

RESUMO

A lectina da *Macrotyloma axillare* (LMA) é uma lectina N-acetilgalactosamina específica muito importante em biotecnologia uma vez que pode ser utilizada para biotipagem de hemácias humanas do Subgrupo A1. Neste trabalho, a LMA proveniente de sementes dormentes e germinadas foi purificada por uma nova técnica, utilizando métodos de precipitação e cromatografia de troca iônica. Por tal metodologia isolaram-se três frações ativas da LMA (0,2; 0,3 e 0,4M) com atividade hemaglutinante sobre hemácias A1 e com rendimento em massa predominante da LMA 0,2M. Análises por SDS-PAGE 12,5% e por espectrometria de massas do tipo ESI e MALDI-TOF revelaram que as frações de LMA são semelhantes e apresentam massas moleculares de 28 ± 1 kDa. Estudos de estabilidade em diferentes condições de pH mostraram que a LMA apresenta atividade hemaglutinante máxima entre pH 6,0-8,0 e na presença de íons divalentes como o Ca(II) e Mn(II); com decréscimo de atividade em condições ácidas/alcalinas. As determinações de massa molecular nativa da LMA por cromatografia de exclusão por tamanho demonstraram que a LMA se comporta como tetrâmero entre pH 6,0-8,0 e dímero em pH 4,0. Estudos termodinâmicos das diversas frações de LMA (sementes dormentes e germinadas) por ITC, utilizando NacGal e NO₂-Fenil-NacGal derivados, revelaram que tais frações de LMA possuem afinidades similares para os diversos carboidratos testados, com ligações entalpicamente dirigidas. O carboidrato 2-NO₂-Fenil- α -D-NacGal foi o melhor ligante para a LMA em titulações realizadas por ITC em baixas temperaturas (15°C), pH próximo à neutralidade e em altas concentrações de NaCl (1M). Os dados obtidos para a LMA de sementes germinadas demonstram que essa proteína é resistente durante o processo de germinação por 120 horas, como verificado pelas análises de espectrometrias de massas e pelas titulações calorimétricas. Estudos de desnaturação realizados por DSC revelaram que a LMA possui elevada estabilidade termodinâmica em pH 6,2 com $T_m \cong 100^\circ\text{C}$. O processo de desnaturação da LMA é irreversível (modelo dois estados) e termodinamicamente dirigido nas condições experimentais testadas no DSC. Os dados obtidos para a LMA de sementes dormentes e germinadas e a elevada resistência térmica da LMA corroboram que tais proteínas podem ser importantes na fisiologia, desenvolvimento e metabolismo das sementes da leguminosa *Macrotyloma axillare*.

ABSTRACT

The *Macrotyloma axillare* seed lectin (LMA) is an N-acetyl-galactosamine (GalNac) specific lectin very important in biotechnology because the specific hemagglutination by A1 human erythrocytes. In this work, the LMA from dormant and germinated was purified by precipitation techniques and ion exchange chromatography as a new purification technique. Such methodology yielded three LMA fractions (0.2, 0.3 and 0.4 M) with hemagglutinating activity on erythrocytes A1, being the LMA 0.2 the major fraction considering the mass yielding. The SDS-PAGE 12.5% and mass spectrometry analyses revealed a molecular mass about 28 ± 1 kDa. The LMA hemagglutinating activity is Ca(II) and Mn(II) dependent and the pH-dependent assays showed best hemagglutinating activity at pH 6.0-8.0; being decreased at acidic/alkaline conditions. The native molecular mass determination showed that the LMA is a tetramer at pH 6.0-8.0 range and a dimer at pH 4.0. The thermodynamic data obtained by ITC using GalNac and NO₂-Phenyl-GalNac derivatives have shown that all the LMA fractions tested (from dormant and germinated seeds) are similar and the binding is enthalpically driven. The 2-NO₂-Phenyl- α -D-GalNac ligand is the best ligand and good affinities can be obtained by titrations performed at low temperature (15°C) and high salt concentration (NaCl 1M). The LMA data from germinated seeds have shown that the LMA is a protein resistant to the germination process (120 hours) as it could be seen by mass spectrometry analyses and by ITC titrations. The LMA denaturation studies, provided by DSC, revealed high thermal stability (T_m) at pH 6.2 with melting temperature about 100°C. The LMA denaturation process is irreversible (two state model) and thermodynamically driven at the DSC conditions tested. The LMA germinated data and the high thermal stability for LMA corroborate that lectins are crucial proteins for metabolism, physiology and development events of the *Macrotyloma axillare* legume.