

# UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



ANA MARIA DA SILVA

## DETECÇÃO DE PROTEÍNAS QUE SE LIGAM À CADEIA DE $\beta(1\rightarrow4)$ GLUCANOS EM COTILÉDONES DE CHAGAS (*TROPAEOLUM MAJUS*) DURANTE O PERÍODO DE MOBILIZAÇÃO DE XILOGLUCANO DE RESERVA

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato(a) Ana Maria da Silva e aprovada pela Comissão Julgadora. 01/12/2006

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para a obtenção do Título de Mestre em Biologia Celular e Estrutural na área de Biologia Celular

Orientador: Dr. Marcos Silveira Buckeridge

UNICAMP

BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE



517201008

CHAMADA :  
T. Unicamp  
Si38d  
Ex  
MBO BC/ 48855  
OC. 16-392107  
C  D   
EC R\$ 11,00  
A 2/102107  
CPD

CM-00154300-6

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

Si38d

**Silva, Ana Maria da**

Detecção de proteínas que se ligam à cadeia de  $\beta(1 \rightarrow 4)$  glucanos em cotilédones de chagas (*Tropaeolum majus* L.) durante o período de mobilização de xiloglucano de reserva/Ana Maria da Silva. - - Campinas-SP. [s.n.], 2000.

56f: ilus.

Orientador: Marcos Silveira Buckeridge

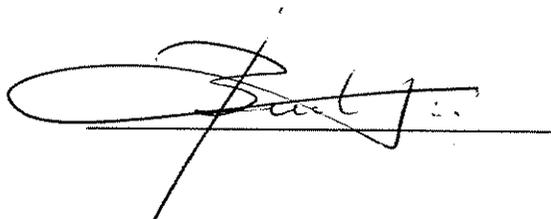
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.  
Instituto de Biologia.

1 - Celulose. 2. Proteínas. 3. Chagas-planta. I. Buckeridge, Marcos Silveira. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título

Data da defesa: 01/12/2000

**Banca Examinadora**

Dr. Marcos Silveira Buckeridge (Orientador)



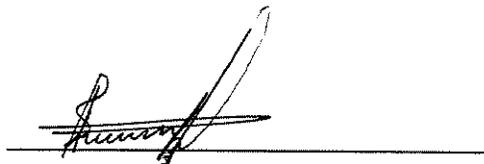
---

Dra. Sonia Machado de Campos Dietrich



---

Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel



---

Prof. Dr. Angelo Luiz Cortelazzo

---

E então o que quereis...?

Fiz ranger as folhas de jornal  
Abrindo-lhes a pálpebras piscantes,  
E logo  
De cada fronteira distante  
Subiu um cheiro de pólvora  
Perseguindo-me até em casa  
Nestes últimos vinte anos  
Nada de novo há  
No rugir das tempestades  
Não estamos alegres,  
É certo  
Mas por que razão?  
Haveríamos de ficar tristes?  
O mar da história é agitado  
As ameaças  
E as guerras  
Havemos de atravessá-las ao meio  
Cortando-as  
Como uma quilha corta  
As ondas.

Maiakóvski (1927)

## AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos;

ao meu orientador Marcos Silveira Buckeridge;

aos professores, funcionários e colegas do departamento de Biologia Celular;

aos colegas e funcionários da seção de fisiologia e bioquímica do Instituto de Botânica pela ajuda constante ao meu trabalho, e principalmente pela amizade.

à minha família, por todo carinho e apoio, hoje e sempre.

ao Denis Ubeda de Lima, pela amizade sincera, pelo companheirismo, e é claro pela preciosa ajuda na confecção dos gráficos.

à Fapesp ( Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio financeiro.

## SUMÁRIO

<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>8</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>9</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>10</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
POLISSACARÍDEOS DE RESERVA DE SEMENTES .....	12
XILOGLUCANOS .....	13
<i>Ocorrência, função e estrutura.....</i>	13
ENZIMAS DO CATABOLISMO DOS XILOGLUCANOS.....	15
<i>Endo-<math>\beta</math>(1<math>\rightarrow</math>4)-glucanase .....</i>	15
<i><math>\beta</math>-galactosidase.....</i>	16
<i><math>\alpha</math>-xylosidase e <math>\beta</math>-glucosidase.....</i>	16
AÇÃO CONJUNTA DAS QUATRO ENZIMAS DURANTE A MOBILIZAÇÃO DE RESERVAS DE XILOGLUCANO DE SEMENTES.....	17
CBDs- PROTEÍNAS QUE SE LIGAM À CELULOSE E/OU AO DOMÍNIO CELULOSE-XILOGLUCANO .....	18
LECTINAS – PROTEÍNAS COM ALTA ESPECIFICIDADE PARA CARBOIDRATO.....	22
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>23</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>24</b>
1. ESTABELECIMENTO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS DO EXPERIMENTO.....	24
1.1 <i>Material vegetal.....</i>	24
1.2 <i>Obtenção do extrato protéico .....</i>	24
1.3 <i>Extração de xiloglucano .....</i>	24
1.4 <i>Obtenção do precipitado de celulose microcristalina .....</i>	25
1.5 <i>Interação celulose e xiloglucano .....</i>	25
1.6 <i>Microscopia eletrônica de varredura .....</i>	26
1.7 <i>Interação proteínas–celulose e proteínas complexo celulose-xiloglucano.....</i>	26
1.8 <i>Ação das proteínas 43 e 63 kDa sobre o complexo cel-xg.....</i>	28
1.9 <i>Curva de pH para interação de proteínas com o complexo cel-xg.....</i>	28
2. ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	29
2.1 <i>Dosagem de proteínas .....</i>	29
2.2 <i>Dosagem de xiloglucano.....</i>	29
2.3 <i>Determinação da atividade enzimática de <math>\beta</math>-glucosidase.....</i>	29
2.4 <i>Determinação da atividade de <math>\alpha</math>-xilosidase .....</i>	29
2.5 <i>Determinação de atividade de <math>\beta</math>-galactosidase.....</i>	30
2.6 <i>Determinação da atividade de xiloglucano endo-transglicosilase (XET).....</i>	30
3.0 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA .....	31
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>32</b>
1. INTERAÇÃO PROTEÍNAS-CELULOSE E PROTEÍNAS-COMPLEXO CEL-XG .....	32

2. EFEITO DE PH E TEMPERATURA NA INTERAÇÃO E ELUIÇÃO DAS PROTEÍNAS .....	33
3. INTERAÇÃO DAS PROTEÍNAS COM CELULOSE E COM O COMPLEXO CEL-XG E ATIVIDADE DE $\beta$ -GALACTOSIDASE DURANTE O PERÍODO DE GERMINAÇÃO .....	36
4. ANÁLISE POR SDS-PAGE DAS PROTEÍNAS QUE INTERAGEM COM CELULOSE E COM O COMPLEXO CELULOSE-XILOGLUCANO .....	44
5. COMPARAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE 43 E 63KDa COM OUTRAS PROTEÍNAS CONHECIDAS QUE INTERAGEM COM PAREDES CELULARES .....	48
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>51</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>52</b>

## ABREVIATURAS

- 1.Cel.....Celulose
- 2.Cel+xg..... Celulose+xiloglucano
- 3.CBD.....Cellulose Binding Domain
- 4.XET.....Xiloglucano-Endo-Transglicosilase

## RESUMO

Xiloglucanos (xgs) são polissacarídeos que ocorrem em parede celulares principalmente de dicotiledôneas. Possuem uma cadeia principal idêntica a da celulose  $\beta(1\rightarrow4)$  glucano e ramificações com xilose, galactose e/ou arabinose. Sua principal função nas paredes celulares é orientar as microfibrilas de celulose e conseqüentemente os xgs têm papel fundamental na forma e desenvolvimento celulares. Xiloglucanos também acumulam-se em grandes quantidades em sementes, onde servem como reserva para o crescimento inicial da plântula. Sua hidrólise *in vivo* tem se mostrado altamente complexa e apesar de razoavelmente conhecido, o sistema de hidrólise dos xgs em plantas ainda não está completamente elucidado. O presente trabalho mostra que proteínas extraídas de cotilédones de *Tropaeolum majus* L. interagem *in vitro* com celulose (cel) e com o complexo celulose-xg (cel-xg). A concentração ótima de proteínas para essa interação está por volta de  $80\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (nas condições experimentais determinadas no nosso laboratório). A análise por SDS-PAGE das proteínas eluídas a partir da cel e do complexo cel-xg revelou uma diferença no perfil de bandas detectadas. A interação dos polipeptídeos com o complexo cel-xg mostrou uma proporção maior de uma proteína de 43kDa, sugerindo que a presença do xiloglucano poderia estar aumentando o número de sítios para esses polipeptídeos. Uma diferença entre os perfis de polipeptídeos eluídos a partir de celulose e do complexo cel-xg foi o desaparecimento de uma banda de 63kDa que apareceu somente no primeiro (cel). Isto sugere que o xiloglucano, ao interagir com a celulose, poderia "esconder" sítios específicos de ligação da proteína 63kDa à celulose. Nenhuma atividade enzimática das hidrolases do xiloglucano foi detectada nas amostras de proteínas eluídas da cel e do complexo cel-xg e também as massas moleculares das proteínas detectadas nas interações com cel e com complexo cel-xg não coincidem com as das enzimas já reportadas para o sistema de mobilização do xiloglucano. Nossos resultados sugerem que os polipeptídeos que interagem com a cel e com o complexo cel-xg poderiam estar atuando principalmente na ligação entre celulose e xiloglucano, interferindo no acesso das enzimas responsáveis pela mobilização do xiloglucano.

## ABSTRACT

Xyloglucans (xgs) are polysaccharides that occur mainly in the plant cell walls of dicots. They are composed of a main chain identical to cellulose ( $\beta$ -1,4 linked glucoses) branched with xylose galactose and/or arabinose. Its main function in the walls is the orientation of cellulose microfibrils, being therefore important for cell shape determination. Xyloglucans also accumulate in great amounts in seeds, where they serve as a reserve for plantlet initial growth. Although seed Xgs are reserve polymers, their hydrolysis *in vivo* have been demonstrated to be extremely complex and although many enzymes have been isolated, the system is not completely elucidated. The present work showed that proteins present in the cotyledons of *Tropaeolum majus* L. are able to interact *in vitro* with microcrystalline cellulose (cel) or microcrystalline cellulose covered with xyloglucan (cel+xg). The optimal concentration of proteins for interaction with cel or cel+xg are around  $80\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Analysis by SDS-PAGE of the proteins eluted from cel or cel+xg with sodium chloride revealed a different polypeptide profile. The interaction of cotyledon extracts with cel+xg showed a higher proportion of a 43kDa protein, suggesting that xyloglucan could be increasing the number of sites of interaction for this polypeptide. Alternatively, when cel alone was used, a 63kDa protein appeared together with the 43kDa protein observed in interaction with cel+xg. This suggests that when xyloglucan interacts with cel it possibly "hides" binding sites which are specific for the 63kDa protein binding. No enzymatic activity of any of the xyloglucan hydrolases was observed in the solution of polypeptides eluted from cel or cel+xg. Also, none of the bands found in SDS-PAGE coincide with any of the molecular weights already known for xyloglucan hydrolases of *T. majus* L. Our results suggest that the cel and cel+xg interactive polypeptides found in the cotyledons of *T. majus* L. might be related to storage mobilisation, possibly interfering with the access of the hydrolases to xyloglucan.

## INTRODUÇÃO

Todas as células vegetais são envolvidas por uma parede celular e esta tem como função manter a forma da célula, conferir resistência mecânica aos tecidos, controlar a expansão celular, participar dos mecanismos de proteção contra microorganismos, armazenar reservas e participar da sinalização e reconhecimento entre as células, além de atuar sobre o transporte intercelular (Waldron & Brett, 1990). A manutenção de pressão hidrostática sobre o citoplasma influenciando o potencial hídrico intracelular, é também, outra função exercida pela parede celular (Reid, 1997).

A celulose é um polímero não ramificado de glucoses ligadas  $\beta(1\rightarrow4)$  tendo como função principal conferir resistência à parede. A celulose é um dos poucos polímeros sintetizados na membrana plasmática, sendo produzida por um complexo multienzimático transmembrânico (Robinson, 1996) e, na parede, vários destes complexos se associam e se deslocam juntos na membrana plasmática (Delmer e Amor, 1995). Com isso, as moléculas recém sintetizadas formam feixes compostos de várias moléculas chamadas de microfibrilas.

Ao microscópio eletrônico, a parede celular não se mostra completamente homogênea. Em geral observa-se entre as células uma camada média rica em pectinas, mais espessa nas regiões onde mais de duas células estão em contato. Circundando a membrana plasmática encontra-se a parede primária e, em muitos casos, pode ocorrer ainda uma outra camada denominada parede secundária.

As paredes celulares de uma planta constituem coletivamente a sua forma (Varner e Lin, 1989). Dois tipos de parede são encontrados em plantas superiores: paredes primárias e paredes secundárias.

As paredes primárias são compostas de microfibrilas de celulose que estão embebidas numa matriz enriquecida de hemiceluloses, pectinas e uma quantidade muito pequena de proteínas estruturais (Cosgrove, 1999). Em função deste arranjo tridimensional de celulose, hemiceluloses e pectinas, ocorre o desenvolvimento pelas plantas de propriedades conhecidas como viscoelásticas (Nishitani, 1997). Entre

monocotiledôneas e dicotiledôneas existe uma diferença na composição da parede primária, sendo arabinoxilanos as hemiceluloses predominantes em monocotiledôneas, enquanto xiloglucano é a hemicelulose mais abundante em dicotiledôneas.

A parede secundária, a qual será enfocada neste trabalho, corresponde ao material que se deposita na parede após o término do crescimento da célula, independente de sua natureza. A deposição de parede secundária ocorre, principalmente, nos elementos traqueais dos tecidos vasculares e nas células do esclerênquima. Nos tecidos dérmicos a parede secundária é encontrada em tricomas e células-guardas. Como reserva, paredes secundárias aparecem em órgãos subterrâneos e em endospermas e cotilédones de sementes.

### ***Polissacarídeos de reserva de sementes***

Muitas sementes de várias espécies de leguminosas e de outras famílias como Tropaeolaceae utilizam polissacarídeos como fonte de reserva para o período de estabelecimento da plântula. Este período é crucial para que o ciclo de vida dos indivíduos seja completo.

Dentre os polissacarídeos de reserva de sementes destaca-se: 1) o amido, presente por exemplo em sementes de ervilha (*Pisum sativum*) e lentilha (*Lens esculenta*) (Bewley & Black, 1978); 2) os arabinogalactanos, presentes em sementes de *Lupinus angustifolius* (Crawshaw & Reid, 1984); 3) o xiloglucano, presente em sementes de tamarindo (*Tamarindus indica*), jatobá (*Hymenaea courbaril*), copaíba (*Copaifera langsdorffii*) e chagas (*Tropaeolum majus*) e 4) o galactomanano, em sementes de guar (*Cyamopsis tetragonolobus*), sesbania (*Sesbania marginata*), falso barbatimão (*Dimorphandra mollis*), entre outras (Reid, 1985; Buckeridge & Dietrich, 1996). Quase todos esses polímeros, com exceção do xiloglucano de chagas, apresentam, em diferentes graus, considerável importância comercial, seja pelo valor nutritivo que possuem (amido) ou por sua utilização como espessantes em alimentos industrializados (galactomananos e xiloglucanos).

Devido ao grande número de estudos realizados com polissacarídeos de reserva de sementes, principalmente durante a segunda metade deste século, já é possível separá-los em grupos distintos. O critério de classificação é baseado na localização celular desses polímeros. Enquanto o amido compreende uma classe isolada de polissacarídeos de reserva que ocorre no interior de células parenquimatosas de reserva, formando grânulos bastante característicos, os demais polímeros citados, ocorrem nas paredes celulares daqueles tecidos e compreendem, possivelmente, uma adaptação evolutiva das paredes celulares vegetais primárias, no sentido de armazenar grandes quantidades de carboidratos de reserva. Este grupo de polissacarídeos é denominado Polissacarídeos de Reserva de Parede Celular.

O presente trabalho trata principalmente dos xiloglucanos de sementes de *Tropaeolaceae*, *Tropaeolum majus* L.

## ***Xiloglucanos***

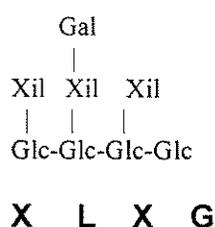
### *Ocorrência, função e estrutura*

Os xiloglucanos são polissacarídeos que ocorrem principalmente em paredes celulares de dicotiledôneas. Estes constituem a principal hemicelulose deste grupo de plantas e além disso podem ser acumulados em grandes quantidades em sementes de algumas espécies de Leguminosae-Caesalpinoideae e Tropaeolaceae.

Acredita-se que uma das funções principais do xiloglucano nas paredes celulares seja a orientação das microfibrilas de celulose. São evidências em favor dessa hipótese os fatos de que 1) os xiloglucanos interagem especificamente com celulose *in vitro* (Hayashi *et al.*, 1989); 2) quando extraídos de paredes intactas deixam uma rede desorganizada de microfibrilas (McCann & Roberts, 1991) e 3) quando adicionados a suspensões de celulose bacteriana promovem o alinhamento das microfibrilas *in vitro*. Como conseqüência, o controle da forma celular pode estar em grande parte relacionado com o domínio celulose-xiloglucano em paredes celulares de dicotiledôneas.

Os xiloglucanos são também denominados amilóides por interagirem com  $I_2/KI$  (como o amido), fazendo com que o tecido apresente forte coloração azul quando em presença de lugol (Kooiman, 1960).

Estruturalmente, os xiloglucanos são polímeros compostos por uma cadeia principal celulósica em que resíduos de glucose estão ligados entre si por ligações glicosídicas do tipo  $\beta(1\rightarrow4)$ . A cadeia principal celulósica pode apresentar 3 tipos de ramificações: 1) resíduos de xilose ligados ao carbono 6 da glucose através de ligação glicosídica  $\alpha(1\rightarrow6)$ ; 2) o dissacarídeo xilose  $\beta(1\rightarrow2)$  galactose liga-se ao carbono 6 da glucose através de ligação glicosídica  $\alpha(1\rightarrow6)$  e 3) o oligossacarídeo xilose  $\beta(1\rightarrow2)$  galactosil  $\alpha(1\rightarrow2)$  fucopiranosil liga-se ao carbono 6 da glucose através de ligação glicosídica  $\alpha(1\rightarrow6)$ . A nomenclatura para os blocos estruturais do xiloglucano proposta por Fry e colaboradores (1993) considera a cadeia principal como o ponto central. Glucoses não substituídas são denominadas **G**; glucoses ramificadas com xilose são denominadas **X** e se a galactose está ligada à xilose o trissacarídeo é denominado **L**. Por exemplo:



A utilização de celulase purificada de *Trichoderma viride* possibilitou estudos mais aprofundados sobre a estrutura fina dos xiloglucanos e hoje se sabe que a maioria deles é formada por blocos contendo 4 glucoses, 3 xiloses, e 1 ou 2 moléculas de galactose e 1 fucose. Os extratos de xiloglucano normalmente apresentam uma pequena proporção de arabinose e já foi demonstrado que este monossacarídeo liga-se aos resíduos de galactose (Eda & Kato, 1978; Gidley *et al.*, 1991). Estruturalmente, os xiloglucanos de parede primária e os de parede de reserva de sementes são semelhantes, com exceção do fato que a fucose não está presente nos xiloglucanos de reserva em sementes.

## **Enzimas do catabolismo dos xiloglucanos**

Até o momento, 4 tipos de enzimas que atuam na hidrólise do xiloglucano foram detectadas:

### *Endo- $\beta$ (1→4)-glucanase*

Esta enzima pertence à classe das celulases, que são endo-enzimas capazes de hidrolisar moléculas de celulose ou xiloglucano, produzindo fragmentos de menor massa molecular. Se efetuada hidrólise exaustiva, a celulase de *Trichoderma viride* pode produzir uma mistura de oligossacarídeos que representam os blocos constitutivos da maioria dos xiloglucanos.

Em 1986, Edwards e colaboradores isolaram uma endo- $\beta$ (1→4)glucanase de sementes de chagas (*Tropaeolum majus* L.) e demonstraram que esta enzima é extremamente específica para xiloglucanos. Trabalhos posteriores (Fanutti *et al.*, 1993 e De Silva *et al.*, 1993) demonstraram que a estrutura da endoglucanase é extremamente rara, pois ela contém zero % de alfa hélice e 66% de dobras beta nas moléculas. Estas características tornam o polipeptídeo extremamente compacto, diminuindo a massa molecular aparente (19kDa) em relação a massa molecular baseado na sequência de aminoácidos (35kDa). Foi descoberto que além da atividade hidrolítica, a endoglucanase de chagas é capaz de efetuar transglicosilação, ou seja, a enzima pode transferir blocos resultantes de hidrólise para outros blocos, construindo moléculas de maior massa molecular.

Acredita-se que a transglicosilação seja de extrema importância durante o crescimento, pois a quebra e consequente reconstrução de ligações da cadeia principal de xiloglucanos na parede celular poderia afetar grandemente a distribuição das microfibrilas de celulose na parede primária, afetando consequentemente o crescimento celular (Nishitani & Tominaga, 1991; Fry *et al.*, 1992 e De Silva *et al.*, 1993). No entanto, a função de transglicosilação na degradação de polissacarídeos de sementes ainda é pouco conhecida. Este fenômeno foi demonstrado ocorrer também em sementes de espécies tropicais. Evidências indiretas foram obtidas por Alcântara (1995) de que a transglicosilação de fragmentos de xiloglucano pode

ocorrer em cotilédones de sementes de *Copaifera langsdorffii* durante mobilização do xiloglucano.

Tiné e colaboradores (2000) demonstraram a presença de uma xiloglucano-endo-transglicosilase (XET) de *Hymenaea courbaril* L. que só consegue hidrolizar o polissacarídeo na presença de oligossacarídeos de xiloglucano. Posteriormente, Alcântara (2000) purificou parcialmente a XET de *H. courbaril* L. e demonstrou sua ação de transglicosilação através da verificação de incorporação de oligossacarídeos ao polímero.

### *β-galactosidase*

Beta-galactosidasas com alta especificidade sobre xiloglucano foram isoladas apenas de sementes de *Tropaeolum majus* L. (Edwards *et al.*, 1988) e de *Copaifera langsdorffii* (Alcântara *et al.*, 1999). Ambas são capazes de hidrolisar os resíduos de galactose tanto do polímero como de oligossacarídeos produzidos por hidrólise prévia com celulase.

### *α-xylosidase e β-glucosidase*

A única *α*-xilosidase isolada e caracterizada como sendo específica para xiloglucanos foi a enzima isolada por Fanutti e colaboradores em 1991. Esta enzima não age sobre o polímero, mas somente sobre os oligossacarídeos produzidos através de hidrólise pela XET. A *α*-xilosidase retira uma xilose apenas do terminal não redutor de cada vez dos oligossacarídeos e tem que agir em conjunto uma *β*-glucosidase (Crombie *et al.*, 1998), onde xilose e glucose são retiradas alternadamente do final não redutor da molécula de cada oligossacarídeo.

Além das quatro enzimas mencionadas, a presença de arabinose no xiloglucano pressupõe a existência de arabinosidase. Porém, a ação desta enzima nunca foi demonstrada em sementes que acumulam xiloglucano.

## ***Ação conjunta das quatro enzimas durante a mobilização de reservas de xiloglucano de sementes***

O modelo de degradação de xiloglucano em sementes de *T. majus* L. é considerado o mais bem estudado. Edwards e colaboradores (1985) demonstraram que a mobilização de xiloglucano nesta espécie é acompanhada por um aumento e um decréscimo na atividade das quatro hidrolases: endo- $\beta$ -glucanase,  $\beta$ -galactosidase,  $\alpha$ -xilosidase e  $\beta$ -glucosidase. Com base nestes dados e também sobre o modo de ação da XET (Edwards *et al.*, 1986 e Fanutti *et al.*, 1993) Crombie e colaboradores (1998) propuseram um modelo de mobilização de xiloglucano em *T. majus* L. Neste modelo, as quatro enzimas atacam o polímero de um modo sincronizado, produzindo galactose, glucose e xilose livres. Em *T. majus* L., XET e  $\beta$ -galactosidase são as únicas enzimas capazes de atacar o polímero. Em baixas concentrações de oligossacarídeos predomina a atividade hidrolítica da enzima, produzindo oligossacarídeos que serão imediatamente atacados por  $\alpha$ -xilosidasas e  $\beta$ -glucosidasas, reduzindo o polímero a monossacarídeos.

Em estudos com *Tamarindus indica*, Reis e colaboradores (1987) demonstraram a presença de uma parede interna e uma parede externa, que não foram degradadas durante a mobilização do xiloglucano. Posteriormente, o mesmo tipo de arranjo de parede foi detectado por imunolocalização em *Hymenaea courbaril* L. (Marcia Braga, Henrique P. Santos e Marcos Buckeridge comunicação pessoal).

Tiné e colaboradores (2000) estudaram a mobilização do xiloglucano de *Hymenaea courbaril* L.. O polímero é mobilizado após 45 dias da embebição e o processo continua até 75 dias após a embebição. Porém, alteração na estrutura fina do xiloglucano em período anterior à degradação foi observada. Todas as quatro enzimas encontradas por Edwards e colaboradores (1985) em *T. majus* L. foram detectadas em *H. courbaril* L.. Como em *Copaifera langsdorffii* (Alcântara *et al.*, 1999), toda atividade de  $\beta$ -galactosidase que pode ser detectada utilizando substrato sintético teve um pH ótimo em 3,2, enquanto as outras hidrolases foram mais ativas em pH 4,5. Estes resultados, obtidos para as  $\beta$ -galactosidasas de *Copaifera* e

*Hymenaea*, sugerem que esta enzima é um importante ponto de controle do metabolismo de xiloglucanos em leguminosas, pois em todos os estudos efetuados, nenhuma  $\beta$ -galactosidase livre de endo- $\beta$ -glucanase apresentou atividade sobre o polímero, hidrolisando apenas os oligossacarídeos. Tais resultados também sugerem que o controle de mobilização do xiloglucano pode ser exercido pelas mudanças de pH da parede, pelo menos em leguminosas, com base na diferença de pH ótimo das enzimas (4,0). Hensel e colaboradores (1991) demonstraram que a mobilização do xiloglucano *in vivo* em cotilédones de *Tropaeolum majus* L. é controlada por auxina, a qual é responsável pela modificação do pH da parede celular. Deste modo este hormônio pode estar atuando de forma indireta no processo de mobilização.

As modificações que envolve o processo de mobilização do xiloglucano tanto em *Tropaeolum* como em *Copaifera* e *Hymenaea* sugere que proteínas não enzimáticas poderiam estar atuando sinergicamente com as hidrolases no desmonte da parede, como por exemplo os celulosomos ou expansinas, descritos a seguir.

### ***CBDs- Proteínas que se ligam à celulose e/ou ao Domínio celulose-xiloglucano***

Os xiloglucanos possuem a estrutura da cadeia principal idêntica à celulose (Buckeridge & Reid, 1996). Carpita e Gibeaut (1993) propõem inclusive que os sistemas biossintéticos dos  $\beta$ -glucanos sejam “variações sobre um mesmo tema”. Nesse sentido, é também provável que os sistemas enzimáticos de hidrólise tenham algumas características em comum. A estrutura molecular da endoglucanase (celulase) de *Trichoderma viride*, por exemplo, já foi determinada e esta enzima possui um sítio catalítico e um CBD (*Cellulose Binding Domain*). A estrutura tridimensional destas proteínas (enzima + CBD) consiste de dois domínios protéicos ligados por um braço peptídico de grande mobilidade. Acredita-se que os CBDs sejam responsáveis por mudanças conformacionais na superfície da microfibrila que resultam em acessibilidade da cadeia celulósica ao sítio catalítico.

Os CBDs apresentam peso molecular entre 4 e 20kDa e ocorrem em diferentes posições nos polipeptídeos: N-terminal, C-terminal e em posições centrais (Tommé, 1998). Alguns CBDs podem se ligar à celulose reversivelmente, e são utilizados na separação e purificação de outros polipeptídeos. Os CBDs ligam-se à celulose através de pontes de hidrogênio e por forças de Van der Waals.

No modelo de degradação de celulose por microorganismos, foi constatada a existência de um complexo macromolecular cujos componentes interagem sinergisticamente proporcionando uma catálise eficiente na degradação da celulose (Bayer *et al.*, 1998). Este complexo macromolecular foi denominado celulosomo, sendo composto por subunidades enzimáticas e não-enzimáticas chamadas de *scaffolding*. Os CBDs formam os chamados módulos não catalíticos que são responsáveis pela ligação do celulosomo ao substrato. Outras subunidades que constituem o celulosomo são os domínios de doquerinas e coesinas, que coordenam a incorporação de todas as subunidades ao complexo celulosomal.

Complexos celulase-CBDs ou celulosomo em plantas nunca foram observados, porém a ação de CBDs em tecidos vegetais já foi descrita por Sphigel e colaboradores (1998), em experimentos de expansão celular em tecidos de plantas. Neste trabalho foi demonstrado que baixas concentrações de CBDs causam um aumento no comprimento do tubo polínico de pessegueiro quando comparado com o controle sem CBDs. A concentração ótima está por volta de  $50\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Este alongamento estaria relacionado com o fato de que o CBD estaria competindo com o xiloglucano pela ligação com celulose, causando assim o afrouxamento da parede que resulta no aumento da pressão de turgor e alongamento (Sphigel *et al.*, 1998).

## **Ação de expansinas no complexo celulose-xiloglucano**

Já se sabe que a auxina estimula as ATPases de membranas e promove o acesso de prótons na matriz extracelular, acidificando o meio, proporcionando assim, condições favoráveis de pH para as expansinas que só atuam em pH ácido. Por essa razão essas proteínas são consideradas mediadores do crescimento ácido. Inúmeros

trabalhos vêm comprovando a sua atuação no processo de afrouxamento da parede, fenômeno que promove a expansão celular. Em ensaios para medir o potencial de expansão celular, expansinas purificadas foram adicionadas às paredes previamente tratadas com alta temperatura e observou-se um rearranjo na parede, seguido de afrouxamento e conseqüentemente, expansão celular (Cosgrove, 1998).

Esta função, por algum tempo foi atribuída à XET, enzima que promove a degradação da parede e concomitantemente a reconstituição da mesma, através do processo de transglicosilação. No entanto, utilizando XET em ensaios *in vitro* com parede tratada com temperatura alta não se observa expansão celular, e em extratos purificados de expansinas nunca se detectou atividade de XET (Cosgrove, 1999).

O mecanismo bioquímico de ação das expansinas é, todavia, desconhecido. Acredita-se que o processo de expansão celular ocorre após o rompimento das ligações entre as microfibrilas de celulose e as hemiceluloses. As expansinas estariam se ligando, neste caso, à interface celulose e xiloglucano.

As expansinas apresentam uma série altamente conservada de resíduos de triptofano, também encontrada em CBDs, embora não apresentem domínios catalíticos similares às celulasas. Provavelmente este motivo estrutural se conservou ao longo da evolução entre expansinas e CBDs, o que já foi visto em glucanases de fungos (Rose & Bennett, 1999).

Apesar da origem evolutiva do sistema de hidrólise de xiloglucano estar, provavelmente, no sistema de hidrólise da celulose, os CBDs nunca foram observados. Do mesmo modo nunca foi relatada a atuação de expansinas no desmonte da parede secundária durante a mobilização.

Apesar de pouco ser conhecido sobre as modificações que ocorrem no complexo cel-xg durante o desmonte da parede em células que já cessaram seu crescimento, a despolimerização está certamente associada aos eventos enzimáticos que ocorrem sobre xiloglucano e sobre celulose. Como no caso específico das endoglucanases, que contribuem em processos como florescimento e abscisão foliar, as expansinas estão, sem dúvida, envolvidas no processo de degradação dos polímeros da parede. Além disso, tem sido demonstrada a

participação das expansinas no processo de desmonte da parede, principalmente em amadurecimento de frutos (Rose & Bennett, 1999).

Em estudos de degradação de parede em frutos de tomates, vários trabalhos já reportaram a ação de expansinas durante o amadurecimento e amolecimento do fruto, onde muitas questões já foram levantadas sobre o real papel das expansinas. Foi observada uma série de mudanças na parede envolvendo duas subclasses de expansinas, *LeExp1*, agindo primeiro no início do processo de expansão, e a *LeExp2*, atuando especificamente no afrouxamento, promovendo o amadurecimento e culminando no amolecimento do fruto, sendo que a expansina *LeExp1* estaria sendo ativada por auxina e a *LeExp2* por etileno [Rose & Bennett;1999; para uma revisão ver Cosgrove, 2000].

A despolimerização das hemiceluloses é uma característica comum em frutos durante o amadurecimento, embora a razão de despolimerização varie entre diferentes espécies. O gene *LeExp1* é encontrado em tomate e expresso no início do amadurecimento. Este gene apresenta similaridades com outros genes que são expressos somente no processo de expansão. Apesar do alto grau de homologia existente entre expansinas associadas ao amadurecimento e expansinas associadas à expansão celular, as diferenças de funções destas proteínas na expansão celular e amadurecimento devem ser avaliadas. A análise filogenética e as diferenças nas reações com anticorpos, sugerem que estas subclasses de proteínas expansinas são muito divergentes em nível de estrutura terciária e quaternária. As subclasses poderiam atuar de formas diferentes nos eventos diversos, uma forma durante a expansão e outra durante o amadurecimento. Isto talvez possa reforçar a hipótese que, de fato, expansinas ou proteínas análogas a elas, poderiam estar atuando no processo de mobilização de reserva em cotilédones, uma vez que se trata de um processo também de desmonte de parede, orquestrado por um grupo de enzimas atuando conjuntamente, e neste caso as expansinas ou proteínas análogas, estariam então, afastando as microfibrilas já no fim do processo de degradação da parede. Isto provavelmente estaria acontecendo em nível de parede primária considerando o cotilédone uma folha modificada. Além disso, modificações na estrutura do xiloglucano durante o período de pré mobilização observadas por Tiné e

colaboradores (2000) poderiam estar sendo promovidas por proteínas não enzimáticas. Nesses experimentos observou-se um aumento significativo na proporção de xiloglucano passível de extração em água quente em um momento em que foi detectada apenas atividade de  $\beta$ -galactosidase e  $\alpha$ -xilosidase e não de todas as hidrolases que compõem o modelo de degradação do xiloglucano. Esta modificação estrutural poderia ocorrer também em função da presença de expansinas atuando sobre o domínio celulose- xiloglucano nas paredes primárias que envolvem a parede de reserva.

### ***Lectinas – proteínas com alta especificidade para carboidrato***

Um outro grupo de proteínas que se liga aos carboidratos é o das lectinas. Independentemente do pouco conhecimento sobre as funções das lectinas em plantas, estas proteínas têm sido muito utilizadas em estudos de imunologia devido à alta especificidade para carboidratos complexos, e também por estarem relacionadas ao potencial de aglutinar células sanguíneas e precipitar carboidratos multivalentes (Loris *et al.*, 1997).

A maior parte das lectinas é encontrada no citoplasma ou em corpos protéicos de células dos cotilédones, embora tenham sido também encontradas em caules e folhas.

As lectinas, com poucas exceções, são glicoproteínas que necessitam de íons divalentes, como  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mn}^{+2}$ , para se ligarem aos carboidratos e, em geral, possuem estrutura quarternária formando dímeros e tetrâmeros (Lis & Sharon, 1998).

Embora muitos estudos tenham sido realizados sobre estas proteínas, sua função ainda não está clara. Elas poderiam desempenhar funções importantes na defesa contra patógenos, atuar no reconhecimento microorganismo-planta durante o processo de fixação de nitrogênio atmosférico, na organização celular, em processos de fagocitose e em extensão celular, e etc (Moreira *et al.*, 1991).

## OBJETIVOS

Tendo em vista as sugestões existentes sobre a interação de proteínas sem atividade enzimática com celulose facilitando a hidrólise do xiloglucano de parede primária, uma hipótese que poderia ser levantada seria de que estas proteínas poderiam também alterar a conformação do xiloglucano de reserva tornando a hidrólise mais (ou menos) eficaz.

A detecção de proteínas outras que aquelas conhecidas como enzimas hidrolíticas do xiloglucano, as quais foram descritas, é uma nova forma de abordar o problema de como o xiloglucano é modificado ou degradado durante processos biológicos de mobilização de reservas, crescimento e desenvolvimento vegetal. Com a estratégia adotada de detecção de proteínas que se ligam à cadeia de  $\beta(1\rightarrow4)$  glucanos, tentamos demonstrar a possibilidade destas proteínas não enzimáticas estarem atuando na modificação da conformação do xiloglucano para o controle fino das interações intermoleculares (xg-xg) e também com celulose (cel-xg).

Desse modo, o presente trabalho teve como objetivo a extração e caracterização de proteínas de cotilédones de *Tropaeolum majus* L. (enzimáticas ou não) que se ligam a  $\beta(1\rightarrow4)$  glucanos durante o período de mobilização e estabelecimento da plântula.

## MATERIAL E MÉTODOS

### **1. Estabelecimento das condições ótimas do experimento**

#### *1.1 Material vegetal*

As sementes de *Tropaeolum majus* L. utilizadas foram importadas da Dinamarca, pela Feltrin Importadora de sementes Ltda.

#### *1.2. Obtenção do extrato protéico*

Sementes de *Tropaeolum majus* L. foram embebidas em água destilada por 12 horas, semeadas em vermiculita, e mantidas em sala de crescimento com temperatura constante de 25<sup>0</sup>C e fotoperíodo de 12 horas. Para a obtenção do extrato protéico, cotilédones foram coletados a partir do 8<sup>o</sup> até o 18<sup>o</sup> dia após o início da embebição (nos diferentes experimentos, procurou-se manter a proporcionalidade entre o número de cotilédones e o volume de extração). Em seguida, foram pesados e homogeneizados em tampão acetato de sódio 50mM pH 5,0 com 0,5M de NaCl, utilizando ultraturrax T-25. O homogeneizado foi filtrado a vácuo em peneira de nylon e em seguida centrifugado a 13200g por 15 minutos a 5<sup>0</sup>C. O sobrenadante coletado foi dialisado contra tampão acetato de sódio 50mM pH 5,0 a 5<sup>0</sup>C durante 8 horas. O material dialisado foi novamente centrifugado, medido o volume e congelado a -20<sup>0</sup>C.

#### *1.3. Extração de xiloglucano*

Sementes foram pesadas, secas em estufa a 60<sup>0</sup>C e moídas em moinho de bola. Um grama do pó seco foi homogeneizado em 100mL de água destilada a 80<sup>0</sup>C com agitação constante.

Após a extração por 3 horas em água o material foi filtrado a vácuo em uma peneira de nylon, precipitado com etanol comercial (3x o volume) e mantido em

repouso durante 12 horas a 5<sup>o</sup>C.

O precipitado foi coletado por filtração a vácuo e lavado com etanol e acetona comercial. Após a evaporação da acetona o precipitado foi novamente solubilizado em água destilada a 80<sup>o</sup>C e em seguida centrifugado a 13200g por 15 minutos a 5<sup>o</sup> C. O sobrenadante foi coletado em placa de Petri e liofilizado. A partir do material seco foi preparada uma solução de xiloglucano 0,1% (p/v) em tampão acetato de sódio 25mM pH 5,8.

#### *1.4. Obtenção do precipitado de celulose microcristalina*

Foram preparadas suspensões de celulose microcristalina Avicel 4% (p/v) em água destilada e retiradas uma alíquotas de 400µl em microtubos de 1,5mL, centrifugadas a 13200g por 3 minutos, descartando o sobrenadante. Em seguida o precipitado foi lavado 5 vezes com água destilada, homogeneizado e centrifugado a 13200g por 3 minutos para retirada de oligossacarídeos.

#### *1.5. Interação celulose e xiloglucano*

Para os ensaios de interação celulose e xiloglucano, 600µL de xiloglucano 0,1% (p/v) em tampão acetato de sódio 25mM pH 5,8 foram adicionados ao precipitado de celulose e o volume foi completado para 1mL com tampão acetato de sódio 25mM pH 5,8. O material foi homogeneizado e incubado por 15 minutos a 30<sup>o</sup>C. Após a incubação o material foi centrifugado e uma alíquota de 10µl foi retirada do sobrenadante para quantificação de xiloglucano pelo método Iodo-Iodeto de potássio (Kooiman, 1960). A quantidade de xiloglucano adsorvido à celulose foi calculada por diferença entre o total de xiloglucano adicionado e a quantidade encontrada no sobrenadante, sendo os dados expressos em porcentagem de interação (Lima & Buckeridge,2000).

### 1.6. *Microscopia eletrônica de varredura*

Para o exame microscópico da celulose microcristalina e de seu complexo com xiloglucano, os materiais em suspensão em água destilada foram liofilizados, montados em suportes apropriados (*stubs*) e cobertos com ouro (Baltec SCD 050). As amostras foram examinadas e fotografadas em um microscópio de varredura da marca Philips XL20.

### 1.7 *Interação proteínas–celulose e proteínas complexo celulose-xiloglucano*

Para os ensaios de interação com proteínas foi realizada, preliminarmente, uma curva de interação proteínas-celulose e proteínas-complexo cel-xg, utilizando extratos de cotilédones de diferentes dias de coleta como descrito acima. Ao precipitado de celulose ou complexo cel-xg acrescentaram-se 500 $\mu$ l de extrato protéico não fervido (e extrato fervido como controle), incubando em diferentes temperaturas (30 $^{\circ}$ C, 45 $^{\circ}$ C e 60 $^{\circ}$ C) em triplicatas. Posteriormente o material foi centrifugando a 13200g por 3 minutos. Uma alíquota foi coletada de cada sobrenadante para dosagem de proteínas e em seguida os sobrenadantes das triplicatas foram reunidos em um só volume e congelados a -20 $^{\circ}$ C. Os precipitados foram lavados com NaCl 0,5M em tampão acetato de sódio 50mM e centrifugado em 13200g por 3 minutos. O resumo das etapas do experimento de interação proteínas-celulose e proteínas-complexo celulose-xiloglucano estão na figura 1.

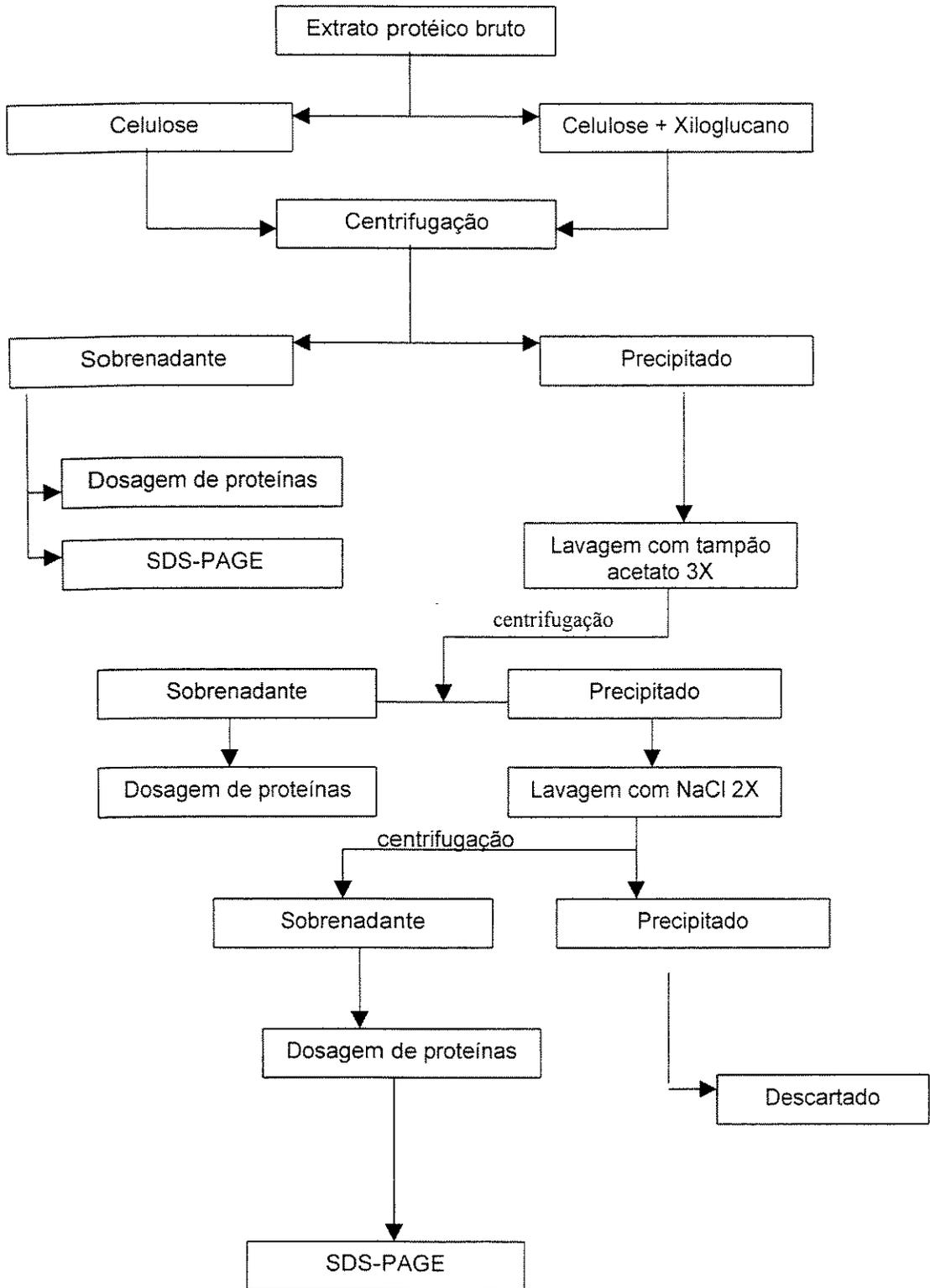


Figura 1. Resumo das etapas do experimento de interação das proteínas com celulose e com o complexo cel-xg.

### *1.8 Ação das proteínas 43 e 63 kDa sobre o complexo cel-xg*

Para este experimento foram utilizados complexos de celulose-xiloglucano de copaíba de 25 e 80 kDa, e complexo cel-xg , como já descrito acima. As proteínas eluídas com NaCl 0,5M a partir de celulose foram aplicadas aos complexos, seguido de incubação durante 30 minutos a 30<sup>0</sup>C, e centrifugados a 13200g por 2 minutos. Uma alíquota do sobrenadante foi coletada para dosagem de xiloglucano pelo método colorimétrico de Iodo-Iodeto de potássio (Kooiman, 1960; ver item 2.2).

### *1.9 Curva de pH para interação de proteínas com o complexo cel-xg*

Para os ensaios de interação de proteínas com cel e complexo cel-xg foi feita uma curva de pH variando de 2,5 a 6,5, onde o pH do extrato foi corrigido com tampão citrato fosfato 250mM. A interação de proteína com celulose e com complexo cel-xg foi realizada como descrito no 1.7, onde foi considerado o pH 3,0 como melhor para interação em ensaios subsequentes.

## 2. Análises Bioquímicas

### 2.1 Dosagem de proteínas

A dosagem de proteínas foi feita através do método de Bradford (1976). A concentração de proteína foi determinada utilizando uma curva padrão de albumina de soro bovino e a leitura feita em 595nm.

### 2.2 Dosagem de xiloglucano

Para a dosagem de xiloglucano foi utilizado o método colorimétrico (modificado de Kooiman, 1960). Em poço de placa de Elisa foram adicionados: 20 $\mu$ l de amostra, 40 $\mu$ l de I<sub>2</sub>/KI (5%), 40 $\mu$ l de tampão acetato de sódio 50mM pH 5,0 e 200 $\mu$ l de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. A concentração de xiloglucano foi calculada utilizando uma curva padrão de solução de xiloglucano de chagas de 100 a 600 $\mu$ g e a leitura feita em leitor de microplacas (3550-UV BIORAD).

### 2.3 Determinação da atividade enzimática de $\beta$ -glucosidase

As condições do ensaio para atividade de  $\beta$ -glucosidase foram 10 $\mu$ l de tampão acetato de sódio 50mM pH 5,0, 10 $\mu$ l de eluato em NaCl (proteínas eluídas em NaCl) e 10 $\mu$ l de substrato sintético ( $p$ -nitrofenil  $\beta$ -glucopiranosídeo 40mM -  $p$ NP- $\beta$ glc). Após 15 minutos de incubação a 40<sup>o</sup>C a reação foi interrompida com a adição de 1,0mL de carbonato de sódio 0,1N e a absorbância determinada em 405nm. A atividade da enzima foi expressa em  $\mu$ mol de  $p$ NP- $\beta$ glc.mL<sup>-1</sup>min<sup>-1</sup>

### 2.4 Determinação da atividade de $\alpha$ -xilosidase

A  $\alpha$ -xilosidase atua apenas sobre oligossacarídeos de xiloglucano, e não sobre substratos sintéticos ou polissacarídeos (Fanutti *et al.*, 1991). Neste ensaio foi utilizada como substrato uma solução de oligossacarídeos de xiloglucano de *Copaifera langsdorffii*, obtida por hidrólise exaustiva com celulase microbiana. Estes

blocos de oligossacarídeos são idênticos ao de *T. majus* L. (Buckeridge *et al.*, 1992).

A atividade de  $\alpha$ -xilosidase foi determinada pela liberação de pentoses livres, de acordo com Roe & Rice (1948). Em um microtubo com tampão acetato de amônio 1M pH 5,0 foram adicionados 20 $\mu$ l da solução de oligossacarídeos de xiloglucano de copaíba (7,6mg.ml<sup>-1</sup>) e 20 $\mu$ l de eluatos em NaCl (proteínas eluídas em NaCl) incubando-se por 24 horas a 30<sup>o</sup>C. O conteúdo do tubo foi separado em 2 alíquotas de 30 $\mu$ l em tubos de vidro contendo 970 $\mu$ l de água destilada. A cada um desses dois tubos foram adicionados 5mL de uma solução de  $p$ -Bromoanilina (2% em ácido acético saturado com tiouréia). Um dos tubos foi aquecido a 70<sup>o</sup>C por 10 minutos enquanto o outro foi mantido a temperatura ambiente no escuro. Estes meios de reação foram incubados a 30<sup>o</sup>C por 1 hora e foi feita a leitura da absorbância em 520nm, sendo utilizado como branco o tubo que não foi incubado a 70<sup>o</sup>C. Foi utilizada xilose como padrão.

### 2.5 Determinação de atividade de $\beta$ -galactosidase

A determinação da atividade da  $\beta$ -galactosidase nos eluatos com NaCl foi feita de forma semelhante à atividade de  $\beta$ -glucosidase. A única diferença foi o uso de  $p$ NP- $\beta$ -galactopiranosídeo (Sigma Chem. Co) como substrato.

### 2.6 Determinação da atividade de xiloglucano endo-transglicosilase (XET)

Para os ensaios da XET foi utilizado o método colorimétrico (Sulová *et al.*, 1995). Em um tubo de ensaio com 20 $\mu$ l de solução 0,1% de xiloglucano de *T. majus* foram adicionados 10 $\mu$ l de eluatos em NaCl (dialisados contra água) e 10 $\mu$ l de tampão acetato de sódio 50mM pH 5,0 incubando-se por 20 minutos a 45<sup>o</sup>C. A reação foi interrompida com adição de 0,1mL de HCl 1M. Posteriormente, adicionou-se 1mL de solução 20% (m/v) de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e 0,2mL de solução de iodo-iodeto de potássio (5%) em cada tubo, deixando-os em repouso por uma hora no escuro. Utilizou-se como controle a reação sem extrato enzimático. A leitura da absorbância das amostras foi feita em 620nm.

### **3.0 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida**

A análise qualitativa das proteínas solúveis foi feita através de eletroforese em gel de poliacrilamida em dodecil sulfato de sódio (SDS) e empregando um sistema de tampão descontínuo (Laemmli, 1970).

As eletroforeses foram feitas com mini-géis de 0,75mm de espessura (9,0 x 6,0cm) contendo 15% de acrilamida na concentração final, montados em cuba vertical de eletroforese.

As amostras de proteínas eluídas em NaCl 0,5M foram dialisadas contra água, liofilizadas e retomadas em 10 $\mu$ L de tampão de amostra, em seguida fervidas por 5 minutos. Foram aplicados no gel 10 $\mu$ L do tampão de amostra contendo 50 $\mu$ g de proteínas de cada amostra. O gel foi submetido a corrente constante de 20mA por aproximadamente 90 minutos. Posteriormente revelado por imersão em solução de azul de Comassie R 250 0,1% (p/v) dissolvido em água, metanol, ácido acético glacial (5:5:2 - v/v/v) durante 30 minutos, a temperatura ambiente e agitação contínua. Em seguida, o gel foi descorado com água destilada em forno de microondas (SHARP RB-5H66) por 2 minutos. O gel descorado foi novamente corado com prata (BIORAD, de acordo com as instruções do fabricante), e mantido em solução descolorante contendo metanol 10% (p/v) e ácido acético glacial 7,5% (p/v), sob agitação e com trocas freqüentes.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### **1. Interação proteínas-celulose e proteínas-complexo cel-xg**

Para o primeiro ensaio de interação entre proteínas obtidas dos cotilédones de *T. majus* com cel e cel-xg foram utilizadas sementes de um primeiro lote, onde os cotilédones foram coletados no 18<sup>o</sup> dia após embebição, período em que observa-se máxima atividade de  $\beta$ -galactosidase (Edwards *et al.*, 1988). Como controle foi testada a desnaturação de proteínas por fervura e os ensaios foram realizados em temperatura ambiente. Quando uma solução a 0,1% de albumina de soro bovino, foi utilizada nos ensaios de interação com cel e cel-xg, somente cerca de 10% de interação foi observado. Por isso, optou-se por usar como controle somente o extrato de *T. majus* desnaturado por temperatura. Com relação ao estudo de interação de proteínas e polissacarídeos, não foram observadas diferenças na quantidade de proteínas adsorvidas para os extratos desnaturados e não desnaturados. Isso ocorreu, tanto em celulose (cel) quanto no complexo celulose-xiloglucano (cel-xg) (tabela 1). No entanto, observou-se que a quantidade de proteínas eluídas de cel ou cel-xg foi maior quando a interação foi realizada a partir de extratos não fervidos (valores em negrito na tabela 1). Provavelmente, no processo de desnaturação sítios hidrofóbicos se tornariam expostos facilitando uma interação mais forte entre estas proteínas e os polissacarídeos, dificultando desta maneira a eluição mesmo utilizando NaCl 0,5M.

Durante os ensaios de otimização das condições de interação entre as proteínas obtidas dos cotilédones de *T. majus* L.com os polissacarídeos (cel ou cel-xg), foram ensaiadas pH e temperatura de incubação.

Tabela 1. Interação de proteínas com celulose e com o complexo cel-xg. Extrato obtido no 18<sup>o</sup> dia após a embebição. Eluição de proteínas a partir dos tratamentos cel e cel-xg.

Tratamentos	% Proteínas adsorvidas *	% Proteínas eluídas **
cel-xg + Extrato fervido	70,7	27,0
cel-xg + Extrato não-fervido	68,7	<b>63,0</b>
cel + Extrato fervido	74,9	18,0
cel + Extrato não-fervido	69,5	<b>27,7</b>

\* % de proteínas adsorvidas à cel ou cel-xg do total de proteínas adicionadas no ensaio (47,94 µg)

\*\* % de proteínas eluídas com NaCl em relação ao total de proteínas adsorvidas

## **2. Efeito de pH e temperatura na interação e eluição das proteínas**

Analisando a interação de proteínas com os polissacarídeos em diferentes pHs, observa-se que as interações realizadas a 30<sup>o</sup>C foram maiores em pH 4,0 (figura 2A). As interações realizadas a 45<sup>o</sup>C apresentam um ótimo de pH 2 e 4 tanto para o tratamento com celulose como para o tratamento cel-xg as maiores interações (figura 2B). Apesar dos diferentes comportamentos relacionados aos pHs nas duas temperaturas, o máximo de interação entre proteínas e cel ou cel-xg foram similares (aproximadamente 160µg.mL<sup>-1</sup> ).

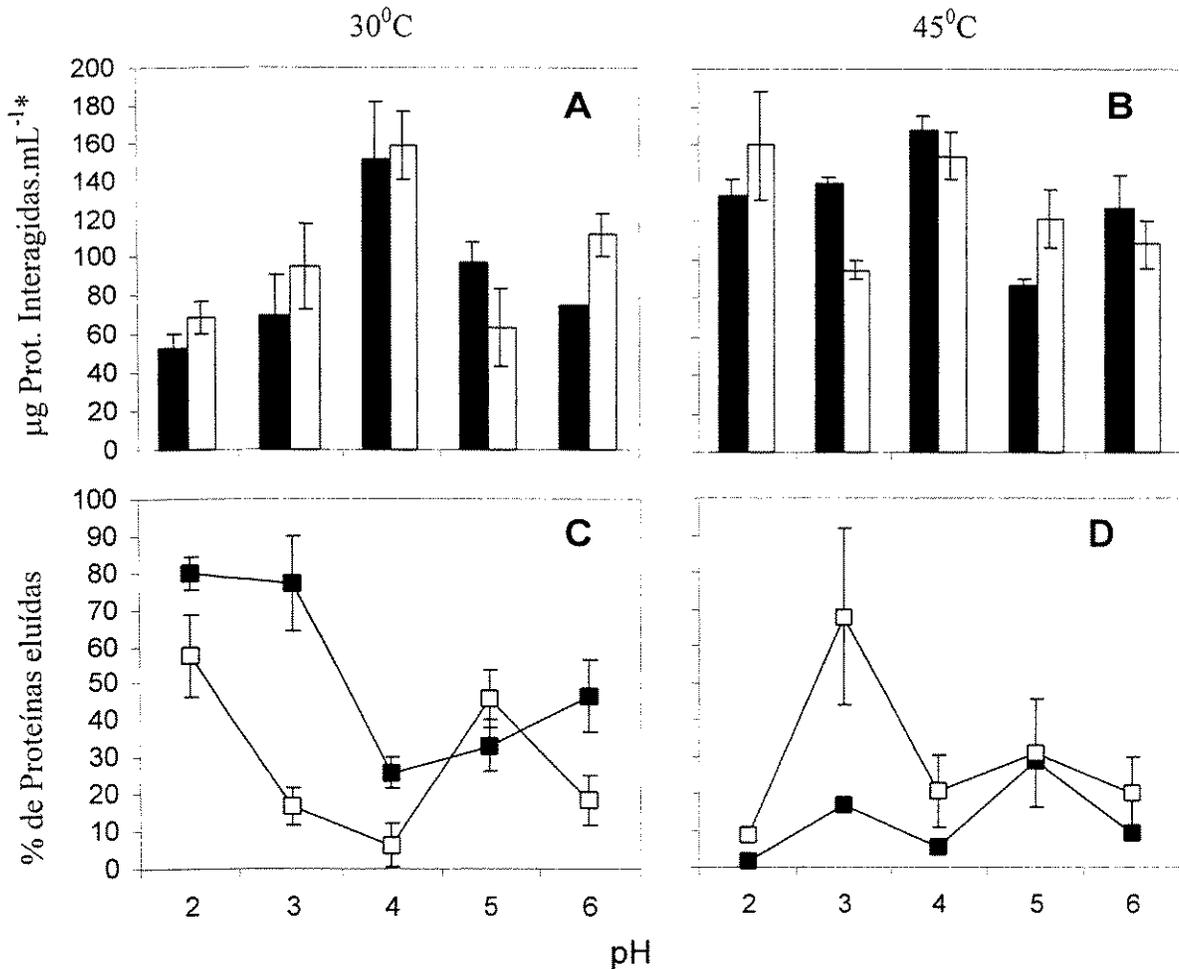


Figura 2. Efeito do pH e da temperatura na interação de proteínas com celulose microcristalina e celulose-xiloglucano em cotilédones de *Tropaeolum majus* com 12 dias. Concentração de proteínas adsorvidas à cel e ao complexo cel-xg (A e B); (C e D) – Percentual de proteínas eluídas (com NaCl 0,5M em tampão acetato de sódio 50mM pH 5,0) da celulose e do complexo cel-xg. Em (A,C) a temperatura utilizada foi de 30°C e em (B,D) 45°C.

(■) proteínas adsorvidas ou eluídas de celulose microcristalina;

(□) proteínas adsorvidas ou eluídas do complexo cel-xg;

(\*)  $\mu\text{g}$  de proteína interagida.mL<sup>-1</sup> = prot.mL<sup>-1</sup> no sobrenadante antes e depois da interação.

Observa-se na figura 2C que com exceção do pH 5,0, a eluição das proteínas adsorvidas à celulose nos ensaios a 30°C foi maior, comparado com a eluição das proteínas adsorvidas ao complexo cel-xg. Além disso, um maior percentual de eluição destas proteínas (em torno de 80% do total de proteínas adsorvidas) ocorreu nos ensaios de interação nos pHs 2 e 3.

Com exceção do pH 5,0, a eluição das proteínas interagidas com o complexo cel-xg nos ensaios de interação a 45°C foi maior que a eluição das proteínas interagidas com celulose. A maior eluição destas proteínas foi observada nos ensaios de interação em pH 3,0. A proporção de proteínas eluídas foi de aproximadamente 70% do total de proteínas interagidas com o complexo cel-xg. Como eram as proteínas do complexo cel-xg as de principal interesse, as condições de ensaios de interação nos experimentos posteriores foram estabelecidas em pH 3,0 e temperatura 45°C.

Esta maior eluição de proteínas adsorvidas ao complexo cel-xg poderia ter sido facilitada por modificações estruturais ocorridas no xiloglucano durante a incubação a 45°C. Tais modificações na estrutura do xiloglucano têm sido observadas em ensaios de interação com iodo-iodeto de potássio utilizando diferentes temperaturas (Miguel Minhoto, Marco Tiné e Marcos Buckeridge, comunicação pessoal). Outro evento que poderia estar ocorrendo seriam modificações na conformação da própria proteína liberando com mais facilidade o sítio de ligação ao xiloglucano a 45°C.

### **3. Interação das proteínas com celulose e com o complexo cel-xg e atividade de $\beta$ -galactosidase durante o período de germinação**

Para este ensaio um novo lote de sementes foi utilizado, uma vez que o lote anterior não apresentava mais neste período germinação uniforme.

Assumindo que proteínas que se ligassem especificamente ao xiloglucano poderiam estar presentes durante o período de sua mobilização nos cotilédones de *T. majus*, decidiu-se acompanhar esse processo traçando um perfil de atividade de  $\beta$ -galactosidase, que serve como marcadora da mobilização. O período de maior atividade desta enzima foi seguido paralelamente a ensaios de interação de proteínas com celulose e com o complexo cel-xg. Os perfis de teores de proteínas e de atividade enzimática encontrados estão na figura 3. Foi detectado um platô de atividade entre os dias 11 e 13 após o início da embebição. Nesse período, o xiloglucano está em processo de degradação e já apresenta um decréscimo significativo na viscosidade (Edwards *et.al.*, 1985). Assim, considerou-se a princípio que o 12<sup>o</sup> dia seria o dia favorável para detecção de proteínas que se ligam à celulose e/ou ao complexo cel-xg, pois apesar da degradação já estar avançada, a maioria das proteínas ainda está presente no tecido (Buckeridge e Reid, 1994) e a atividade de  $\beta$ -galactosidase, aqui utilizada como parâmetro na degradação do xiloglucano, era máxima (Figura 3). O teor de proteínas no extrato caiu do 9<sup>o</sup> ao 11<sup>o</sup> dia, mantendo-se constante até o 13<sup>o</sup> e depois caindo a valores extremamente baixos até o fim do período de análise.

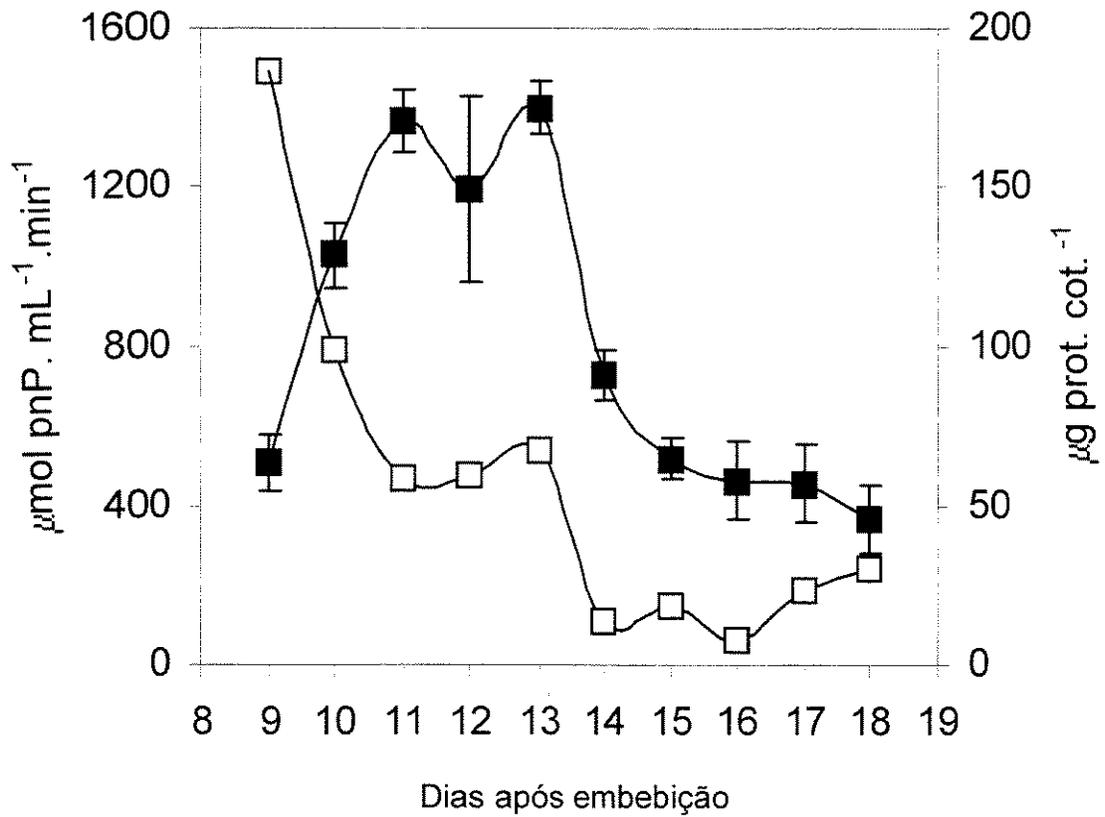


Figura 3. Teor de proteínas ( $\square$ ) e atividade de  $\beta$ -galactosidase ( $\blacksquare$ ) em cotilédones de *Tropaeolum majus* durante o período de mobilização do xiloglucano de reserva.

As proteínas presentes nos extratos obtidos nos diferentes dias após o início da embebição interagiram de forma distinta com a celulose ou complexo celulose-xiloglucano (figura 4). No décimo dia foram detectados altos níveis de interação, seguidos de uma diminuição drástica. Do 11<sup>o</sup> ao 15<sup>o</sup> dia os níveis de interação aumentaram linearmente, sendo que nos dias 14 e 15, as diferenças entre celulose e celulose-xiloglucano foram significativas. Esses dados demonstraram o aparecimento de proteínas que se ligam à celulose após o período de mobilização do xiloglucano. Além disso, as proteínas nesses extratos parecem competir com o xiloglucano pela celulose, uma vez que a presença de xiloglucano parece diminuir a interação das proteínas com a celulose. Nesse experimento as percentagens das proteínas totais que interagem com a celulose foram muito altas. No 10<sup>o</sup> dia, 80% das proteínas haviam interagido, caindo para 20-30% no 11<sup>o</sup> dia e em média se mantendo ao redor de 50% nos demais dias, exceto pelos dias 14 e 15 onde a interação foi máxima.

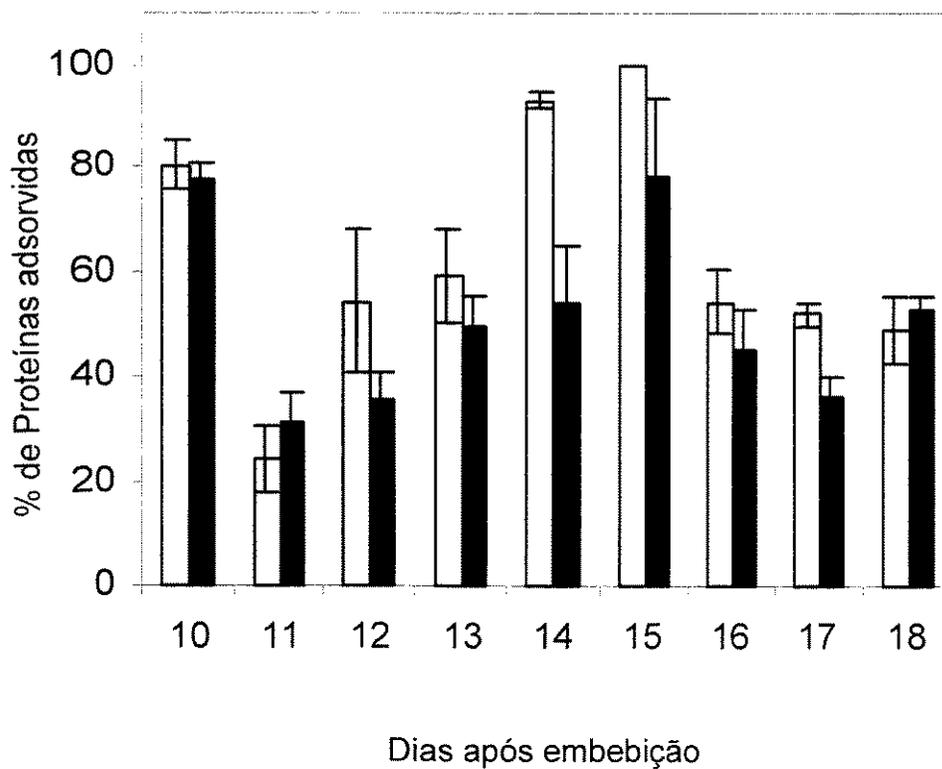


Figura 4. Percentagem de proteínas adsorvidas à celulose (■) e ao complexo cel-xg (□). Os ensaios de interação foram realizados em tampão citrato-fosfato 50mM pH3,0 e o percentual de proteínas adsorvidas foi calculado através da diferença entre a quantidade de proteínas adicionadas e a quantidade de proteínas no sobrenadante após a interação.

Utilizando as condições ótimas pré estabelecidas para a obtenção das proteínas que interagem com complexo cel-xg (Figura 2), uma nova interação de proteínas com celulose e com o complexo cel-xg foi realizada utilizando somente o extrato do 12º dia e observou-se que as quantidades de proteínas que interagem tanto com celulose como com o complexo cel-xg, não foram significativamente diferentes (figura 5). No entanto, a interação destas proteínas ao complexo cel-xg pareceu ser significativamente mais forte, uma vez que, utilizando as mesmas condições para a eluição, a quantidade de proteínas eluídas deste complexo foi menor que aquela eluída da celulose. Como a porcentagem de interação das proteínas com a celulose e com o complexo cel-xg foi a mesma e a quantidade eluída diferiu, sugere-se o que xiloglucano poderia estar proporcionando uma interação mais forte destas proteínas, dificultando, portanto, a eluição dos polipeptídeos.

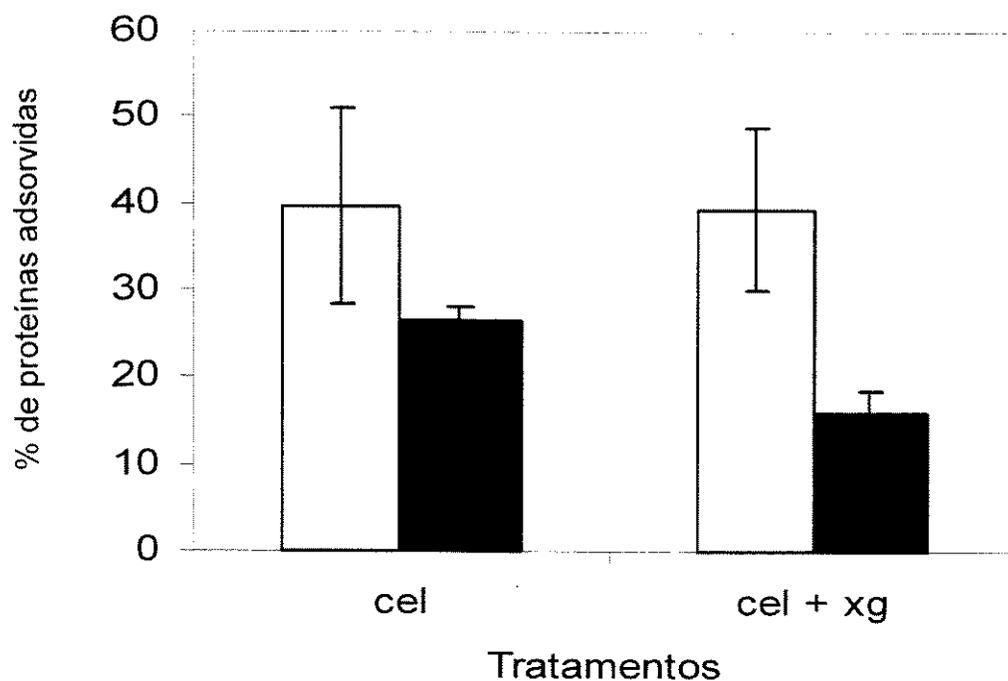


Figura 5. Porcentagens de proteínas adsorvidas (□) e eluídas com NaCl 0,5M (■) das interações com celulose e complexo cel-xg. O extrato obtido no 12<sup>o</sup> dia após a embebição apresentava um teor de proteínas de  $312\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , sendo aplicados  $500\mu\text{L}$  para os ensaios de interação com celulose (20mg) e com complexo cel-xg (20mg de cel +  $600\mu\text{g}$  xg).

Num experimento de interação utilizando proteínas do extrato do 14<sup>o</sup> dia após embebição porém mais concentrado, observou-se que a quantidade de proteínas adsorvidas à celulose e ao complexo cel-xg também não mostrou diferenças significativas em relação às do 12<sup>o</sup> ( figura 5). A quantidade de proteínas eluídas do complexo cel-xg foi menor do que da celulose, como ocorreu também com as proteínas do 12<sup>o</sup>, mostradas na figura 5.

Para averiguar o efeito da concentração de proteínas na interação com cel e com cel-xg, foi feita uma curva de interação utilizando 4 concentrações diferentes proteínas (figura 6) e, observou-se que a interação das proteínas com celulose saturou em aproximadamente  $40\mu\text{g.mL}^{-1}$  de proteína. Por outro lado, a interação com cel-xg saturou em  $80\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Tal fenômeno pode estar relacionado ao fato de o xiloglucano aumentar a superfície de interação do complexo. Quando uma concentração de proteínas ainda maior foi utilizada ( $140\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) observou-se uma diminuição na proporção de proteínas adsorvidas para um nível similar à celulose. Uma possível explicação para este fato é que acima de  $80\mu\text{g.mL}^{-1}$  a XET poderia estar interferindo na interação cel-xg, hidrolisando o xiloglucano, de forma que esse se desprendesse da celulose, diminuindo assim a área de adsorção para as proteínas e igualando as quantidades de proteínas adsorvidas. De fato Lima e Buckeridge (2000) observaram que todo o xiloglucano interagido com celulose microcristalina pode ser hidrolizado com celulase fúngica.

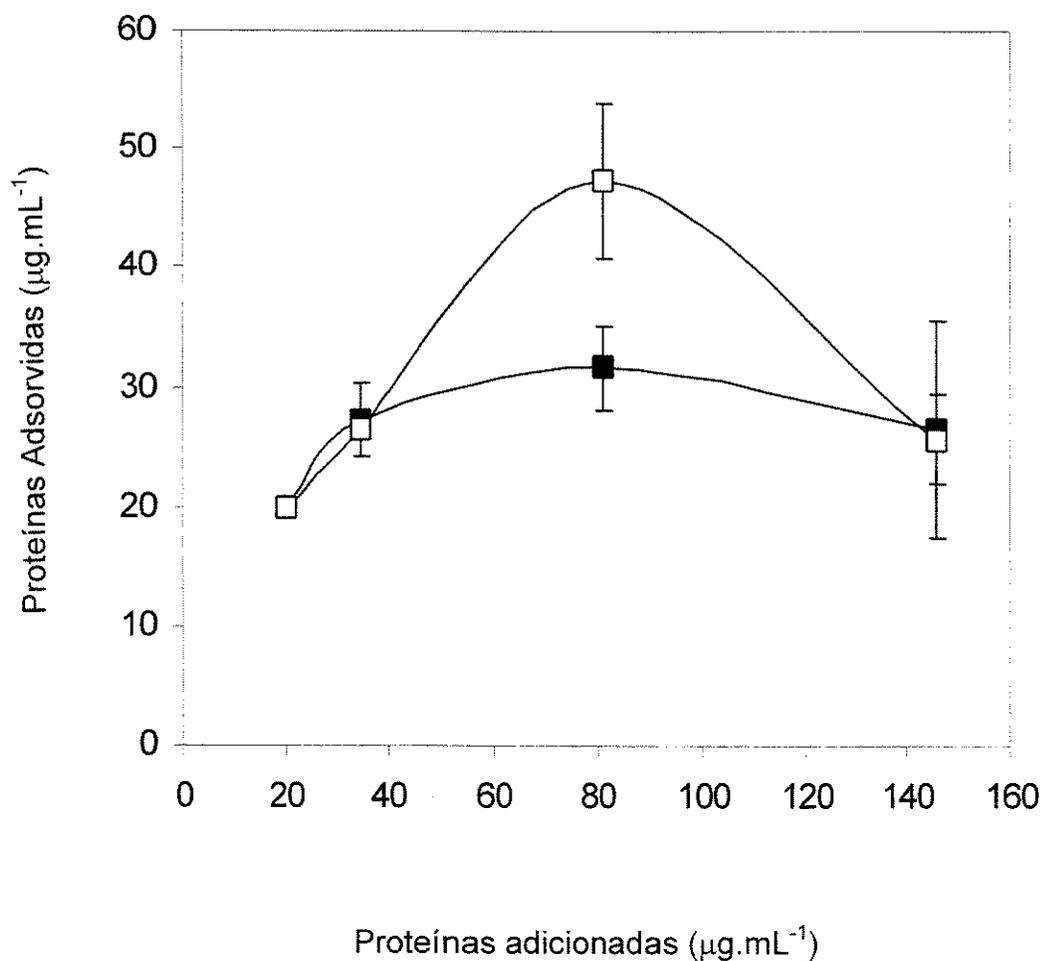


Figura 6. Efeito da concentração de proteínas na capacidade de adsorção à celulose (■) e ao complexo cel-xg (□). Os ensaios de interação foram realizados em pH 3,0 à 45°C, e a quantidade de proteínas adsorvidas foi calculada através da diferença entre a quantidade de proteínas adicionadas e a quantidade total de proteínas no sobrenadante após a interação.

#### **4. Análise por SDS-PAGE das proteínas que interagem com celulose e com o complexo celulose-xiloglucano**

Alguns polipeptídeos interagem com a celulose microcristalina, sendo os principais com massas moleculares 63, 43, 39 e 36kDa (figura 7). Um dos mais abundantes foi o de 43kDa, e juntamente com os de 39 e 36kDa, aparecem também no sobrenadante (não interagidos). Isso sugere que os sítios de ligação na celulose para esses polipeptídeos foram saturados nas concentrações de proteínas utilizadas. A interação dos mesmos extratos com o complexo cel-xg mostrou que uma proporção maior da banda de 43kDa interagiu, sugerindo que a adição de xiloglucano aumentou o número de sítios de ligação para esse polipeptídeo. Como a semelhança molecular entre celulose e xiloglucano está na cadeia principal, que é de  $\beta(1\rightarrow4)$  glucano, é possível que este polipeptídeo tenha afinidade por este motivo estrutural. Uma diferença importante entre os perfis de polipeptídeos eluídos de celulose e do complexo celulose-xiloglucano é o desaparecimento de uma banda de 63kDa, que aparece somente no primeiro. Esse resultado sugere que o xiloglucano interage com a celulose (figura 8) de forma a “esconder” sítios específicos de ligação da proteína de 63kDa à celulose. Isso reforça a hipótese levantada anteriormente de que o xiloglucano controla o acesso aos sítios de ligação de proteínas a alguns sítios da celulose.

Apesar de não terem sido detectadas atividades de  $\beta$ -galactosidase ou de xiloglucano-endo-transglicosilase nos extratos eluídos de cel e do complexo cel-xg com NaCl, foi detectada uma proteína de 33kDa (figura7) cuja a massa molecular é próxima à da XET (30kDa). Esse resultado em conjunto com a observação de que a proteína de 33kDa interage mais fortemente com o complexo cel+xg, sugere que a XET seja uma das proteínas que se ligam a  $\beta(1\rightarrow4)$  glucanos nas condições experimentais utilizadas nesse trabalho. Essa hipótese pode ainda ser reforçada pelo fato de que em concentrações elevadas de proteínas, observa-se menos interação de proteínas com cel+xg. Esse fato pode também ser atribuído a ação hidrolítica da XET como mencionado na página 40. Em conjunto, esses resultados sugerem que os polipeptídeos que interagem com a celulose e com o complexo cel-xg

provavelmente não seriam as enzimas de hidrólise do xiloglucano, uma vez que as massas moleculares não coincidem também com os da demais enzimas já reportadas para o sistema ( $\beta$ -glucosidase=76 kDa e  $\alpha$ -xilosidase=75kDa), com exceção a de 33kDa.

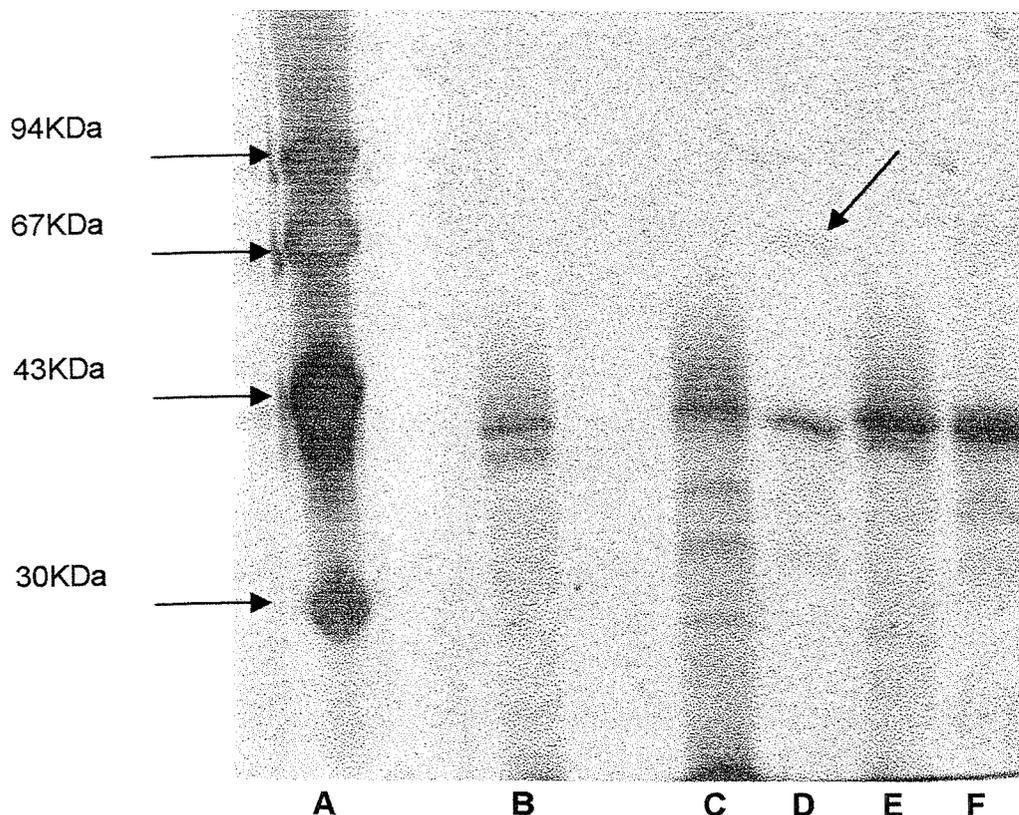


Figura 7. SDS-PAGE das amostras de proteínas do extrato bruto em pH 3,0 (B), sobrenadante após interação proteína-celulose (C), proteínas eluídas da interação proteína-celulose com NaCl (D), sobrenadante após interação proteína-celulose-xiloglucano (E) e proteínas eluídas da interação com celulose-xiloglucano com NaCl (F). O perfil (A) mostra os padrões, e a seta em (D) mostra o aparecimento da banda de 63KDa somente neste tratamento.

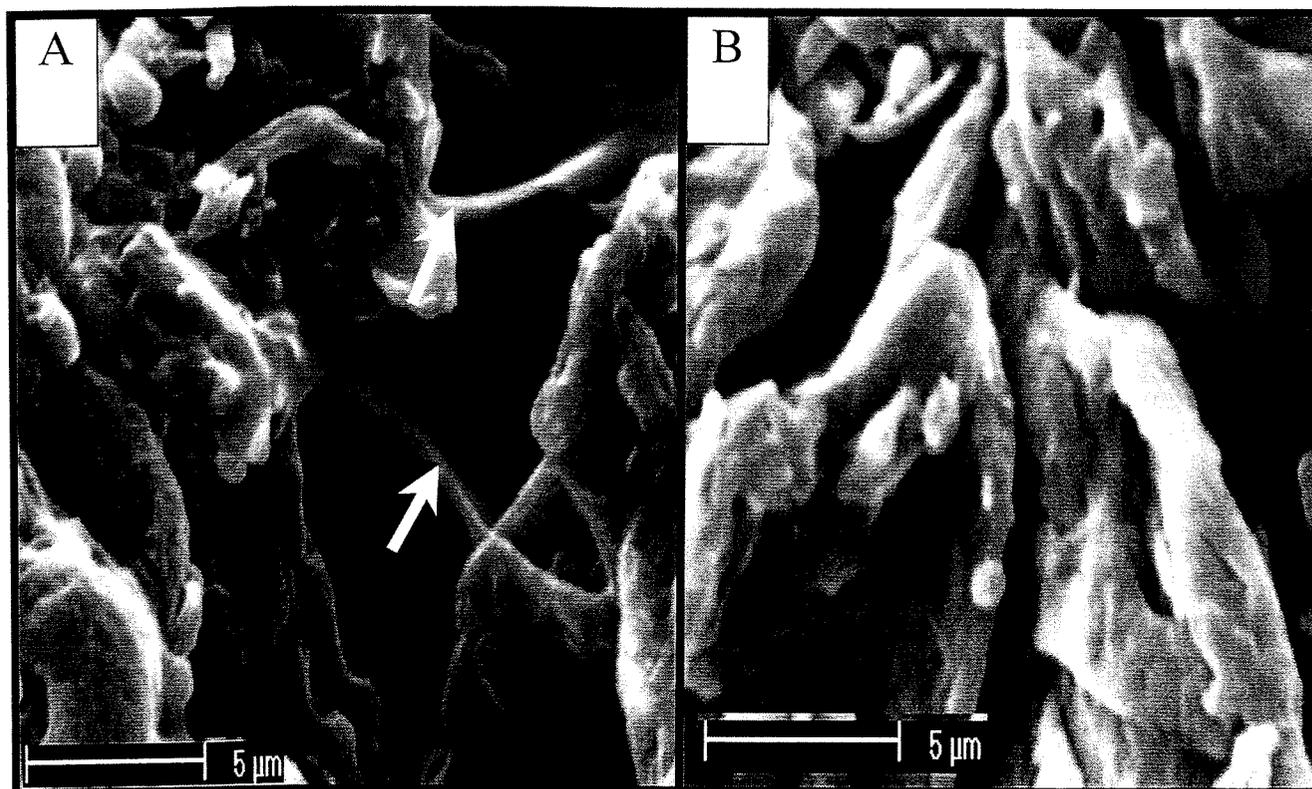


Figura 8. Análise do complexo celulose-xiloglucano(A) e celulose microcristalina (B) por microscopia eletrônica de varredura. O xiloglucano cobre toda a superfície da celulose microcristalina (Avicel), 20% de xiloglucano de *Tropaeolum majus* L. aplicado interagem *in vitro* com a celulose. A seta mostra regiões de auto-interação entre as moléculas de xiloglucano que inclusive unem alguns dos fragmentos de celulose microcristalina.

## **5. Comparação das proteínas de 43 e 63kDa com outras proteínas conhecidas que interagem com paredes celulares**

Nossos resultados mostram que em cotilédones de *T. majus* L. em desenvolvimento há dois tipos de polipeptídeos que interagem diferencialmente com a celulose e com o complexo cel-xg. Uma banda a 63kDa que apresenta competição com o xiloglucano em se ligar com a celulose e uma banda de 43kDa que se liga a ambos, mas principalmente ao complexo cel-xg. Essas proteínas não apresentam atividade enzimática ou identidade com as massas moleculares das hidrolases conhecidas do sistema. Além disso, os polipeptídeos de 43 e 63kDa parecem não estar envolvidos na mobilização do xiloglucano, mas com eventos que ocorrem anterior ou posteriormente. Estes polipeptídeos foram observados também em extratos provenientes do 14<sup>o</sup> dia após a embebição, repetindo assim os mesmos resultados (dados não mostrados).

Em estudos de degradação de parede primária, as expansinas são consideradas os primeiros agentes atuantes e embora não apresentem atividade catalítica, seu papel é de destaque devido ao fato de que facilitam o acesso das hidrolases, ao se ligarem à celulose. Tais eventos são observados em paredes de células em crescimento, onde as expansinas estariam sendo ativadas pelo pH ácido do meio. Em hipocótilos de pepino (Cosgrove, 1999), coleoptile de aveia (Li *et al.*, 1993) onde a parede foi tratada com altas temperaturas, desnaturando as proteínas, observou-se um rearranjo na parede promovendo, assim, a expansão celular uma vez adicionadas essas proteínas. No processo de amadurecimento de frutos também foi observado que expansinas estariam previamente rompendo as ligações não covalentes entre as hemiceluloses, neste caso o xiloglucano e as microfibrilas de celulose, facilitando com isto o acesso das poligalacturonases, as quais posteriormente promovem o amolecimento do fruto (Rose *et al.*, 1997). Em paredes secundárias, no processo de mobilização de reserva, expansinas nunca foram observadas. Uma outra classe de proteínas participando do desmonte da parede via afrouxamento das hemiceluloses, são os CBDs, exclusivos de bactérias e fungos. Estes se ligam à celulose competindo com o xiloglucano, e com isso promovem o

afrouxamento da parede e em seguida o acesso das hidrolases. Experimentos com CBDs isolados de fungos em parede primária de células de tubos polínicos de pessegueiro, mostraram um crescimento acentuado devido ao fato dos CBDs estarem atuando como mediadores do processo de afrouxamento, o que é primordial para o crescimento (Sphigel *et al.*, 1998).

Atualmente já se sabe que expansinas e CBDs podem atuar sinergisticamente na parede em sítios de ligação diferentes na celulose promovendo, desta maneira, o acesso das enzimas de degradação e de transglicosilação (Cosgrove, 1999).

Sabe-se também que expansinas e CBDs, apesar de apresentarem homologia em alguns domínios, e de possuírem funções semelhantes, não são compostos iguais e agem em organismos diferentes. As expansinas não competem com xiloglucano pelo mesmo sítio de ligação à celulose enquanto os CBDs os fazem (Cosgrove, 1999).

O fato de o aparecimento das proteínas que interagem com celulose ou complexo cel-xg em cotilédones de *T. majus* estar aparentemente desconectado temporalmente do sistema bioquímico de mobilização, sugere que estas proteínas poderiam estar participando de eventos de alteração na parede celular primária, antes ou após a mobilização. Em todos os sistemas em que polissacarídeos de parede celular são armazenados, modificações drásticas na aparência e composição das paredes celulares têm sido reportadas (Buckeridge *et al.*, 2000). Por tratar-se de um cotilédone, em alguns sistemas (*Lupinus angustifolius* por exemplo), uma transformação de fato ocorre e parece estar conduzindo-o a se diferenciar de um órgão de reserva para um órgão fotossintetizante.

Durante o processo de mobilização de polissacarídeos em parede secundária detectamos alguns polipeptídeos interagindo com celulose e com o complexo cel-xg que poderiam talvez estarem participando do processo de desmonte de parede de uma forma análoga a das expansinas, ou talvez, no caso específico dos cotilédones de *T. majus* os eventos de pós mobilização poderiam estar relacionados ou ao processo de desenvolvimento foliar, já que os cotilédones são folhas modificadas, ou então, ao fenômeno de senescência foliar, que por sua vez,

se assemelha em vários aspectos ao processo de amadurecimento de frutos, no qual a ação das expansinas já foi detectada.

Devido ao fato dos polipeptídeos com 43 e 63kDa serem provenientes de um extrato protéico dialisado, é grande a probabilidade de que estes polipeptídeos não sejam lectinas, uma vez que para a ligação destas proteínas aos carboidratos é imprescindível a presença de cátions divalentes. Apesar dos CBDs também apresentarem cátions divalentes em sua estrutura, já foi demonstrado que estes cofatores não são necessários para a ligação do CBD ao substrato (Tormo *et al.*, 1996), o que sugere que os polipeptídeos 43 e 63kDa poderiam ter alguma analogia com estes CBDs .

Levando-se em consideração que os polipeptídeos de 43 e 63kDa foram provenientes de um extrato protéico constituído por proteínas citoplasmáticas e extracelulares, não se pode afirmar que estes sejam específicos da parede celular, apesar da alta capacidade de interação com os polímeros da parede, como xiloglucano e celulose.

Num experimento para averiguação da capacidade dos polipeptídeos de 43 e 63kDa em desfazer o complexo cel-xg, não foi observada solubilização do xiloglucano a partir do complexo cel-xg tratado com uma mistura dos polipeptídeos 43 e 63. No entanto, o fato de os extratos protéicos para este experimento não terem sido dialisados, não permite descartar a possibilidade de proteases terem alterado ou degradado os polipeptídeos. Para sabermos se estes polipeptídeos são de fato expansinas sugere-se a utilização de técnicas de biologia molecular, como o sequenciamento do N-terminal destes peptídeos para comparação da sequência de aminoácidos com as sequências de aminoácidos das expansinas, como as LeExp1 ou LeExp2 de frutos de tomate (Rose & Bennett, 1999)

A utilização destes polipeptídeos que se ligam à celulose microcristalina pode ser uma ferramenta acessível e não dispendiosa para separação de outras proteínas, a partir da clonagem destas com os polipeptídeos 43 e 63kDa de cotilédones de *T. majus*.

## CONCLUSÕES

Com o trabalho realizado pode-se concluir que:

- Há proteínas que se ligam à celulose e ao complexo celulose-xiloglucano.
- Elas interagem melhor em pH 3,0 a 30<sup>o</sup>C e 45<sup>o</sup>C. As proteínas que interagiram a 45<sup>o</sup>C em pH 3,0 foram as que eluíram com facilidade do complexo celulose-xiloglucano.
- Em cotilédones de *Tropaeolum majus* L. existem dois polipeptídeos (43 e 63kDa) que se ligam especificamente a  $\beta(1\rightarrow4)$  glucanos. A presença destes polipeptídeos durante e após o período de mobilização do xiloglucano de reserva, sugere que estes polipeptídeos poderiam estar envolvidos com controle da ação das hidrolases do xiloglucano.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCÂNTARA, P.H.N. 1995 Purificação e caracterização da  $\beta$ -galactosidase de sementes de *Copaifera langsdorffii* e suas relações com o metabolismo do xiloglucano. Tese de mestrado. Escola Paulista de Medicina, UNIFESP, São Paulo.
- ALCÂNTARA, P.H. 2000. Isolamento e caracterização das enzimas xiloglucano endo transglicosilase e  $\beta$ -galactosidase do catabolismo do xiloglucano de reserva dos cotilédones de *Hymenaea courbaril* L. (LEGUMINOSAE-CAESALPINIOIDEAE). Tese de doutorado. Escola Paulista de Medicina, UNIFESP, São Paulo.
- ALCÂNTARA, P.H., DIETRICH, S.M.C. & BUCKERIDGE, M.S. 1999. Xyloglucan mobilisation and purification of a (XLLG/XLXG) specific  $\beta$ -galactosidase from cotyledons of *Copaifera langsdorffii*. Plant Physiol. Biochem 37(9): 653-656.
- BAYER, E.A., CHANZY, H., LAMED, R. & SHOHAM, Y. 1998. Cellulose, cellulases and cellosomes. Curr. Opin. Struct. Biol 8: 548-557.
- BEWLEY, J.D. & BLACK, M. 1978. Physiology and Biochemistry of seeds in Relation to Germination. v1. Springer-Verlag, Berlin.
- BRADFORD, M. 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem 72: 248-254.
- BUCKERIDGE, M.S & DIETRICH, S.M.C. 1996. Mobilisation of the raffinose family oligosaccharides and galactomannan in germinating seeds of *Sesbania marginata* Benth. (Leguminosae-faboideae). Plant. Science 117: 33-43.
- BUCKERIDGE, M.S. & REID, J.S.G. 1994. Purification and properties of novel  $\beta$ -galactosidase or exo- $\beta$ -(1-4)-galactanase from the cotyledons of germinated *Lupinus angustifolius* L. seeds. Planta 192:502-511.
- BUCKERIDGE, M.S. & REID, J.S.G. 1996. Major cell wall storage polysaccharides in legume seeds: structure, catabolism and biological functions. Ciência e Cultura 48(3): 153-162.
- BUCKERIDGE, M.S., ROCHA, D.C., REID, J.S.G. & DIETRICH, S.M.C. 1992. Xyloglucan structure and post-germinative metabolism in seeds of *Copaifera langsdorffii* from savanna and forest populations. Physiol. Plant. 84: 145-151.
- BUCKERIDGE, M.S., SANTOS, H.P., TINÉ, M.A. 2000. Mobilisation of storage cell wall polysaccharides. Plant. Physiol. Biochem 38(1/2): 141-156.

- CARPITA, N.C. & GIBEAUT, D.M. 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.* 3: 1-30.
- CRAWSHAW, L.A. & REID, J.S.G. 1984. Changes in cell-wall polysaccharides in relation to seedling development and mobilisation of reserves in the cotyledons of *Lupinus angustifolius* cv. Unicrop. *Planta* 160: 449-454.
- COSGROVE, D.J. 1998. Cell Wall Loosening by Expansins. *Plant Physiol.* 118: 333-339.
- COSGROVE, D.J. 1999. Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. *Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 50 : 391-417.
- COSGROVE, D.J. 2000. Expansive growth of plant cell walls. *Plant. Physiol. Biochem.* 38(1/2): 109-124.
- CROMBIE, H.J, CHENGAPPA, S., HELLYER, & REID, J.S.G. 1998. A xyloglucan oligosaccharide-active, transglycosylating  $\beta$ -D-glucosidase from the cotyledons of nasturtium (*Tropaeolum majus* L.) seedlings-purification, properties and characterization of cDNA clone. *Plant. J.* 15:27-38.
- DELMER, D.P & AMOR, Y. 1995 Cellulose biosynthesis. *The Plant Cell.* 7: 987-1000.
- DE SILVA, J., JARMAM, C., ARROWSMITH, D.A., STRONACH, M.S., CHENGAPPA, S., SIDEBOTTOM, C. & REID, J.S.G. 1993. Molecular characterization of a xyloglucan-specific endo-(1,4)-beta-D-glucanase (xyloglucan endo-transglycosylase) from nasturtium seeds. *Plant. J.* 3(5): 701-711.
- EDA, S. & K. KATO. 1978. An Arabinoxylglucan isolated from the Midrib of the Leaves of *Nicotiana tabacum* L. 1978 *Agric. Biol. Chem.* 42: 351-357.
- EDWARDS, M.; BOWMAN, J.L., DEA, I.C.M., REID, J.S.G. 1988. A beta-D-galactosidase from nasturtium (*Tropaeolum majus* L.) cotyledons. *J. Biol. Chem.* 263: 4333-4337.
- EDWARDS, M., DEA, I.C.M., BULPIN, P.V., REID, J.S.G. 1985. Xyloglucan (amyloid) mobilisation in the cotyledons of *Tropaeolum majus* L. seeds following germination. *Planta* 163 .133-140.
- EDWARDS, M., DEA, I.C.M., BULPIN, P.V., REID, J.S.G. 1986. Purification and properties of a novel xyloglucan-specific endo- $\beta$ -(1,4)-D-glucanase from

- germinating nasturtium seeds (*Tropaeolum majus* L.). J. Biol.Chem. 261:9489-9494.
- FANUTTI, C., GIDLEY, M. J., REID, J. S. G. 1991. A xyloglucan oligosaccharide specific  $\alpha$ -D-xylosidase or exo-oligoxyloglucan- $\alpha$ -xylohydrolase from germinated nasturtium (*Tropaeolum majus* L.) seeds. Purification, properties and its interaction with a xyloglucan-specific endo-(1,4)- $\beta$ -glucanase and other hydrolases during storage xyloglucan mobilization. *Planta* 184:137-147.
- FANNUTI, C., GIDLEY, M.J. & REID, J.S.G. 1993. Action of a pure xyloglucan endo-transglycosylase (formerly called xyloglucan-specific endo-(1,4)- $\beta$ -D-glucanase) from the cotyledons of germinated nasturtium seeds. *Plant J.* 3: 691-700.
- FRY, S.C., SMITH, R.C., RENWICK, K.F., MARTINS, D.J., HODGE, K.J. & MATTEWS, K.J. 1992. Xyloglucan endotransglycosylase, a new wall-loosening enzyme activity from plants. *Biochem. J.* 282: 821-828.
- FRY, S.C., YORK, W.S., ALBERSHEIN, P., DARWILL, A., HAYASHI, T., JOSELEAU, J.P., KATO, Y., LORENCES, E.P., MACLACHLAN, G.A., MCNEIL, M., MORT, A.J., REID, J.S.G., SEITZ, H.U., SELVENDRAN, R.R., VORAGEN, A.G.J, WHITE, A.R. 1993. An unambiguous nomenclature for xyloglucan-derived oligosaccharides. *Physiol. Plant.* 89: 1-3.
- GIDLEY, M.J., LILLFORD, P.J., ROWLANDS, D. W., LANG, P., DENTINI, M., CRESCENZI, V., EDWARDS, M., FANUTTI, C. & REID, J.S.G. 1991. Structure and solution properties of tamarind-seed polysaccharide. *Carbohydr. Res.* 214: 299-314.
- HAYASHI, T. 1989. Xyloglucans in the primary cell wall. 1989. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40: 139-168.
- HENSEL, A., BRUMMELL, D.A., HANNA, R. & MACLACHLAN, G. 1991. Auxin-dependent breakdown of xyloglucan in cotyledons of germinating nasturtium seeds. *Planta* 183: 321-326.
- KOOIMAN, P. 1960. On the occurrence of amyloids in plant seeds. *Acta Bot. Neerl.* 9: 208-219.
- LAEMMLI, U., K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-5.
- LI, Z-C., DURACHKO, D.M., COSGROVE, D.J. 1993. An oat coleoptile wall protein that induces extension *in vitro* and that is antigenically related to a similar protein from cucumber hypocotyls. *Planta* 191: 349-356.

- LIMA, D.U de & BUCKERIDGE, M.S. 2000 ( no prelo). Interaction between cellulose and storage xyloglucans. The influence of degree of galactosylation. Carbohydrate Polymers ( no prelo).
- LIS, H. & SHARON, N. 1998. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. Chem. Rev. 98: 637-674.
- LORIS, R., HAMELRYCK, T., BOUCKAERT, J. & WYNS, L.1998. Legume lectin structure. Biochimica et Biophysica Acta 1383: 9-36.
- McCANN, M.C. & ROBERTS, K. 1991. Architectura of the primary cell wall. The cytoskelet basis of plant growth and form . Academic Press, London.
- MOREIRA,R.D., AINOUZ, I.L., DE OLIVEIRA, J.T.A & CAVADA, B.S. 1991. Plant-Lectins, chemical and biological aspects. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 86(2): 211-218. Suppl.2.
- NISHITANI, K. 1997. The role of endoxyloglucan transferase in the organization of plant cell walls. Int. Rev. Cytol. 173: 157-206.
- NISHITANI,k. & TOMINAGA. 1991. *In vitro* molecular weight increase in xyloglucans by na apoplastic enzyme preparation from epicotyls of *Vigna angularis*. Physiol. Plant. 82: 490-497.
- REID, J.S.G. 1985. Structure and function in legume seeds polysacharides, in: Brett and Hillman (Eds.) Biochemistry of plant cell walls. Cambridge University Press. 259-268.
- REID, J.S.G. 1997. Carbohydrate metabolism structural – Structural Carbohydrates in: Plant Biochemistry. P.M.DEY & J.B. HARBONE (Eds).
- REIS, D., VIAN, B., DARZENS, D. & ROLAND, J.C. 1987. Sequential patterns of intramural digestion of galactoxyloglucan in tamarind seedlings. Planta 170:60-73.
- ROBINSON, D.G. 1996. Susy ergo Glusy: New developments in the field of cellulose biosynthesis. Bot. Acta, 109: 261 – 263.
- ROE, J.H. & RICE, E.W. 1948. A photometric method for the determination of free pentose in animal tissues. J. Biology. 173: 507-512.
- ROSE, J.K.C. & BENNETT, A. B. 1999. Cooperative disassembly of the cellulose-xyloglucan network of plant cell walls: paralells between cell expansion and fruit ripening. Trends in plant Science 4 (5): 176-183.

- ROSE, J.K.C., LEE, H.H., BENNETT, A.B. 1997. Expression of a divergent expansin gene is fruit and ripening-regulated. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA.* 94:5955 –5960.
- SHPIGEL, E., ROIZ, L., GOREN, R., SHOSEYOV, O. 1998. Bacterial cellulose-binding domain modulates *in vitro* elongation of different plant cells. *Plant Physiol.* 117:1185-1194.
- SULOVÁ, Z., LEDNICKA, M., FARKAS, V. A. 1995. Colometric assay for xyloglucan endotransglycosylase from germinating seeds. *Anal. Biochemistry* 229 (1):80-85.
- TINÉ, M.A.S., CORTELAZZO, A.L. & BUCKERIDGE, M.S. 1999 Xyloglucan mobilisation in cotyledons of developing plantlets of *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae-Caesalpinioideae). *Plant. Science* 154: 117-126
- TOMMÉ, P. 1998. Characterization and affinity applications of cellulose-binding domains. *Chromatography B* 715:283-296.
- TORMO, J., LAMED, R., CHIRINO, A.J., MORAG, E., BAYER, E.A., SHOHAM, Y. & STEITZ, T.A. 1996. Crystal structure of a bacterial family-III cellulose-binding domain: a general mechanism for attachment to cellulose. *The EMBO Journal*, 15 (21) 5739-5751.
- VARNER, J.E.& LIN, L.S. 1989. Plant cell wall architecture. *The Cell* 56:231-239.
- WALDRON, K. & BRETT, C. 1990. *Physiology and Biochemistry of plant cell walls.* Unwin Hyman. London.