta*
433 *Crystallographica*, 2004; 60:2126–2132.
- 434 [43] Delatorre P, Rocha BA, Souza EP, Oliveira TM, Bezerra GA, Moreno FB, Freitas
435 BT, Santi-Gadelha T, Sampaio AH, Azevedo WF Jr, Cavada BS. Structure of a lectin from
436 *Canavalia gladiata* seeds: new structural insights for old molecules, *BMC Structural Biology*
437 2007; 7:52-60.
- 438 [44] Delano WL. The PyMol Molecular Graphics System, Schrodinger, LLC; 2004.
- 439 [45] Dijk MV, Bonvin AMJJ. 3-D-DART: a DNA structure modeling server. *Nucleic Acids*
440 *Research*, 37 (web server Issue): W235-W239doi:10.1093/nar/gpk287.
- 441 [46] Ritchie DW, Kemp GJL. Protein docking using spherical polar Fourier correlations,
442 *Proteins*, 2000; 39:178–194, 2000.
- 443 [47] Sanz-Aparicio J, Hermoso J, Grangeiro TB, Calvete JJ, Cavada BS. The crystal structure
444 of *Canavalia brasiliensis* lectin suggests a correlation between its quaternary conformation
445 and its distinct lectin biological properties from Concanavalin A. *FEBS Letters*, v.405, p. 114-
446 118, 1997.

- 447 [48] Maciel EVM. Determinação do efeito mitogênico das lectinas de *cratylia mollis* sobre
448 linfócitos humanos utilizando um método colorimétrico. Brasil: Universidade Federal de
449 Pernambuco; Dissertação (Mestrado Acadêmico em Bioquímica); 2002.
- 450 [49] Li CY. Galanthusnivalis agglutinin (GNA)-related lectins: traditional proteins,
451 burgeoning drugs. CurrentChemicalBiology, 2009; 3:324–33.
- 452 [50] Castillo-Villanueva A, Abdullaev F. Lectinas Vegetales y sus Efectos em el
453 Cáncer. Revista de Investigación Clínica 2005; 57:55-64.
- 454 [51] Barbosa T, Arruda S, Cavada B, Grangeiro TB, de Freitas LA, Barral-Netto M. In Vivo
455 Lymphocyte Activation and Apoptosis by Lectins of the Diocleinae Subtribe. Memórias do
456 Instituto Oswaldo Cruz 2001; 95: 673-678.
- 457 [52] Sauer RT, Jordan SR, Pabo CO. Lambda Repressor: A Model System for Understanding
458 Protein-DNA Interactions and Protein Stability. Advances in Protein Chemistry 1990; 40:1-
459 61.
- 460 [53] Perez G, Perez C, Sousa-Cavada B, Moreira R, Richardson M.. Comparison of the
461 Amino Acid Sequences of the Lectins from Seeds of Dioclea lehmanni and Canavalia
462 maritima. Phytochemistry 1991; 30:2619-2621.
- 463 [54] Suvachittanont W, Jaranchavanapet P. Mitogenic effect of *Parkia speciosa* seed lectin on
464 human lymphocytes. Planta Medica 2000; 66:699-704.
- 465 [55] Wong JH, Wong CC, Ng TB. Purification and characterization of a galactose-
466 speciclectin with mitogenic activity from pinto beans. Biochemica et BiophysicaActa 2006;
467 1760:808–813.
- 468 [56] Chan YS, Wong JH, Fang EF, Pan W, Ng TB. Isolation of a glucosamine binding
469 leguminous lectin with mitogenic activity towards splenocytes and anti-proliferative activity
470 towards tumor cells. Plos one 2012; 7:1-13.

- [57] Delatorre P, Rocha BA, Gadelha CA, Santi-Gadelha T, Cajazeiras JB, Souza EP, Nascimento KS, Freire VN, Sampaio AH, Azevedo WF Jr, Cavada BS. Crystal Structure of a Lectin From *Canavalia maritima* (ConM) in Complex with Trehalose and Maltose Reveals Relevant Mutation in ConA-like Lectins. *Journal of Structural Biology* 2006; 154:280-286.
- [58] Cavada BS, Barbosa T, Arruda S, Grangeiro TB, Barral-Netto M.. Revisiting Proteus: Do Minor Changes in Lectin Structure Matter in Biological Activity? Lessons From and Potential Biotechnological Uses of the Diocleinae Subtribe Lectins, *Current Protein & Peptide Science* 2001; 2:123–135.
- [59] Moreno FB, Delatorre P, Freitas BT, Rocha BA, Souza EP, Facó F, Canduri F, Cardoso AL, Freire VN, Lima Filho JL, Sampaio AH, Calvete JJ, De Azevedo WF Jr, Cavada BS. Crystallization and Preliminary X-ray diffraction Analysis of the Lectin from *Canavalia gladiata* Seeds. *Acta Crystallographica* 2004; 60:1493–1495.
- [60] Chang CP, Yang MC, Liu HS, Lin YS, Lei HY. Concanavalin A induces autophagy in hepatoma cells and has a therapeutic effect in a murine in situ hepatoma model. *Hepatology* 2007; 45:286–296.
- [61] Lei HY, Chang CP. Induction of Autophagy by Concanavalin A and Its Application in Anti-Tumor Therapy. *Autophagy* 2007; 4:402-404.

Fig.1. (A) The 2-AMP molecule positioned in the electron density map and the His 127 from each chain. (B) Some interactions between the 2-AMP and the His from chains A and E

Fig. 2: (A) Interleukin-1 β primer fragments between the non-canonical dimers. (B) The CT dinucleotide form H-bond with His 127, Ser 110, Asp 192, Thr 194, His 51 from chain A, and Ser 190 from chain D .

Fig. 3: The GC dinucleotide form H-bond with Lys 114, Ser 190 from chain A and His 127, Asp 192 from chain D.

Fig. 4: (A) Molecular docking of ConM dimer (2CWM) with Interleukine-1 β primer (Green). (B) Primer interacting with the His 127 from chain A (orange). (C) Primer interacting with the His 127 from chain D (grey).

Fig. 5: Tetrameric structure of ConM/IL-1 β generated by crystallographic symmetry. The dinucleotide form a structure similar to a double strand in the tetramer central region.

521 **Table 1. Amounts related to data collection, refinement and quality of structures.**

Parameters	ConM/IL-1 β	ConM/2-AMP
<i>Data Collection</i>		
Space Group	F23	I222
Unit Cell Parameters (Å)		
A	192.2	140.6
B	192.2	140.6
C	192.2	199.0
Total Reflections	24.627	409.180
Number of Unique Reflections	9.205	32.858
Resolution Limits (Å)	48.06-3.20 Å	38.29 - 3.20 Å
R _{merge} (%)	14.0 (43.9)	22.5 (31.3)
Completeness (%)	94.7 (97.6)	99.3 (99.3)
Multiplicity	2.7	3.9
(I)/ σ	5.7 (2.1)	3.82 (2.0)
Wavelength (Å)	1.42	1.42
Number of monomers in asymmetric unit	2	6
<i>Molecular Replacement</i>		

wRfac/Correlation Coefficient (%)	43.4/61.3	44.1/41.7
-----------------------------------	-----------	-----------

Refinement

R _{factor} (%)	24.70	21.62
-------------------------	-------	-------

R _{free} (%)	31.49	26.71
-----------------------	-------	-------

Number of water molecules	101	137
---------------------------	-----	-----

Ramachandran Plot

Residues in most favored regions (%)	83.8	88.24
--------------------------------------	------	-------

Residues in additional allowed regions (%)	16.20	11.76
--	-------	-------

Residues in generously allowed regions (%)	0	0
--	---	---

522

523

524

525

526

527

528

529

530

531

532

533 **Table 2.** Atom distance between the dinucleotide and the amino acid residues.

Amino acid residue	Chain	Molecule	Atom	Amino acid – molecule distance
Dinucleotide				
HIS 127	A	Adenine 1	N1	3.2 Å
			N6	3.0 Å
			N7	3.1 Å
	D	Phosphate group	O2	2.8 Å
		Pentose 2	O3	2.6 Å
	E			O4
		Pentose 1	O3	3.4 Å
		Adenine 2	N3	2.3 Å
			N9	3.0 Å
IL - 1β				
HIS 127	A	Cytosine 1	O2	3.1 Å
			N1	3.0 Å
	D	Guanine	N9	2.8 Å
			N7	2.9 Å
SER 110	A	Pentose 1	O3	2.3 Å
ASP 192	A	Phosphate group 1	OP2	2.7 Å
			OP2	2.9 Å
	D	Phosphate group 2	OP2	2.9 Å
			OP2	3.1 Å

THR 194	A	Phosphate group 1	OP1	3.3 Å
SER 190	A	Terminal Phosphate group 2	OP1	3.3 Å
		Cytosine 2	N4	3.4 Å
	D	Terminal Phosphate group 1	OP1	3.0 Å
HIS 51	A	Timine	O2	2.8 Å
LYS 114	A	Pentose 2	O4	3.2 Å
		Phosphate group 2	OP1	2.8 Å

534

535

536

537

538

539

540

541

542

543

544

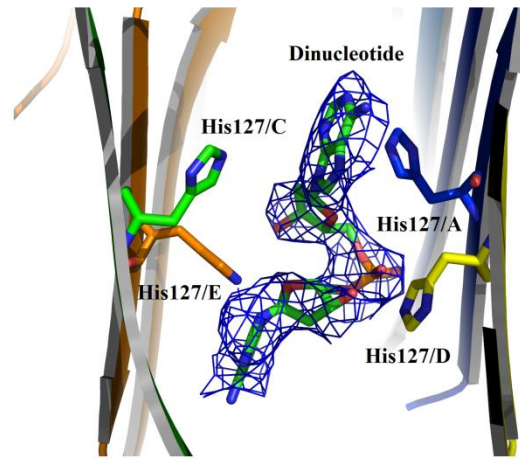
545

546

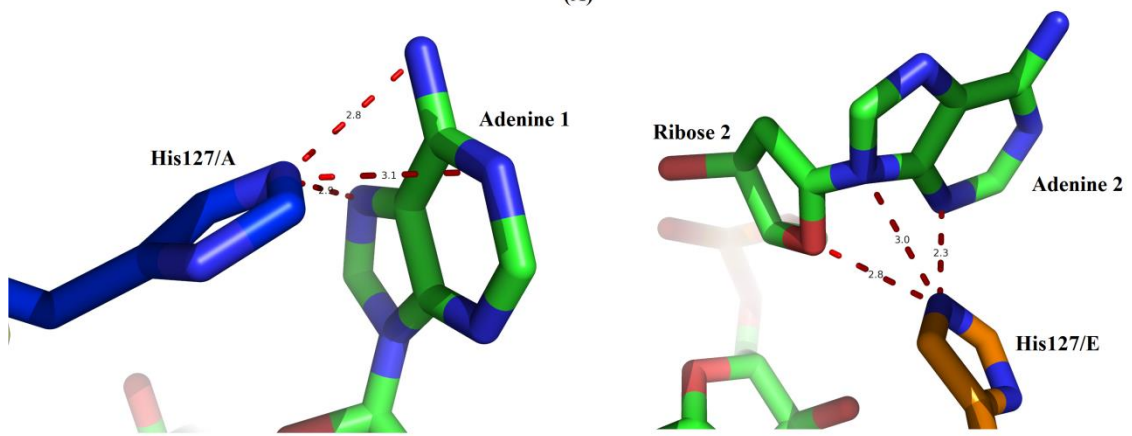
547

548

549



(A)



(B)

550

551

552

553

554

555

556

557

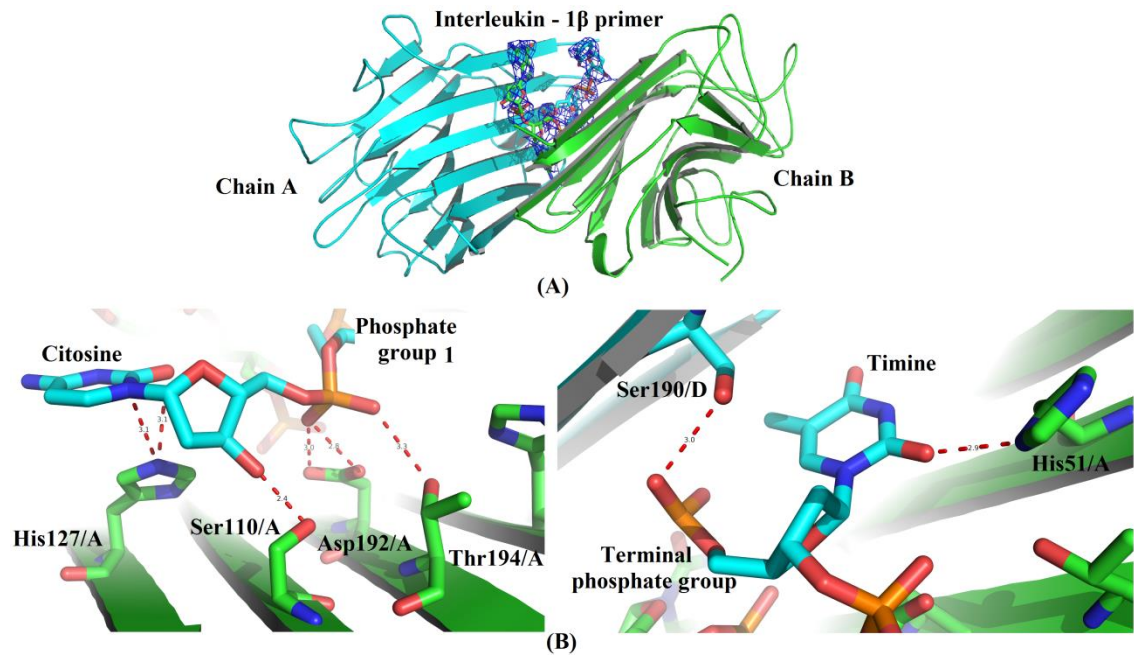
558

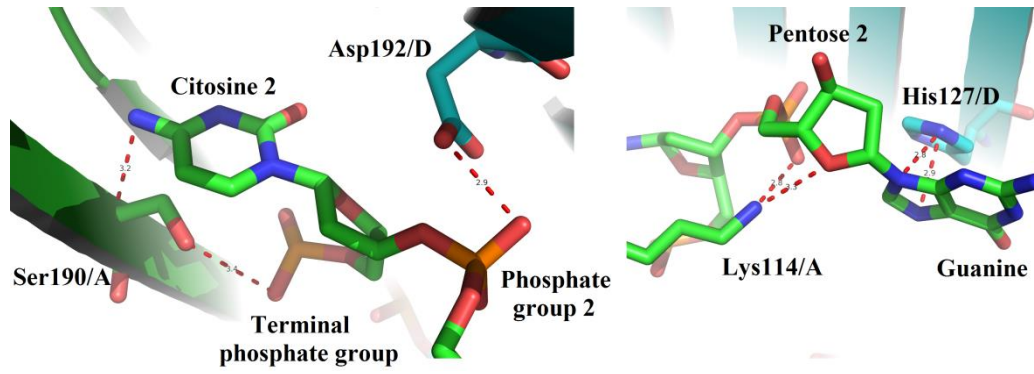
559

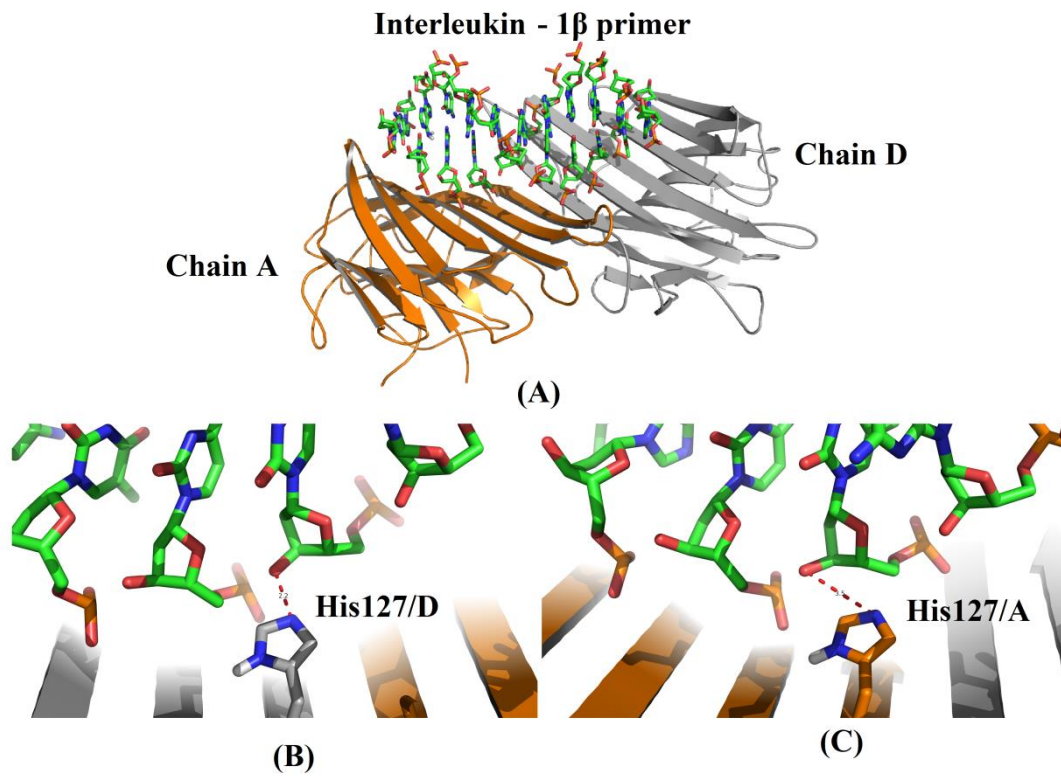
560

561

562







601

602

603

604

605

606

607

608

609

610

611

612

613

614



615

616

617

618

619

620

621

622

623

624

625

626

627

628

629

630

631

632

4. Conclusões

- A lectina de *Canavalia maritima* complexada com o primer da IL-1 β foi cristalizada na condição N°12 do kit de cristalização Crystal Screen N°1 da Hampton Research, constituída por 0,2 M Cloreto de Magnésio hexahidratado, 0,1 M HEPES sodium 7,5 30% v/v 2-Propanol;
- Entre o dímero não canônico ocorre a presença de uma densidade eletrônica de fragmentos do primer da IL-1 β . O fragmento TC interage com a His127, Ser110, Asp192, Thr194, His51 da cadeia A e Ser190 da cadeia D. O fragmento GC interage com Lys114, Ser190 da cadeia A e His127, Asp192 da cadeia D. Essas interações se dão por pontes de hidrogênio e interações de Van der Waals;
- Com base nesses dados foi possível hipotetizar que a interação da ConM com o primer estaria envolvida com a atividade pró-inflamatória que essa lectina apresenta, atuando como fator de transcrição;
- Aprofundamento nos estudos nessa área são necessários, para melhor esclarecimento da interação lectina-DNA com suas respectivas atividades biológicas.

5. Referências

ABDON, A. P. V. et al. **Gastroprotective Potential of Frutalin, a D-galactose Binding Lectin, Against Ethanol-induced Gastric Lesions.** Fitoterapia, v.83, p.604-608, 2012.

ABRANTES, V. E. F. et al. **Molecular modeling of lectin-like protein from *Acacia farnesiana* reveals a possible anti-inflammatory mechanism in carrageenan-induced inflammation.** BioMed Research International, article ID 253483, p. 1-9, 2013

ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula.** 5ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

ALENCAR, N.M. et al. **The galactose-binding lectin from *Vatairea macrocarpa* seeds induces in vivo neutrophil migration by indirect mechanism.** International Journal of Biochemistry & Cell Biology, v. 35, n. 12, p. 1674-81, 2003.

ALENCAR, N.M. et al. ***Vatairea macrocarpa* induces paw edema with leucocyte infiltration.** Protein & Peptide Letters, v. 11, n. 2, 195-200, 2004.

ALENCAR, V.B.M. et al. **Pro-inflammatory effect of *Arum maculatum* lectin and role of resident cells.** International Journal of Biochemistry & Cell Biology, v. 37, n. 9, p. 1805-1814, 2005b.

ASSREUY, A.M. S. et al. **Vasodilator effects of *Diocleinae* lectins from the *Canavalia* genus.** Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, v.380, p.509-521, 2009.

BEZERRA, M. J. B. et al. **Crystal structure of *Dioclea violacea* lectin and a comparative study of vasorelaxant properties with *Dioclea rostrata* lectin.** International Journal of Biochemistry & Cell Biology, v.45, p.807-815, 2013.

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

BLEICHER, L.; SASAKI, J. M. **Introdução à Difração de Raios-X em Cristais.** Universidade Federal do Ceará, 2000. Disponível em: <<http://www.fisica.ufc.br/raiosx/download/apostila.pdf>> Acesso em: 03 Junho. 2014.

BLOOMFIELD, V.A.; et al. **Nucleic Acids: Structure, Properties and Functions.** University Science Books-California-USA, 2000.

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

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

BRINDA, K.V. et al. **Determinantes of quaternary association in legume lectins.** Protein Science, v.13, p.1735-1749, 2004.

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

CAVALCANTE, T. T. A. et al. **A ConA-like lectin isolated from *Canavalia maritima* seeds alters the expression of genes related to virulence and biofilm formation in *Streptococcus mutans*.** *Advances in Bioscience and Biotechnology*, v.4, p.1073-1078, 2013.

CHAN, Y. S. et al. **Isolation of a glucosamine binding leguminous lectin with mitogenic activity towards splenocytes and anti-proliferative activity towards tumor cells.** *Plos one*, v.7, p. 1 – 13, 2012

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

COELHO, A. M.; GIRALT, E. G. **Loss of mitogenic activity by immobilized lectins.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.72, n. 3, p.790-795, 1976.

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

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

DELATORRE, P. et al. **Interactions between indole-3-acetic acid (IAA) with a lectin from *Canavalia maritima* seeds reveal a new function for lectins in plant physiology.** *Biochimie*, v.95, p.1697-1703, 2013.

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

DUJMOVIC I, et al. **The analysis of IL-1 beta and its naturally occurring inhibitors in multiple sclerosis: the elevation of IL-1 receptor antagonist and IL-1 receptor type II after steroid therapy.** *Journal of Neuroimmunology*, v.207, p.101-106, 2009.

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

EDELMAN, G.M. et al. **The Covalent and Three-dimensional Structure of Concanavalin A.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 69, p. 2580-2584, 1972

ETZLER, M.E. **Plant lectins: Molecular and biological aspects.** *Annual Review of Plant Physiology*. V. 36, p.209-234, 1985.

FERNANDES, D. C. **Avaliação da lectina de *Canavalia maritima* Thours, em evento vascular da inflamação aguda.** 2008. 89f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas). Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

FIGUEIREDO, J. G. et al. **Antinociceptive activity and toxicology of the lectina from *Canavalia boliviana* seeds in mice.** Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, v.380, p.407-414, 2009.

FREIRE, M.G.M. et al. **Inflammatory responses induced in mice by lectin from *Talisia esculenta* seeds.** Toxicon, v. 42, n. 3, p. 275-280, 2003.

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

HAMID, R. et al. **Lectins: Proteins with diverse applications.** Journal of Applied Pharmaceutical Science, v. 3, p.93-103, 2013.

HARRIS, H.; ROBSON, E. B. **Precipitin reactions between extracts of seeds of *Canavalia ensiformis* (Jack Bean) and normal and pathological serum proteins.** Vox Sang, V.8, p.348-355, 1963.

JIANG, S. et al. **Evolutionary history and stress regulation of the lectin superfamily in higher plants.** BMC Evolutionary Biology, v.10, p.79-102, 2010.

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

KILPATRICK, D. C. **Mechanisms and Assessment of Lectin-Mediated Mitogenesis.** Molecular Biotechnology, v.11, p. 55 – 65, 1999

KOMATH, S. S. et al. **Beyond carbohydrate binding: new directions in plant lectin research.** Organic & Biomolecular Chemistry, v. 4, p. 973-988, 2006.

LAKHTIN, V. et al. **Lectins of living organisms. The overview.** Anaerobe, v. 17, p. 452-455, 2011.

LATTMAN, E. E.; LOLL, P. J. **Protein Crystallography: a concise guide.** The Johns Hopkins University Press, Baltimore, 2008.

LEE, C. J. et al. **Anti-inflammatory effects of *Punica granatum* Linne in vitro and in vivo.** Food Chemistry, v. 118, p. 315-322, 2010.

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

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

LORIS, R. et al. **Structural basis of oligomannose recognition by the *Pterocarpus angolensis* seed lectin.** Journal of Molecular Biology, v.335, p.1227–1240, 2004.

MACIEL, E. V. M. **Determinação do efeito mitogênico das lectinas de *cratylia mollis* sobre linfócitos humanos utilizando um método colorimétrico.** 2002. 54f. Dissertação

(Mestrado Acadêmico em Bioquímica). Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2002.

MATOS, A.B. et al. **Revisión Taxonômica del Género Canavalia DC. (Leguminosae-Papilionoideae) em Cuba**, Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales , v. 28, n. 107, p. 157-75, 2004.

MELO, C. M. L. et al. **Mitogenic response and cytokine production induced by cramoll 1,4 lectin in splenocytes of inoculated mice**. Scandinavian Journal of Immunology, v.73, p. 112-121, 2011.

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

MCPHERSON, A.; GAVIRA, J. A. **Introduction to protein crystallization**. Acta Crystallographica, v.70, p.2-20, 2014.

MICHIELS, K. *et al.* Plant-insect Interactions: What Can We Learn From Plant Lectins. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v.73, p. 193-212, 2010.

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

NÓBREGA, R. B. et al. **Structure of Dioclea virgata lectin: relation between carbohydrate binding site and nitric oxide production**, Biochimie, v. 94, p. 900-906, 2012.

NOWELL, P. C. **Phytohemagglutinin: An initiator of mitosis in cultures of normal human leucocytes**. Cancer Research, v. 20, p.462-464, 1960.

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

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

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

RHODES, G. **Crystallography Made Crystal Clear: A Guide for Users of Macromolecular Models**. Academic Press, INC, San Diego, 2006.

RIBEIRO, A. et al. **Multiple lectin detection by cell membrane affinity binding**. Carbohydrate Research, v. 352, p. 206-210, 2012.

ROY, B. et al. **Role of PI3K/Akt/mTOR and MEK/ERK pathway in concanavalina A induced autophagy in HeLa cells**. Chemico-Biological Interactions, v.210, p.96-102, 2014.

SANTI-GADELHA, T. et al. **Purification and biological effects of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seeds lectin.** Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 350, n. 4, p. 1050-55, 2006.

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

SHARON, N. Lectins: Carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. **The Journal of Biological Chemistry**, v.282, p. 2753-2764, 2007.

SHETTY, K. N. et al. **Affinity of a galactose-specific legume lectin from *Dolichos lablab* to adenine revealed by X-ray crystallography.** International Union of Biochemistry and Molecular Biology, v.65, p.633-644, 2013.

SILVA, H., C. et al. **Purification and Primary Structure Determination of a Galactose-Specific Lectin From *Vatairea guianensis* Aublet Seeds That Exhibits Vasorelaxant effect.** Process Biochemistry, v.47, p.2347-2355, 2012.

SINGH, R. S. et al. **Characteristics of yeast lectins and their role in cell-cell interactions.** Biotechnology Advances, v.29, p.726-731, 2011.

SINGH, H.; SARATHI, S. P. Insight of lectins – A review. **International Journal of Scientific & Engineering Research**, v.3, p. 813-821, 2012.

SOL, F. G. et al. **Lectinas.** Investigación y Ciencia, v.361, p.58-67, 2006.

SUVACHITTANONT, W.; JARANCHAVANAPET, P. **Mitogenic effect of *Parkia speciosa* seed lectin on human lymphocytes.** Planta Medica, v.66, p.699-704, 2000.

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

VAN DAMME, E. J. M. et al. **Cytoplasmic/nuclear plant lectins: A New Story.** Trends in Plant Science, v.9, p.484-489, 2004.

VAN DAMME, E.J.M. et al. **Plant lectins.** Advances in Botanical Research , v.48, p.107-209, 2008.

VANDENBORRE, G. et al. **Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects.** Phytochemistry, v.72, p.1538-1550, 2011.

VASCONCELOS, M. A. et al. **Effect of leguminous lectins on the growth of *Rhizobium tropici* CIAT899.** Molecules, v.18, p. 5792-5803, 2013

VIKRAM, D., et al. **Purification and characterization of an Antiproliferative and mitogenic plant lectin from tubers of *Arisaema speciosum*.** Pharmacognosy Journal, v. 2, p. 266–277, 2010.

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

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

WONG, J.H. et al. **Purification and characterization of a galactose-specific lectin with mitogenic activity from pinto beans.** Biochemica et Biophysica Acta, v.1760, p.808 – 813, 2006.

ZHAO, R. et al. **Critical role for interleukin-1 β in the progression of autoimmune diseases.** International Immunopharmacology, v.17, p.658-669, 2013.

6. Anexos

Validação da estrutura ConM/dinucleotídeo

wwPDB Validation Report

Summary of PDB Entry Validation

The results of the validation of this PDB entry are shown below. Some major issues were raised during data processing which must be resolved prior to release of the file.

Geometry Validation

1. Atomic Clashes

No issues found.

2. Peptide Linkage

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

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

3. Covalent Geometry

No issues found.

4. Chirality Error

No issues found.

06/27/14 08:33 AM (EDT)

Generated by RCSB PDB

Summary Report for Review

5. Phi/Psi Torsion Angles

Total 1261 pairs were evaluated. 94 (7.45%) were in disallowed regions. The expected Ramachandran regions are defined in the following reference: GJ. Kleywegt and TA. Jones, PHI/PSI-chology: Ramachandran Revisited, Structure 1996, 4, 1395 - 1400.

UNOFFICIAL VALIDATION REPORT

06/27/14 08:33 AM (EDT)

Generated by RCSB PDB

Summary Report for Review

Individual Residue Outliers on Real Space R-value

No issues found.

Ligand Chemistry

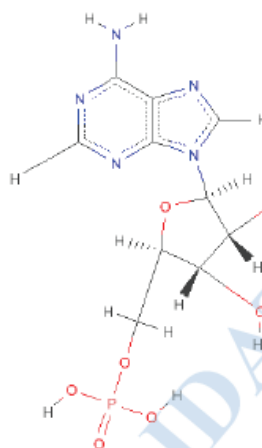
Ligand chemistry has been checked against the Chemical Component Dictionary. The following is a summary.

UNOFFICIAL VALIDATION REPORT

06/27/14 08:33 AM (EDT)

Generated by RCSB PDB

Summary Report for Review

Identifier: AMP**Name:** ADENOSINE MONOPHOSPHATE**Formula:** C₁₀ H₁₄ N₅ O₇ P

Type	Program	Version	Descriptor
SMILES	ACDLabs	12.01	<chem>O=P(O)(O)OCC3OC(N2C=NC1=C(N=CN=C12)N)C(O)C3O</chem>
InChI	InChI	1.03	InChI=1S/C10H14N5O7P/c11-8-5-9(13-2-12-8)15(3-14-5)10-7(17)6(16)4(22-10)1-21-23(18,19)20/h2-4,6-7,10,16-17H,1H2,(H2,11,12,13)(H2,18,19,20)/t4-,6-,7-,10-/m1/s1
InChIKey	InChI	1.03	UDMBCSSLTHHNCN-KQYNXXCUSA-N
SMILES CANONICAL	CACTVS	3.370	<chem>Nc1ncnc2n(cnc12)[C@@H]3O[C@H](CO[P](O)(O)=O)[C@@H](O)[C@H]3O</chem>
SMILES	CACTVS	3.370	<chem>Nc1ncnc2n(cnc12)[CH]3O[CH](CO[P](O)(O)=O)[CH](O)[CH]3O</chem>
SMILES CANONICAL	OpenEye OEToolkits	1.7.6	<chem>c1nc(c2c(n1)n(cn2)[C@H]3[C@@H]([C@@H]([C@H](O3)COP(=O)(O)O)O)O)N</chem>
SMILES	OpenEye OEToolkits	1.7.6	<chem>c1nc(c2c(n1)n(cn2)C3C(C(C(O3)COP(=O)(O)O)O)O)N</chem>

06/27/14 08:33 AM (EDT)

Generated by RCSB PDB

Summary Report for Review

Summary of Structure Factor Validation

Structure quality	
Average Occupancy-weighted avg temperature factor	19.536

Resolution	
High Resolution (Author reported)	3.25
High Resolution (Calculated by REFMAC, V5.7.0029)	3.247
Low Resolution (Author reported)	114.91
Low Resolution (Calculated by REFMAC, V5.7.0029)	38.301

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

R-factors	
R-factor (Author reported)	0.21617
R-factor (Calculated by REFMAC, V5.7.0029)	0.2174
Free R-factor (Author reported)	0.26706
Free R-factor (Calculated by REFMAC, V5.7.0029)	0.2721

Wilson statistics (PHENIX, V1.8-1069)	
Wilson B-factor	36.00
Wilson Scale	0.58

Padilla-Yeates statistics for twin detection (PHENIX, V1.8-1069)	
Padilla-Yeates $\langle L \rangle$	0.423
Padilla-Yeates $\langle L^*L \rangle$	0.244

Validação da estrutura ConM/IL-1 β

wwPDB Validation Report

Summary of PDB Entry Validation

The results of the validation of this PDB entry are shown below. Some major issues were raised during data processing which must be resolved prior to release of the file.

Geometry Validation

1. Atomic Clashes

No issues found.

2. Peptide Linkage

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

Residue A LYS 116 and Residue A ALA 122 are not properly linked:
C-N bond distance is 7.26 Å.
Residue D LYS 116 and Residue D GLU 122 are not properly linked:
C-N bond distance is 7.55 Å.

3. Covalent Geometry

No issues found.

4. Chirality Error

No issues found.

5. Phi/Psi Torsion Angles

Total 420 pairs were evaluated. 33 (7.86%) were in disallowed regions. The expected Ramachandran regions are defined in the following reference: GJ. Kleywegt and TA. Jones, PHI/PSI-chology: Ramachandran Revisited, Structure 1996, 4, 1395 - 1400.

06/26/14 09:14 PM (EDT)

Generated by RCSB PDB

Summary Report for Review

UNOFFICIAL VALIDATION REPORT

06/26/14 09:14 PM (EDT)

Generated by RCSB PDB

Summary Report for Review

Individual Residue Outliers on Real Space R-value

No issues found.

UNOFFICIAL VALIDATION REPORT

Summary of Structure Factor Validation

Structure quality	
Average Occupancy-weighted avg temperature factor	56.999

Resolution	
High Resolution (Author reported)	3.20
High Resolution (Calculated by REFMAC, V5.7.0029)	3.200
Low Resolution (Author reported)	39.24
Low Resolution (Calculated by REFMAC, V5.7.0029)	44.101

Crystal data	
Space group	F 2 3
Total number of reflections	9248
Number of reflections used	8732
Completeness of data	99.12

R-factors	
R-factor (Author reported)	0.24703
R-factor (Calculated by REFMAC, V5.7.0029)	0.2566
Free R-factor (Author reported)	0.31494
Free R-factor (Calculated by REFMAC, V5.7.0029)	0.3071

Wilson statistics (PHENIX, V1.8-1069)	
Wilson B-factor	68.52
Wilson Scale	0.88

Padilla-Yeates statistics for twin detection (PHENIX, V1.8-1069)	
Padilla-Yeates $\langle L \rangle$	0.467
Padilla-Yeates $\langle L^*L \rangle$	0.294