

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO



Centro Nacional de Ressonância Magnética

Nuclear Jiri Jonas

Instituto de Bioquímica Médica

Estudos Estruturais dos Enovelamentos Protéicos de
Defensinas e Globinas Através de Ressonância
Magnética Nuclear

Guilherme Razzera

Orientação: Ana Paula Valente
Co-orientação: Fabio C.L. Almeida

Rio de Janeiro

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Estudos Estruturais dos Enovelamentos Protéicos de
Defensinas e Globinas Através de Ressonância
Magnética Nuclear

Guilherme Razzera

Orientação: Ana Paula Valente
Co-orientação: Fabio C.L. Almeida

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação do Instituto de Bioquímica Médica, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências (Química Biológica).

Rio de Janeiro

2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Razzera, Guilherme

Estudos Estruturais dos Enovelamentos Protéicos de Defensinas e Globinas por Ressonância Magnética Nuclear / Guilherme Razzera. Rio de Janeiro: UFRJ/IBqM, 2009
162 f.: il

Orientador: Ana Paula Valente

Co-orientador: Fabio C.L. Almeida

1. Defensinas 2. Alergenos 3. Hemoglobinas 4. Ressonância Magnética Nuclear 5. Estrutura de proteínas 6. Dinâmica de proteínas. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Bioquímica Médica, Programa de Pós-Graduação em Química Biológica.

Este trabalho foi realizado no Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear Jiri Jonas do Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a orientação da professora Ana Paula Valente e co-orientação do professor Fábio Ceneviva Lacerda de Almeida, com os auxílios concedidos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), International Center for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB) e Instituto Milênio de Biotecnologia e Biologia Estrutural (IMBEBB).

Guilherme Razzera

Estudos Estruturais dos Enovelamentos Protéicos de Defensinas e Globinas Através de Ressonância Magnética Nuclear

Tese submetida ao corpo docente do Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Química Biológica.

Orientadora:

- **Prof^a Ana Paula Valente Lacerda de Almeida**, Professora Adjunta do Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ. Doutora em Ciências Biológicas (1994) pela Universidade de São Paulo.

Co-orientador:

- **Prof. Fábio Ceneviva Lacerda de Almeida**, Professora Adjunta do Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ. Doutora em Ciências Biológicas (1994) pela Universidade de São Paulo.

Revisor:

- **Marcus Oliveira**, Professor Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ. Doutor em Química Biológica (2001) pela Pós-Graduação em Química Biológica, ICB, UFRJ.

Membros Titulares da banca

- **José Daniel Figueroa Villar**, Professor do Instituto Militar de Engenharia, IME. Doutor pela Universidade de Alberta, Canadá (1983).
- **Shaker Chuck Farah**, Professor Titular da Universidade de São Paulo, USP. Doutor em Ciências Biológicas (1994) pela Universidade de São Paulo.
- **Jerson Lima da Silva**, Professor Titular do Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ. Doutor em Ciências Biológicas (1987) pela Pós-Graduação em Biofísica, UFRJ.

Membros Suplentes da banca

- **Luis Maurício Trambaioli da Rocha e Lima** Professor Adjunto da Faculdade de Farmácia/ UFRJ. Doutor em Química Biológica (2001) pela Pós-Graduação em Química Biológica, ICB, UFRJ.
- **Marcus Oliveira**, Professor Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ. Doutor em Química Biológica (2001) pela Pós-Graduação em Química Biológica, ICB, UFRJ (Suplente Interno).

*“Ao meu avô Orlando Razzera, (in memoriam),
meu professor de Física e grande incentivador
da carreira científica”*

Agradecimentos

- Agradeço inicialmente aos meus orientadores Ana Paula Valente e Fabio Almeida, que me receberam muito bem no seu laboratório e sempre confiaram em mim. A orientação que tive durante o doutorado foi acima de tudo um grande aprendizado. Tive o apoio deles em todos os momentos durante estes anos. Levo comigo as melhores lembranças e os exemplos de postura profissional e ética que vocês me passaram.

- Aos membros da Banca de doutorado, Jerson Lima da Silva, Chuck Farah e Daniel Figueroa, que aceitaram participar mesmo “em condições adversas”. Muito obrigado.

- Ao prof. Daniel Figueroa que foi sempre um incentivador da RMN no Brasil, um exemplo profissional e sempre me ajudou quando precisei. Conversar com você nesses anos foi estimulante e me fez acreditar mais na profissão de professor e pesquisador.

- Ao meu Revisor Marcus Oliveira por suas contribuições, as quais foram muito significativas para o desenvolvimento deste trabalho.

- Ao Dr. Flavio Lara que acreditou e apoiou o meu trabalho enquanto era pos-doc do Instituto de Bioquímica Médica. A pessoa certa no momento certo.

- Ao prof. Marcius da Silva Almeida que me ensinou muito sobre RMN e por sua ajuda não só nos experimentos do Doutorado, mas também em momentos difíceis de decisão profissional. Agradeço também pela sua amizade em todos estes momentos.

- Aos amigos que fiz no laboratório, Rodolpho Machado, Carolina Cruzeiro, Carolina Sarzedas, Viviane de Paula, Francisco Gomes Neto, Anderson Pinheiro, Fabiana Albernaz, Cristiane Ano Bom, Gisele Amorim, Talita Losan e Carlos Rezende. Sem essas pessoas esse período não teria sido tão bom como foi. Espero sempre manter contato com todos vocês.

- A Renata Angeli, que não agüentaria ver o seu nome junto aos meus outros amigos do laboratório. Você merece um destaque a sua altura. Valeu pelo apoio durante esses anos.

- A minha orientanda Débora Baruh, que me deu muita ‘dor de cabeça’ e ao mesmo tempo muitas alegrias.

- A Catarina Myiamoto, que sempre me ajudou no laboratório e muitas vezes contribuiu para o meu trabalho.

- Ao Fabrício, técnico do laboratório, que sempre deu suporte aos experimentos desta tese .

- Aos membros dos laboratórios LAPA e LTPV que sempre estiveram disponíveis para tudo que precisei.

- A Nathalia Varejão, sobretudo por sua amizade, que será longa com certeza, e ajuda sempre que precisei.

- A minha família, em especial aos meus pais, que me apoiaram sempre, e aos meus avós que foram fundamentais durante a minha formação.

- Por fim, a Marina, pessoa fundamental para que essa tese existisse. Sem a sua ajuda, apoio, amor e companhia eu jamais teria completado esta etapa.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Células do sistema imune adaptativo envolvidas na resposta a um processo alérgico.	4
Figura 2. Modelo dos dois tipos de ocorrência natural de glicosilações encontradas na Art v 1	8
Figura 3. Prevalência dos aminoácidos em estruturas desordenadas de acordo com o DisProt	11
Figura 4. Hélice de prolina do tipo II (PPII)	12
Figura 5. Comparação entre os enovelamentos 2/2 e 3/3 de hemoglobinas.	17
Figura 6. Hélices E e F da região distal de hemoglobinas Penta e Hexacoordenadas	18
Figura 7. Efeito da aplicação de um pulso de radiofrequência sobre a população de <i>spins</i>	21
Figura 8. Assinalamento da cadeia principal de uma proteína	23
Figura 9. Assinalamento automático dos NOEs feito pelo algoritmo CANDID	25
Figura 10. Cálculos feitos com CYANA 2.1 para domínio defensina da proteína Art v 1	27
Figura 11. Estrutura de seqüência primária da assinatura <i>y-core</i>	128
Figura 12. Estrutura da Art v 1 sobreposta a defensina antifúngica Rs-Amp1	129
Figura 13. Superfície de contato entre o domínio de prolinas da Art v 1 e o domínio defensina	130
Figura 14. Sítio de ligação a heme para as estruturas Hs-trHb1 e 2 de <i>H.seropedicae</i>	132
Figura 15. Crescimento celular de células <i>E.coli</i> expressando a hemoglobina truncada Hs-trHb1	134
Figura 16. Diagrama de energia definindo a amplitude e escala de tempo dos movimentos de uma proteína.	135

ABREVIATURAS

1D	Unidimensional
2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
CAA	Célula apresentadora de antígeno
CANDID	Combined automated NOE assignment and structure determination
CPMG	Carr-Purcell-Meiboom-Gil
CSH	Cysteine-stabilized α -helix
CSI	Chemical shift index
Dis Prot	Data base of protein disorder
DNA	ácido desoxirribonucleico
EST	Expressed sequence tags
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
FTIR	Fourier transform infrared
GE	Genômica estrutural
GENOPAR	Genoma do Paraná
IgE	Imunoglobulina do tipo E
IgG	Imunoglobulina do tipo G
INP	ice nucleation protein
IPTG	Isopropyl beta-d-1-tilgalactopiranosideo
IUP	intrinsic unstructured proteins
LPS	Lipopolissacarídeos
mAB	Anticorpo monoclonal
mPEG	metoxi-polietilenoglicol
NIH	National Institutes for Health
NOE	nuclear overhauses enhancement
NOESY	núcleo dv spectroscopy
ORF	Open reading frame
PAM	peptídeos anti-microbianos
PCR	Polimerase chain reaction
PDB	Protein data bank
PPII	poli-prolina tipo II
PRE	Ressonância paramagnética de electrons
PSI	protein structure initiative
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMSD	Root-mean-square-deviation
SAX	small-angle x-ray scattering
SDAP	Structural database of allergenic
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel SDS de poliacrilamida
SIT	specific immunotherapy treatment
SUCEST	Sugarcane EST

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	1
1. Contexto Biológico	2
1.1 Alergenos: correlações entre estrutura e mecanismo de ação	3
1.1.1 O alérgeno Art v 1	7
1.1.2 Estruturas Parcialmente Enoveladas ou Intrinsecamente Desordenadas	9
1.2 Genômica Estrutural	12
1.2.1 Defensinas de plantas	14
1.2.1.1 Defensinas de cana-de-açúcar	16
1.2.2 Hemoglobinas bacterianas	16
2. Contexto Tecnológico	20
2.1 Princípios básicos da Ressonância Magnética Nuclear	20
2.1.1 Assinalamento das frequências de ressonâncias através de experimentos 3D: caso dos sistemas poliprolina	22
2.2 Determinação Semi-Automática de Estruturas por RMN	23
2.3 Avaliação estrutural de sistemas desordenados por RMN	27
2.4 Dinâmica Molecular por RMN	28
2.5 Ressonância Paramagnética Nuclear	33
OBJETIVOS	35
MATERIAIS E MÉTODOS	37
1. Clonagem dos genes alvo	38
2. Expressão e purificação das proteínas subclonadas	39
2.1 Re-enovelamento das defensinas SD1, SD3 e SD6 de cana-de-açúcar	40
3. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	41
3.1 Assinalamento das frequências de ressonância do alérgeno Art v 1	41
3.2 Determinação da estrutura da Art v 1	42
3.3 Dinâmica da cadeia principal da Art v 1	42
4. Análise da Art v 1 nativa por RMN	44
5. Purificação de IgE policlonal e interação com Art v 1	44
6. Dicroísmo Circular	45

7. Espectrometria de massas	46
8. Espectroscopia de UV-visível	46
8.1 Decomposição de peróxido de hidrogênio	46
9. Determinação do peso molecular em solução por filtração em gel	47
10. Modelagem Molecular	47
11. Teste de atividade antimicrobiana	47
RESULTADOS	49
Parte I: Estudos estruturais do alérgeno Art v 1	50
1. Assinalamento das frequências de ressonância do alérgeno Art v 1 (Artigo submetido a revista <i>Biological NMR Assignments</i>)	53
2. Estrutura, dinâmica e interação com IgE do alérgeno Art v 1 (Manuscrito em preparação)	61
Parte II: Caracterização de defensinas de cana-de-açúcar	95
Parte III: Estudos estruturais da hemoglobina Hs-trHb1 de <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	112
DISCUSSÃO GERAL E PERSPECTIVAS	126
1. Enovelamentos protéicos conservados com baixa similaridade de seqüência	127
1.1.O enovelamento de Defensinas de plantas	127
1.2.O enovelamento de Globinas	131
2. A função de hemoglobinas bacterianas	132
3. Dinâmica molecular associada à função biológica	134
4. Estruturas desordenadas e os métodos semi-automatizados de cálculo em RMN	136
CONSIDERAÇÕES FINAIS	138
RERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	139

RESUMO

Neste trabalho estudamos três modelos que representam relações biológicas que envolvem: (1) Imunidade adaptativa, através de estudos estruturais e de interação antígeno-anticorpo de um alérgeno chamado de Art v 1; (2) Imunidade inata, com a caracterização de proteínas da família das Defensinas (peptídeos antimicrobianos) de cana-de-açúcar; e (3) Simbiose, através do estudo de uma hemoglobina da bactéria fixadora de nitrogênio *Herbaspirillum seropedicae* que infecta plantas. Nos artigos 1 e 2 mostramos os estudos da estrutura e dinâmica do alérgeno Art v 1 em solução. O Art v 1 é uma proteína com dois domínios, um homólogo a defensinas e outro rico em prolinas, sendo o principal causador de reações alérgicas devido a pólen de *Artemisia vulgaris*. A estrutura deste alérgeno apresentou um enovelamento típico de defensinas de planta. Mostramos que parte do domínio rico em prolinas apresenta uma estrutura definida, com uma dinâmica intermediária entre as porções mais flexíveis (C-terminal) e o domínio defensina. Além disso, mapeamos o epitopo de ligação a IgE que mostrou-se descontínuo formado principalmente por porções N-terminal e próximas a região de ligação entre os domínios. Através de experimentos com a proteína nativa (glicosilada) mostramos que as diferenças estruturais entre a nativa e a recombinante residem basicamente em prolinas, mas também afetam porções do domínio defensina. Acreditamos que os dados apresentados para este alérgeno podem ser usados para o desenvolvimento de vacinas hipoalérgicas. No artigo 3 analisamos ORFs, buscando novas defensinas no genoma de cana-de-açúcar. As defensinas putativas foram subclonadas e caracterizadas. Algumas destas defensinas (SD1, SD3 e SD5) mostraram-se ativas contra fungos. A caracterização estrutural baseada em RMN e Dicroísmo Circular mostrou estruturas compatíveis com o enovelamento de Defensinas. Através de análise filogenética, sugerimos que estas defensinas podem ser agrupadas junto com outras defensinas da família Poaceae e da tribo Andropogoneae. Estas relações evolutivas podem ser usadas como um procedimento de predição e anotação de novas defensinas em genomas agrupando-as em classes evolutivas para ajudar na investigação de suas funções biológicas. O artigo 4 caracteriza uma hemoglobina que pode estar relacionada a interação simbiótica da bactéria *Herbaspirillum seropedicae* e plantas comumente cultivadas no Brasil. A caracterização desta nova hemoglobina indica que esta hemoglobina apresenta uma transição da forma aquomet, no estado férrico, para uma forma hexacoordenada low-spin no estado ferroso. De acordo com nossos dados, as posições Ser-E7, Lys-E10, Tyr-B10 e His-CD1 no bolção distal são candidatas à coordenação do heme. Através da cinética de degradação de peróxido sugerimos que o acesso do heme ao bolção de ligação é bastante facilitado e pode estar relacionado a presença de um loop flexível na trHb1. Acreditamos que esta hemoglobina pode atuar como facilitadora da transferência e varredura de O₂, desempenhando um processo importante no mecanismo de fixação de nitrogênio. Acreditamos que os dados gerados nesta tese são de grande importância biomédica e biotecnológica e, também, podem contribuir para o desenvolvimento de novas linhas de trabalho na área de Ressonância Magnética Nuclear no país.

ABSTRACT

Three models were explored in this work, involving: (1) Adaptive Immunity, through structural studies of Art v 1 allergen; (2) Innate Immunity, with the characterization of defensin proteins (antimicrobial peptides) from Sugarcane; and (3) Symbiosis, studying an hemoglobin from nitrogen-fixing bacteria *Herbaspirillum seropedicae*, which infects cultivated plants.

In the first part of this work we showed the structure and dynamics of the allergen Art v 1 by NMR. The Art v 1 is a two-domain protein, one of them homologous to defensin and the second one, a proline-rich domain. This is the major allergen found in pollen from *Artemisia vulgaris*. The 3D structure is formed by an α/β plant defensin fold. We showed that part of proline-rich domain presents a constrained structure, with an intermediate dynamics between the most flexible C-terminal and the defensin domain. Furthermore, we mapped the IgE epitope that is constituted mainly by the N-terminal and by residues around the intermediate region. We believe these data will be useful in the development of hypoallergen vaccines.

In the second part of the work, we analyzed several ORFs from Sugarcane genome. Six putative defensins (Sd1-6) were selected, and activity assays showed that recombinant Sd1, Sd3 and Sd5 are active against fungi. Structural characterization, based on circular dichroism (CD) and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy showed that the structures of these Sds were compatible with α/β defensin fold. Phylogenetic analysis revealed that sugarcane defensins could clearly be grouped within defensins from Poaceae family and Andropogoneae tribe. Our work demonstrates that defensins show strong conservation in the Poaceae family and may indicate that the same conservation occurs in other families. We suggest that evolutionary relationships within plant families can be used as a procedure to predict and annotate new defensins in genomes and group them in evolutionary classes to help in the investigation of their biological function.

The third part shows the characterization of a truncated hemoglobin from *Herbaspirillum seropedicae* genome that may be involved in a symbiotic relationship between the bacteria and cultivated plants in Brazil. All data suggest that Hs-trHb1 undergoes a transition from an aquomet form in the ferric state to a hexacoordinate low-spin form in the ferrous state. The close positions of Ser-E7, Lys-E10, Tyr-B10, and His-CD1 in the distal pocket place them as candidates for heme coordination and ligand regulation. Peroxide degradation kinetics suggests an easy access to the heme pocket, as the protein offered no protection against peroxide degradation when compared with free heme. The high solvent exposure of the heme may be due to the presence of a flexible loop in the access pocket, as suggested by a structural model obtained by using homologous globins as templates. The truncated hemoglobin described here has unique features among truncated hemoglobins and may function in the facilitation of O₂ transfer and scavenging, playing an important role in the nitrogen-fixation mechanism.

INTRODUÇÃO

1. CONTEXTO BIOLÓGICO

Os mecanismos bioquímicos de interação entre microorganismos e hospedeiros, sejam relacionados à percepção do ambiente, à interação de superfície ou à comunicação, são frequentemente encontrados em patógenos humanos, microorganismos comensais e mutualistas (Dethlefsen et al., 2007; Hancock, 2001; Zilber-Rosenberg I et al., 2008). Esta complexa comunicação envolve diversas moléculas, cujo estudo é de grande importância para a compreensão destes fenômenos biológicos e também para a elucidação de mecanismos que futuramente possam ser utilizados para o desenvolvimento de terapias contra diversas patologias (Aerts et al., 2008; Hancock, 2001).

A biologia estrutural, que têm de forma bem sucedida ajudado a explicar muitos processos celulares, sugere que a estrutura tridimensional de macromoléculas está diretamente relacionada com sua função e, portanto, o conhecimento de sua estrutura 3D, possui um papel importante na compreensão de sua função biológica (Zhang, Y et al., 2007). A técnica de Ressonância Magnética Nuclear permite estudos estruturais em solução capazes de elucidar não só a estrutura tridimensional de macromoléculas, como também a dinâmica e interações entre elas. Sendo assim, constitui uma excelente ferramenta para estudos bioquímicos.

Neste trabalho trataremos de três sistemas biológicos que envolvem relações de defesa imune adaptativa, defesa imune inata e relações simbióticas. O primeiro deles trata de uma molécula encontrada no pólen de uma planta do gênero *Artemisia* capaz de provocar um processo complexo de defesa imunológica, pois é um alérgeno. Coincidentemente este alérgeno apresenta características estruturais típicas de moléculas de defesa chamadas defensinas, responsáveis por uma imunidade inata. O tema defensinas será abordado como o segundo sistema biológico onde caracterizaremos diversas moléculas de cana-de-açúcar. Por fim, abordaremos o tema simbiose através da caracterização de uma proteína pertencente a uma nova família de hemoglobinas encontrada em uma bactéria chamada *Herbaspirillum seropedicae* que infecta plantas em um processo cooperativo de fixação de nitrogênio.

1.1 Alérgenos: correlações entre estrutura e mecanismo de ação

As alergias são reações de hipersensibilidade mediadas pelo sistema imunológico que podem afetar diversos órgãos, comumente a pele, vias aéreas e o intestino (Traidl –Hoffmann et al. 2008). O termo “alergia” foi usado pela primeira vez por Clemens von Pirquet em 1906 para chamar a atenção a uma propensão não usual que alguns indivíduos tinham em desenvolver sinais e sintomas de reações de hipersensibilidade a algumas substâncias. Frequentemente as alergias são também chamadas de atópicas (do grego *atopos* = sem um lugar) (Galli et al., 2008). A grande maioria das reações alérgicas é causada por proteínas (Chapman et al., 2007). Uma proteína pode ser considerada um alérgeno quando apresentar duas propriedades: primeiro, a de induzir uma resposta produzindo IgE (imunoglobulina do tipo E), envolvendo a fase de sensibilização de células T, células B e células dendríticas; e, segundo, a de desenvolver uma resposta clínica em exposições subsequentes (Akdis, 2006).

A nomenclatura adotada pela WHO/IUIS (World Health Organization / Union of Immunological Societies - www.allergen.org) é usada desde 1986 e consiste no uso de 3 letras para o gênero e uma letra para a espécie do organismo em questão, seguido por um número que indica a ordem cronológica de purificação e identificação. Portanto, a sigla para o alérgeno Bet v 1, por exemplo, significa que pertence ao gênero *Betula verrucosa* e que foi o primeiro identificado nesta espécie (Chapman et al. 2007).

Um alérgeno pode induzir uma resposta de hipersensibilidade imediata e uma resposta tardia. A resposta imediata (hipersensibilidade do tipo I) é dependente de IgE e de mastócitos e resulta na ativação de basófilos, liberação de histaminas e na síntese de mediadores da via do ácido araquidônico (leucotrienos e prostaglandinas). Isto leva a sintomas agudos como urticária, rinite, conjuntivites, entre outros. A hipersensibilidade do tipo IV é um fenômeno tardio e pode ocorrer de 6 a 24 horas depois da exposição ao alérgeno. O processo de alergenidade inicialmente se dá através do processamento do alérgeno pelas células apresentadoras de antígenos (CAA). Estas células (macrófagos, células dendríticas, células de Langerhans) apresentam o antígeno aos linfócitos T. Isso pode levar a produção de células T_H2 CD4+ (*T helper*) que expressam interleucinas (IL4 e IL5) e afetam diretamente a produção de IgE por linfócitos B. Além disso, em caso de exposição continuada, outras células inflamatórias (*mastócitos*, basófilos e

eosinófilos) podem causar uma resposta tardia, gerando sintomas crônicos (Jayasekera et al., 2006). Na figura 1 os processos de cooperação entre as principais células do sistema imune envolvidas em uma resposta alérgica são mostrados em uma representação esquemática.

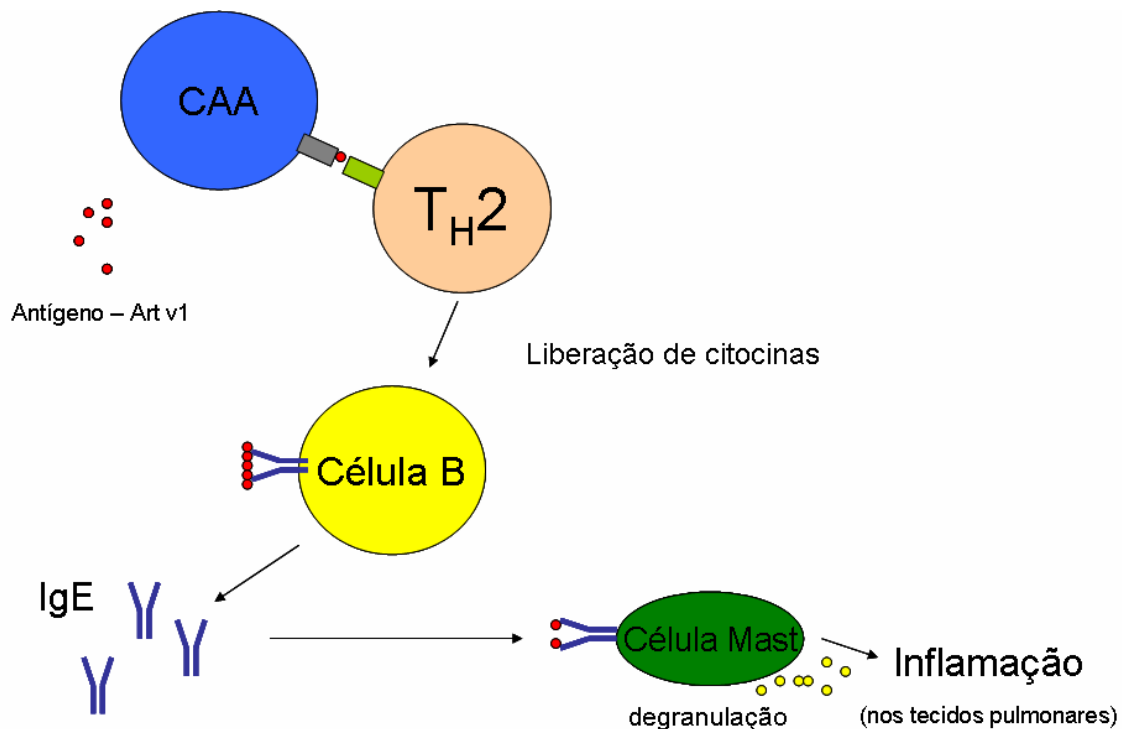


Figura 1. Principais células do sistema imune adaptativo envolvidas na resposta a um processo alérgico. CAA (célula apresentadora de antígenos), T_H^2 (célula T helper 2).

A determinação da estrutura 3D de mais de 40 alérgenos encontra-se no *Protein Data Bank*. Através da estrutura foi possível identificar características funcionais de alérgenos que ajudaram a explicar a persistência em ambientes *indoor* e *outdoor*. O que se observa é que os alérgenos compreendem diversas famílias de proteínas apresentando as mais variadas funções biológicas. Podemos classificá-los como: os alérgenos *indoor* (enzimas, normalmente proteases, proteínas de ligação a ligante, albuminas, tropomiosinas e proteínas de ligação a cálcio); os alérgenos provenientes de pólen (pectase liase, β -expansinas, inibidores de tripsina, proteínas ligadas a patogênese); e os alérgenos provenientes da alimentação (proteínas de transferência de lipídeos, tropomiosinas, profilinas e proteínas de reserva de sementes (Chapman et al. 2007).

Sabendo que os alérgenos compreendem diferentes famílias protéicas uma das grandes questões da imunologia é: o que torna uma proteína um alérgeno? As

características que levam uma proteína a ser alergênica não são conhecidas, mas sabe-se que os alérgenos possuem propriedades similares que eventualmente podem explicar a alergenicidade. As proteínas alergênicas, muitas vezes glicoproteínas, são pequenas (<70 KDa), negativamente carregadas, com baixa hidrofobicidade e alta estabilidade (Chapman et al. 2007). Frequentemente suas estruturas apresentam ligações dissulfeto, aumentando a resistência às intempéries ambientais e, conseqüentemente, a biodisponibilidade do alérgeno (Sen, et al. 2002, deGroot et al., 2007). Sabe-se que muitos alérgenos provenientes da alimentação resistem à digestão protéica durante o processamento do alimento como, por exemplo, o Ara h 2 de amendoim. Sua resistência está associada à presença de 4 ligações dissulfeto (Sen et al, 2002). Netes casos epitopos lineares são expostos e desencadeiam o processo alérgico (Akdis, 2006). Outras características comuns aos alérgenos são a presença de cavidades e tuneis de ligação, capacidade de interação com membranas e outros lipídeos (Akdis 2006). No entanto, diferentes alérgenos com sítios capazes de abrigar ligantes como a Bla g 2, Fel d 1 e Rat n 1, apresentam características estruturais bastantes distintas. O Fel d 1 é formado por 8 α -hélices e as lipocalinas como Bos d 2 é formado por oito fitas β e uma hélice C-terminal (Rouvinen et al. 1999; Kaiser et al. 2003). As características que agrupam estas estruturas permitindo que o sistema imune as identifique e tornando-as proteínas alergênicas, não estão claros e precisam ser melhor estudados.

Analisando a estrutura de alguns alérgenos, percebemos características que os distinguem de outras proteínas pertencentes à mesma família. Um exemplo é o alérgeno Fel d 1 (1PUO), responsável por 95% das respostas IgE de pacientes com alergia a gatos. Estudos cristalográficos mostraram que o Fel d 1 é homólogo a uteroglobina (2UTG), uma molécula com propriedades anti-inflamatórias induzida por esteróides. O Fel d 1 possui um sítio de ligação com uma cavidade menor capaz da abrigar um ligante diferente da uteroglobina (Kaiser et al. 2003). Isto sugere que pequenas modificações estruturais podem ser significativas para o entendimento da alergenicidade.

Devido a grande diversidade de processos alérgicos, tenta-se buscar mecanismos moleculares comuns aos alérgenos. Estes mecanismos até hoje não foram encontrados, mas já existem algumas explicações pontuais. Uma delas refere-se à capacidade que muitos alérgenos apresentam de mimetizar proteínas do metabolismo humano. Um destes casos foi reportado para o alérgeno encontrado em aglomerados fecais de ácaros

Der p 2. Este alérgeno é homólogo ao domínio MD-2 (relacionado ao reconhecimento de lipídeos) e à parte que liga lipopolissacarídeos (LPS) de receptores *Toll-like* 4 (TLR 4). O alérgeno Der p 2 facilita a sinalização através da interação com TLR4 mimetizando o papel de proteínas MD-2. Sugere-se que a exposição ao alérgeno deslocaria a curva de resposta a LPS para níveis capazes de induzir células T_H2 (Trompetee et al. 2008).

Com o objetivo de buscar tratamentos para as alergias, alguns mecanismos de imunoterapia têm sido propostos, atacando diferentes pontos da via de regulação dos processos alérgicos. Sabe-se que o fornecimento direto de altas doses do alérgeno como terapia provoca aumento de IgG1 e IgG4 por células T, inibindo o processo de apresentação do antígeno a CAA (célula apresentadora de antígeno). Sugere-se que este mecanismo leve à formação de um complexo IgG-alérgeno-IgE, porém o mecanismo molecular ainda é pouco conhecido (Peng et al., 1992; Jayasekera et al., 2006). Tem sido proposto, também, que células T_H2 seriam afetadas levando a menor produção de citocinas (Till et al., 2004).

Um alvo importante para o desenvolvimento de tratamentos imunoterápicos é o estudo da ligação entre antígeno e IgE. Pouco se sabe, no entanto, sobre as interações específicas entre alérgenos e anticorpos, pois estes estudos são bastante recentes. A primeira estrutura 3D de um alérgeno foi reportada em 1996 para o alérgeno Bet v 1 encontrado em pólen de *Betula verrucosa* (Gajhede et al., 1996). Poucos trabalhos mapearam os epitopos de células B em nível atômico, sendo que todos utilizaram anticorpos monoclonais (mAb) para este fim. O primeiro trabalho que mostrou esta interação foi publicado em 2000 para o alérgeno Bet v 1. Através de cristalografia de raios X do complexo alérgeno - anticorpo monoclonal IgG1 Fab, mostrou-se que o epitopo principal envolve os resíduos E42, T52 e uma região secundária R70, D72, H76, I86 e K97 (Mirza et al., 2000). Em 2007, o epitopo de célula B do alérgeno de veneno de abelha foi identificado envolvendo os resíduos R138 e H141 a R148. A conformação desta estrutura parece ser fundamental para o reconhecimento de IgE, uma vez que o peptídeo R138-Q152 não é reconhecido por mAb e nem por IgEs humanos (Padavattan, S et al., 2007). Recentemente a interação entre o alérgeno Blo t 5 de ácaro e IgE foi mapeada e um epitopo descontínuo foi identificado por RMN compreendendo os resíduos L43-K-47 e K54-R57 (Naik M et al., 2008).

Através da identificação de eipitopos um outro tipo de terapia tem sido sugerido, as vacinas hipoalergênicas, obtidas através de variantes de alergenos. Estas variantes podem ser construídas através de: mutações pontuais; fragmentação protéica; proteínas químicamente modificadas (adicionando moléculas conjugadas como metoxi-polietilenoglicol – mPEG); ou ainda, formas imaturas das proteínas (Vrtala et al. 2004; Niederberger e Valenta, 2006). A busca por moléculas hipoalergênicas, ou seja, moléculas que mantêm a reatividade contra células T com um reduzido efeito da alergenicidade, é bastante grande, principalmente devido a problemas com reações anafiláticas associadas às altas doses dos alergenos nas imunoterapias específicas (SIT – *specific immunotherapy treatment*) (Larché M et al., 2006; Niederberger e Valenta, 2006). Variantes hipoalergênicas tem sido propostas para a prevenção de alguns tipos de alergia, como, por exemplo, a forma imatura ProDer p 1 candidata ao tratamento de alergia a ácaros. A forma inativa da cisteino-protease (Pro-enzima) apresentou características estruturais bastante semelhantes à forma madura (Halleux et al., 2006). O pro-peptídeo, no entanto, parece interferir na ligação a IgE, gerando uma forma hipoalergênica, uma vez que mantêm o reconhecimento de células T (Walgraffe et al., 2009). Outro exemplo são os fragmentos ou oligômeros (dímeros e trímeros) de Bet v 1, que se mostraram capazes de reduzir o efeito alergênico do pólen de *Betula verrucosa* em até 100 vezes (Vrtala et al., 1997; Vrtala et al., 2001; Pauli et al., 2000). Dentro deste contexto, a busca por novas variantes hipoalergênicas pode ser uma maneira de chegar a tratamentos profiláticos contra diversas alergias.

1.1.1 O alergeno Art v 1

A glicoproteína Art v 1 é encontrada em grãos de pólen da *Artemisia vulgaris*, planta da família das Asteraceas. Esta glicoproteína é o principal alergeno de *A. vulgaris*. Baseado em sua seqüência primária possui um domínio bastante homólogo a defensinas de plantas. A polinose causada por *Artemisia vulgaris* é uma das principais causas de reações alérgicas na Europa. Mais de 95% dos pacientes alérgicos a *A. vulgaris* são sensibilizados pela Art v 1. Além do domínio defensina, o alergeno Art v 1 também possui um outro domínio rico em prolinas, com porções da proteína em sequencias poli-prolina, totalizando uma molécula de 108 aminoácidos (Himily et al, 2003). Modelos estruturais foram previamente reportados para o Art v 1 sugerindo que este domínio rico

em prolínas seria composto por uma longa cauda estendida (Himily et al, 2003). Mais recentemente, através de Dicroísmo circular, estruturas semelhantes a hélices de prolina tipo II do colágeno foram sugeridas para a proteína Art v 1 (Dedic et al., 2009).

As glicosilações encontradas no domínio rico em prolínas da Art v 1 possuem diferentes arranjos de galactose e arabinose. Ligado a hidroxiprolínas foram encontradas composições de arabinogalactanas (β 1,6-galactanas). Estas galactanas podem ser substituídas por resíduos de α -arabinofuranose, formando ramificações com 5-, 2,5-, 3,5- e 2,3,5- arabinoses substituídas. Este novo desenho de polissacarídeo, diferente do conhecido tipo II de arabinogalactana, foi chamado de arabinogalactana do tipo III. Outro tipo de glicosilação, formado por β -arabinofuranoses simples ligadas a hidroxiprolínas, também foi encontrado para Art v 1 (Leonard et al., 2005). A figura 2 mostra em detalhe estes arranjos no modelo estrutural da Art v 1. Sabe-se que parte da antigenicidade da Art v 1 também está relacionada a região glicosilada, pois alguns pacientes alérgicos a Art v 1 reagem menos com a forma nativa do alérgeno do que a sua forma recombinante (Himily et al., 2003). Além disso, Dedic et al. (2009), sugerem que o domínio defensina é o principal responsável pela imunoreatividade da Art v 1.

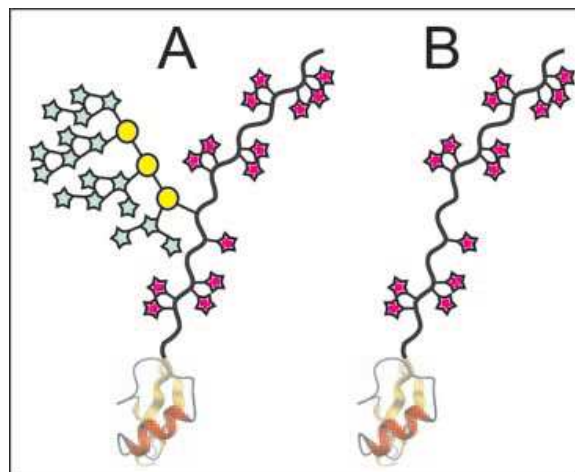


Figura 2. Modelo esquemático dos dois tipos de ocorrência natural de glicosilações encontradas na Art v 1. Em A, a forma de 15 KDa e em B a forma de 13 KDa. O domínio globular defensina está ligado a uma representação do domínio de prolínas (em cinza). Em rosa, os resíduos de hidroxiprolínas ligados a resíduos de β -arabinofuranosil. Em azul, α -arabinoses e em amarelo os resíduos de β -galactosidase. Figura adaptada de Leonard R et al. (2005).

Devido a Art v 1 ser o principal alergeno de *A.vulgaris*, e ainda existirem poucos trabalhos mapeando epitopos em nível atômico, acreditamos que a resolução da estrutura da Art v 1 e o mapeamento da interação do alergeno com IgE (Artigos 1 e 2) podem contribuir para responder questões fundamentais da imunologia, como os locais de reconhecimento entre antígeno e anticorpo.

1.1.2 Estruturas Parcialmente Enoveladas ou Intrinsecamente Desordenadas

Himily et al. (2003), sugerem que o domínio rico em prolinas da Art v 1 é formado por uma estrutura estendida não enovelada, portanto de maior flexibilidade. Há anos tem-se especulado sobre o papel de regiões flexíveis, não-enoveladas, ou ditas intrinsecamente desordenadas em proteínas, principalmente nos processos biológicos de interação molecular. Uma das primeiras especulações sobre o assunto veio de Linus Pauling, em 1940, sugerindo que regiões flexíveis dos anticorpos seriam capazes de interagir com diversas formas de antígenos. Um processo de seleção conformacional foi sugerido, onde o anticorpo randomicamente encontraria seu alvo selecionando-o de acordo com o melhor ajuste. Evidências de estruturas parcialmente ou totalmente desordenadas dentro da célula começaram ser reportadas através de experimentos chamados de RMN *in cell*. Apesar de ainda serem controversos, os dados *in cell* ratificam a idéia de que o ambiente celular, com a presença de diversas moléculas, ainda assim não seria suficiente para enovelar estas estruturas (Dunker et al., 2008). As proteínas com regiões flexíveis podem ser bastante representativas na natureza. Tem-se estimado que aproximadamente 30% das proteínas de eucariotos sejam parcialmente ou completamente desestruturadas (Pattaramanon et al., 2007).

Trabalhos que avaliam a predição de desordem em proteínas têm mostrado que eucariotos apresentam maior quantidade de regiões desordenadas, sugerindo que estas regiões estariam associadas à complexidade do domínio Eucariota (Schweers et al., 1994). Dunker et al. (2008), sugerem que o fenômeno de *splicing* alternativo ocorre em sua maioria em regiões do RNA que codificam proteínas com estruturas desordenadas. Sabe-se que o mecanismo de *splicing* alternativo tem sido comumente encontrado em organismos eucariotos, sendo que em humanos e outros mamíferos 40-60% das proteínas são produzidas via este processo alternativo.

Cerca de 30% das proteínas encontradas no genoma humano formam uma família conhecida como IUP (*Intrinsic Unstructured Proteins*), conhecidas pelo seu envolvimento com a ligação a ácidos nucleicos, a outras proteínas, a membranas ou a outros ligantes. Mais de 30 funções foram identificadas para as IUPs, podendo ser chaperonas, proteínas regulatórias, proteínas responsáveis por processos de sinalização celular, freqüentemente associadas à patogênese do câncer (Duvignaud et al., 2009). Muitas proteínas com regiões desordenadas associam-se com diversas moléculas assumindo formas distintas dependendo da molécula parceira. No caso da proteína p53, envolvida com regulação do ciclo celular, uma região curta próxima da porção N-terminal é capaz de formar: hélice com uma molécula parceira; estrutura em folha-beta com outra; e duas estruturas irregulares quando interagem com proteínas distintas das anteriores (Dunker, 2007).

Uma característica interessante das estruturas desordenadas é a presença mais freqüente de alguns aminoácidos. Dentre estes, são comuns o ácido aspártico, a metionina, a lisina, a arginina, a serina, a glutamina, a prolina, a alanina, a glicina e o ácido glutâmico. Por outro lado, os “promotores de ordem” são: a cisteína, o triptofano, a tirosina, a isoleucina, a fenilalanina, a valina, a leucina, a histidina, a treonina e a asparagina. Na figura 3 observa-se a freqüência destes aminoácidos em estruturas depositadas no banco de dados DisProt (<http://www.disprot.org> – Sickmeier et al., 2007) de proteínas desordenadas.

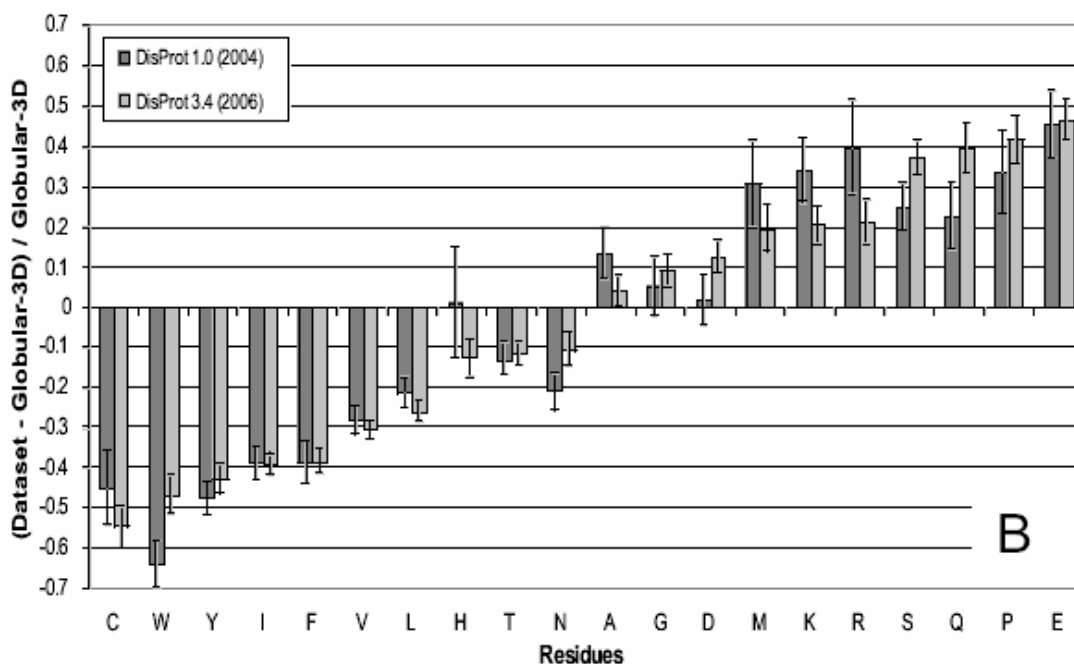


Figura 3. Prevalência dos aminoácidos em estruturas desordenadas depositadas no banco de dados do DisProt (ref) de 2004 (152 proteínas) e 2006 (460 proteínas) em comparação com proteínas bastante ordenadas. As barras positivas representam aminoácidos mais frequentes em proteínas desordenadas (figura extraída de Dunker et al., 2008).

Percebe-se que estruturas flexíveis, freqüentemente compostas por seqüências repetitivas, também contém aminoácidos típicos de proteínas intrinsecamente desordenadas. Nestas estruturas são comumente encontrados prolina, glicina, asparagina, serina e/ou treonina. Estudos por CD e RMN mostraram que estas seqüências peptídicas nem sempre são *random coil* podendo assumir estruturas em *loop*, β -turns dos tipos I e II e poliprolina tipo II (Matsushima et al., 2008). Em *Pseudomonas syringae*, bactéria que possui a proteína INP (*ice nucleation protein*) capaz de formar cristais de gelo, uma seqüência repetitiva (AxxxSxLTAGYGSTxT) assume a forma em *loop* bem definido (Kumaki et al., 2008). No caso das Mucinas humanas, glicoproteínas encontradas na saliva, várias repetições contendo prolina (T-T-A-A-P-P-T-P-S-A-T-T-P-A-P-P-S-S-S-A-PP – Mucina 2) formam uma hélice chamada poliprolina II, semelhante às hélices encontradas em fibras de colágenos (Krane, 2008; Antonyraj et al., 1998). A natureza cíclica do aminoácido prolina, formando o anel pirrolidínico, gera características típicas estruturais nas cadeias polipeptídicas. Primeiro, o ângulo de torção Φ de prolina fica restrito a $-65 \pm 15^\circ$, e, segundo, a posição do carbono δ da cadeia lateral restringe estericamente os ângulos ψ

do resíduo precedente a regiões β do mapa de Ramachandran. Dois tipos de estruturas secundárias formadas por prolinas são conhecidos: hélices totalmente cis (giradas para direita) chamadas de Poliprolina tipo I; e hélices trans totalmente giradas para esquerda chamadas de Poliprolina tipo II (Hornig e Raines, 2006), como as sugeridas por Himily et al. (2003), para Art v 1. Estruturas em Poliprolina II (PPII) totalmente *trans* apresentam ângulos médios de dihedro (Φ, ψ) iguais a -75° e $+145^\circ$ respectivamente. Hélices de prolina II possuem exatamente 3 resíduos por volta, diferente das α -hélices comuns a muitas proteínas, que possuem 3,6 resíduos por volta. Isto resulta em hélices mais estendidas, com 3,16 Å por resíduo no caso das PPII, se comparado com os 1,5 Å das α -hélices (Figura 4).

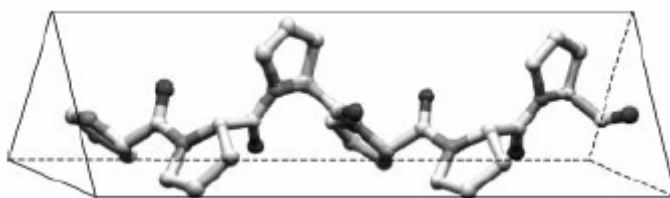


Figura 4. Uma hélice de prolina típica (PPII) com separação de 9 Å a cada volta da hélice. Os vértices do prisma são ocupados pelas três cadeias laterais consecutivas da hélice de prolinas (Figura extraída de Hornig e Raines, (2006).

Sabe-se que estas seqüências ricas em prolinas freqüentemente estão envolvidas em processos de interação, como, por exemplo, o domínio SH3. Este domínio interage com resíduos de prolina (motivo XP-X-XP) em processos de transdução de sinal, organização do citoesqueleto e internalização de receptores de membrana (Hornig e Raines, 2006; Kanelis et al., 2000).

1.2 GENÔMICA ESTRUTURAL

Muitos projetos estão em desenvolvimento para a determinação de estruturas protéicas em larga escala. Estes projetos têm como foco principal alvos de interesse biomédico, mas muitos grupos também estão dedicados a determinar todas as estruturas 3D provenientes de proteínas expressas nos diversos genomas já seqüenciados. O

trabalho de genômica estrutural é bastante árduo, envolvendo grandes consórcios que em um curto espaço de tempo são capazes de gerar muitos modelos tridimensionais a partir de dados de Cristalografia de Raios -X e Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Os objetivos iniciais destes projetos eram mapear todos os enovelamentos protéicos da natureza, tornando possível encontrar a estrutura 3D de qualquer proteína em bancos de dados como o *Protein Data Bank* (PDB), ou chegar à estrutura da proteína desejada através de métodos computacionais. A missão de um dos primeiros projetos de Genômica Estrutural (GE) feito pelo *National Institutes for Health* (NIH), o PSI (*Protein Structure Initiative* – www.nigms.nih.gov) foi de “resolver todas as estruturas em nível atômico a partir de seqüências facilmente obtidas utilizando suas conhecidas seqüências de DNA”. Objetivos similares foram também declarados em projetos como o SPINE (*Structural Proteomics In Europe* – www.spineurope.org) na Europa e o projeto de genômica estrutural do Instituto RIKEN no Japão (www.riken.jp). As previsões de completar o universo protéico encontrado nos genomas por volta do ano 2000 pareciam ser relativamente possíveis quando existiam aproximadamente 300.000 seqüências depositadas nos bancos de dados SwissProt e TrEMBL. Naquele momento estimava-se que 16.000 estruturas ainda precisariam ser determinadas. Atualmente, existem aproximadamente 4 milhões de seqüências já depositadas, com novas famílias de proteínas, incluindo *Singletons* (*Single member families*) e ORFs (*open reading frames*) que não apresentam homologia com os genomas conhecidos. Sabe-se que existem mais de 2000 famílias de proteínas identificadas no Swiss-Prot com função desconhecida e aproximadamente a metade sem caracterização estrutural. A grande pergunta é: o que é possível responder sobre a função de uma proteína a partir de sua estrutura? Os projetos de genômica estrutural certamente têm contribuído muito para responder esta pergunta, mesmo que alguns estudos da GE questionem o quanto as estruturas de fato contribuem para o entendimento das funções biológicas (Grabowski et al., 2007)

Entre esses casos, estão algumas proteínas que, apesar de divergirem em suas seqüências primárias, apresentam domínios estruturais extremamente conservados. Estes enovelamentos conservados, por sua vez, estão associados a diferentes funções biológicas. As defensinas e globinas são exemplos de enovelamentos com essas características e, portanto, tornam-se interessantes alvos de estudo no campo da genômica estrutural (Almeida et al., 2002, Silverstein et al., 2007, Lecomte et al., 2005).

1.2.1 Defensinas de plantas

O primeiro peptídeo antimicrobiano identificado de um organismo eucariótico foi α -purotionina de trigo, descoberta em 1942 por Balls et al. (1942). Nos últimos 20 anos, uma grande diversidade de peptídeos antimicrobianos foram descobertos. Centenas de peptídeos antimicrobianos de plantas e animais encontram-se em diversos bancos de dados (<http://aps.unmc.edu/AP/mail.html>; www.bbcm.univ.trieste.it/~tossi/pag1.htm; <http://research.i2r.a-star.edu.sg/Templar/DB/ANTIMIC/>; <http://phytamp.pfba-lab.org>) (Brahmachary et al., 2004; Wang e Wang, 2004; Hammami et al., 2008). Este número de peptídeos identificados vem crescendo bastante devido ao enorme interesse em suas aplicações terapêuticas que são motivadas pelo aumento na resistência de bactérias e fungos aos antibióticos comuns (Reddy et al., 2004).

As plantas normalmente produzem uma série de metabólitos para se defender do ataque de um patógeno, como inibidores de proteases, toxinas, compostos voláteis e peptídeos antimicrobianos (PAM) (Bruce e Pickett, 2007). Frequentemente estes peptídeos apresentam atividades antifúngicas, antibacterianas e antivirais. Os PAMs constituem a primeira linha de defesa contra patógenos e estão, portanto envolvidos na resposta imune inata (Bulet et al., 2001; Thevissen et al., 2003). Alguns PAMs são comuns às plantas incluindo as famílias das tioninas, proteínas de transferência de lipídeos, haveinas, ciclotidinas e snakinas (Thomma et al., 2002; Silverstein et al., 2007).

Uma classe de peptídeos antimicrobianos composta por moléculas pequenas (usualmente 5 KDa), básicas e ricas em cisteínas é chamada de defensinas. A família das defensinas é a mais prevalente entre os PAMs. Normalmente apresentam de 45-54 aminoácidos e são encontrados além de plantas em humanos e insetos (Thomma et al., 2002; Pelegrini et al., 2005; Egorov et al., 2005). A maioria das defensinas exibe atividades antifúngicas, mas é comum atuarem como antibacterianas (Thomma et al., 2002; Pelegrini et al., 2005). A expressão destas moléculas pode ser tanto constitutiva quando induzida por uma infecção. Até o momento, poucas defensinas de plantas foram caracterizadas quanto à estrutura e função. O mesmo enovelamento proteico é

compartilhado entre proteínas de diferentes atividades biológicas, como bloqueadoras de canais de K^+ , inibidoras de α -amilase e antimicrobianas (Almeida et al., 2001).

As defensinas de plantas apresentam uma grande diversidade de respostas dependendo do tipo de ataque e dos diferentes patógenos. No caso de ataques por insetos, por exemplo, estas respostas irão variar de acordo com os tipos de herbívoros (picadores/sugadores ou mastigadores) (Bruce e Pickett, 2007). Diversos inibidores de proteinases ou α -amilases são produzidos por plantas nestas funções de defesa, agindo no intestino dos insetos. Inibidores bi-funcionais (α -amilase/proteinase) são também relativamente comuns em plantas (Schimoler et al., 2001; Lay et al., 2003).

Apesar da grande divergência de seqüência primária apresentada pelas defensinas, elas compartilham propriedades catiônicas e anfipáticas e são estabilizadas normalmente por 4 ligações dissulfeto, bastante conservadas (Silverstein et al., 2007). Algumas propostas quanto ao mecanismo de ação têm sido feitas. Sugere-se que as cargas positivas a pH fisiológico estão relacionadas com interações entre a defensina e as cabeças de grupamentos aniônicos da membrana lipídica do microorganismo. Acredita-se que grupos com propriedades hidrofóbicas seriam os responsáveis pela interação do peptídeo dentro da membrana. Algumas evidências têm mostrado que o dano à membrana não é o único mecanismo envolvido (Shai, 2002; Jelinek e Kolusheva, 2005; Lobo et al., 2007). Um importante sítio de ligação à glucosilceramidas, presentes em membranas de fungos, foi proposto para defensinas de planta através de experimentos com o peptídeo Rs-AFP1. Em *Saccharomyces cerevisiae*, a defensina Ah-AMP1 interage com um esfingolípido chamado M(IP)2C (mannosidilinositol-fosforilceramida), que resulta no influxo de Ca^{++} e efluxo de K^+ inibindo o crescimento celular (Thevissen et al., 2000; Thevissen et al., 2004). Além disso, a internalização e interação de outros alvos dentro das células estão provavelmente envolvidas no mecanismo de ação das defensinas (Aerst et al., 2006; Aerst et al., 2007 e Lobo et al., 2007).

A convergência das estruturas 3D é a principal relação entre as defensinas, que compartilham um motivo chamado de α/β . Este motivo estrutural é formado por uma α -hélice e três fitas betas antiparalelas, compondo a arquitetura $\beta\alpha\beta\beta$, e é termicamente estável (Thomma et al., 2002; Almeida et al., 2002). Um esforço grande tem sido feito

para correlacionar estrutura e função em defensinas. Recentemente, Yount e Yeaman (2004), identificaram na estrutura de peptídeos antimicrobianos uma região conservada chamada de motivo- γ . Estes autores sugerem que a presença deste centro estrutural seria uma marca na estrutura para a função antimicrobiana.

1.2.1.1 Defensinas de cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma importante planta de cultivo. A cultivar comumente utilizada é resultado da hibridação das espécies *Saccharum officinarum* e *Saccharum spontaneum* (Vettore et al., 2001). Devido sua importância econômica, o Estado de São Paulo (através da FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) financiou o seqüenciamento de ESTs (*Expressed Sequence Tags*) do genoma da cana-de-açúcar (<http://sucest.lad.ic.unicamp.br/>). O banco de dados contém 43,000 EST, com bibliotecas de diferentes tecidos nos vários estágios de desenvolvimento (Vettore et al., 2001). Muitas seqüências estão, portanto, disponíveis para estudos de biologia molecular. Neste trabalho, identificamos diversas defensinas de cana-de-açúcar a partir de uma busca no banco de dados EST, caracterizando estas proteínas através de RMN e testes antimicrobianos (Artigo 2).

1.2.2 Hemoglobinas bacterianas

Assim como os vertebrados, outros organismos possuem hemoglobinas, incluindo bactérias. Recentemente um novo grupo de hemoglobinas, formando a superfamília chamada hemoglobinas truncadas (trHbs), foi identificada (Hoy e Hardgrove, 2008). Esta família é amplamente distribuídas em bactérias, Archea, eucariotos unicelulares e plantas (Vinogradov et al., 2006; Wu et al., 2003) e apresenta hemoproteínas com 20-40 resíduos a menos se comparado com as hemoglobinas de vertebrados (Hbs) ou mioglobinas (Mbs). Assim como as demais globinas, dificilmente são relacionadas através de similaridade de seqüência (Potts et al., 1992; Wittenberg et al. 2002). A diferença estrutural básica entre a clássica hemoglobina de vertebrados reportada por Perutz em 1979 e as hemoglobinas truncadas está na existência de um novo enovelamento. Este enovelamento chamado de *2 on 2 α -helical* apresenta um encurtamento da hélice A, ausência da hélice D, aumento do loop anterior a hélice F e uma maior variação da hélice F (o nome das hélice provém da estrutura 3D da

mioglobina) (Milani et al., 2001; Pesce et al., 2000). Na figura 5 pode-se evidenciar melhor as diferenças entre os enovelamentos. Os pares de hélices antiparalelos (B/E e G/H) estão arranjados em um *bundle* que protege o grupo heme da exposição ao solvente. As outras diferenças estão no sítio de ligação ao ligante, que em hemoglobinas clássicas é bloqueado sofrendo uma torção para permitir a entrada e saída do ligante, e em hemoglobinas truncadas não é bloqueado e o acesso se dá através de um túnel exposto ao solvente (Ilari et al., 2007; Lu et al., 2007; Milani et al., 2001; Milani et al., 2003).

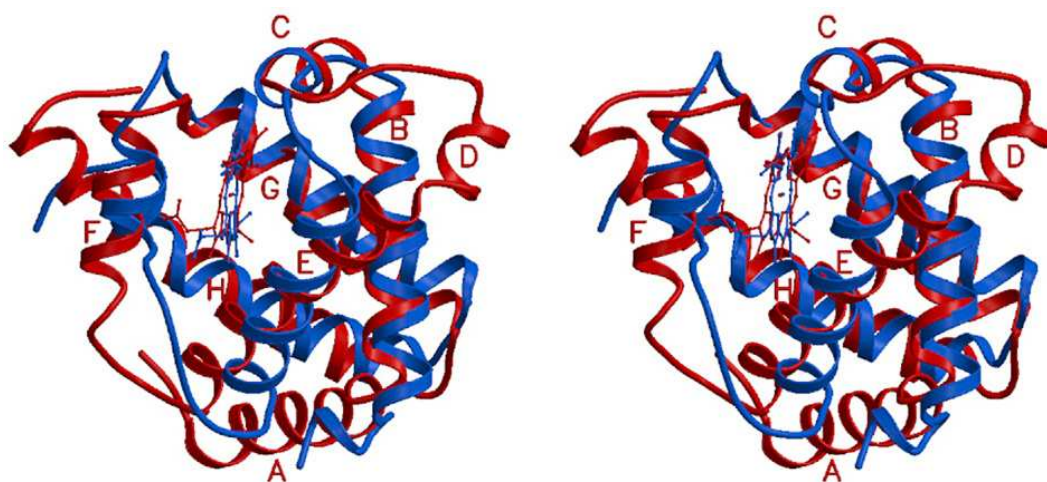


Figura 5. Comparação entre os enovelamentos 2/2 e 3/3 (hemoglobinas “típicas”). Uma visão do esqueleto carbônico é apresentada para uma hemoglobina truncada de *Micobacterium tuberculosis* (em azul, PDB 1DLY) e sobreposta a Mioglobina de vertebrados (em vermelho, PDB 1EBC) (Figura extraída de Pesce et al., 2000)

Proteínas que contém heme são componentes vitais da maioria dos organismos. A característica comum a todos os grupamentos heme é o grupo prostético protoheme IX. O estado de oxidação do metal no heme é um importante modulador de suas propriedades bioquímicas, por exemplo, a mioglobina e a hemoglobina formam complexos oxiferrosos, onde o estado férrico é o estado não funcional. Proteínas que transferem elétrons como o citocromo b5 e c, possuem um sistema eficiente capaz de rapidamente mudar do estado férrico para o ferroso, e as peroxidases, ativadas por O₂, exibem mudanças no estado de oxidação (FeII, FeIII, FeIV) de acordo com o progresso do ciclo catalítico (Rivera e Caignan, 2004). Os sítios de coordenação do heme são extremamente importantes para o modo de ação das globinas. Nas hemoglobinas de vertebrados a coordenação do heme é do tipo bis-histidina chamadas de proximal e distal. Na ausência de O₂, a histidina distal encontra uma molécula de água, no bolsão

distal, que não é coordenada ao metal do grupo heme e confere uma barreira a ligação ao oxigênio. Quando o O_2 está presente, ele desloca a molécula de água formando uma ligação de hidrogênio energeticamente favorável com a histidina distal (Kandu et al., 2003). De acordo com o tipo de coordenação, as hemoglobinas podem assumir estados chamados de pentacoordenados ou hexacoordenados. Quando as proteínas estão no estado pentacoordenado, o aminoácido envolvido na coordenação distal do heme encontra-se fazendo ligações de hidrogênio, seja com a H_2O ou com outro ligante. Já no hexacoordenado, o aminoácido distal está diretamente ligado ao grupamento metálico do heme, completando a sexta valência de coordenação do ferro (Figura 6).

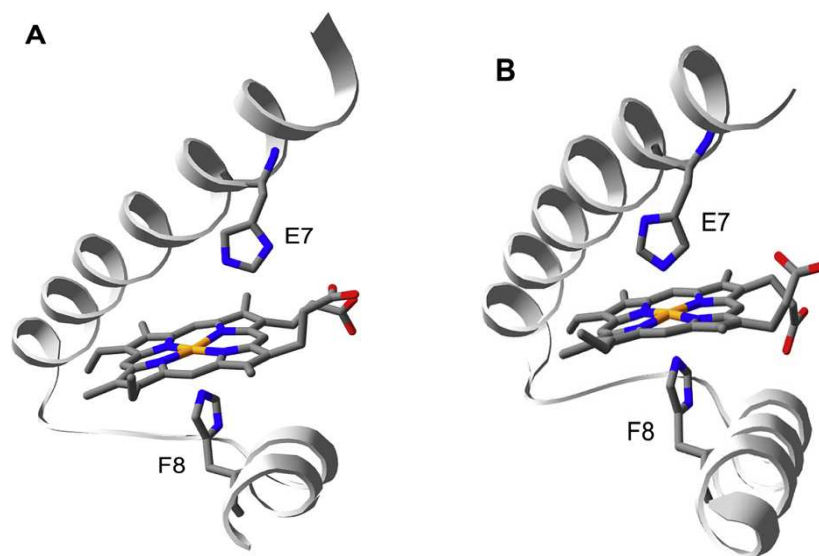


Figura 6. Hélices E e F da região distal de hemoglobinas Penta e Hexacoordenadas. Em A, a estrutura da Lba (1BIN) apresentando seu bolsão distal pentacoordenado. Em B, a estrutura da Hb1 de arroz mostrando a histidina distal (E7) no sexto sítio de ligação do metal do heme (extraído de Hoy e Hardgrove, 2008).

As hemoglobinas truncadas exibem uma ampla variação nas suas seqüências primárias e a histidina proximal passa a ser o único resíduo conservado na superfamília. As diferenças entre as hemoglobinas de vertebrados e as truncadas são observadas em posições envolvidas na coordenação do grupo heme e, portanto, podem estar relacionadas com a estabilização do ligante. O metal do grupo heme em trHbs é capaz de interagir com diversos ligantes com diferentes afinidades (Bonamore et al., 2005; Lecomte et al., 2005; Thorsteinsson et al., 1996). Os aminoácidos que participam da

coordenação do metal no bolsão distal da proteína encontram-se nas posições B10, E7 e E10 de acordo com a nomenclatura de globinas de vertebrados (Lecomte et al., 2005).

A função biológica das hemoglobinas truncadas ainda é desconhecida, embora tenha sido sugerido o envolvimento em processos de transporte e varredura de oxigênio ou na detoxificação de NO (Fabozzi et al., 2006; Lama et al., 2006; Garrocho-Villegas et al., 2007). Apesar de não haver nenhuma propriedade fisiológica e metabólica inequívoca associada às trHbs, elas podem estar envolvidas em processos de fixação de nitrogênio em sistemas biológicos específicos (Garrocho-Villegas et al., 2007). Neste caso, sabe-se que a concentração de oxigênio deve ser mantida a baixos níveis facilitando sua difusão. Em plantas esta função é exercida por leghemoglobinas que estão presentes em concentrações mili molares nas raízes (Kandu et al., 2003). Sendo assim, a participação de uma globina bacteriana no processo de fixação de nitrogênio não pode ser descartada.

Um gene codificando uma hemoglobina truncada (Hs-trHb1) foi identificado a partir do sequenciamento do genoma de *herbaspirillum seropedicae*, uma proteobactéria simbiótica da subclasse β . Este microorganismo é capaz de fixar nitrogênio atmosférico (N_2) em condições microaeróbicas e de crescer bem usando N_2 como fonte de nitrogênio no solo. A bactéria *H.seropedicae* é encontrada na superfície ou interior de raízes, folhas e caules de 13 espécies de gramíneas, como arroz, milho e trigo (Baldani et al., 1996). A colonização é iniciada pela proliferação de bactérias ligada à superfície das raízes e é seguida pela penetração e acumulação de bactérias nos espaços intracelulares de tecidos do aerênquima e feixes vasculares. Por fim, a colonização se estabelece nos feixes vasculares do xilema (James et al., 2002).

Considerando o fato de a *H.seropedicae* ser uma bactéria fixadora de nitrogênio, a hemoglobina truncada 1 (Hs-trHb1) eventualmente poderia varrer o O_2 e apresentar ao complexo da nitrogenase (principal enzima na cascata de fixação que converte N_2 em amônia). Portanto, a caracterização das propriedades da Hs-trHb1 (Artigo 4), um novo membro da classe II de hemoglobinas truncadas, pode ser útil na identificação do seu modo de ação, já que nenhuma estrutura 3D está disponível para hemoglobinas truncadas em uma bactéria fixadora de nitrogênio.

2. CONTEXTO TECNOLÓGICO

A técnica de Ressonância Magnética Nuclear vem se desenvolvendo muito e surge no contexto da biologia estrutural como uma ferramenta importante para o entendimento dos fenômenos biológicos. Acreditamos que os trabalhos desenvolvidos nesta tese e o foco na seleção dos alvos biológicos, além de sua relevância nos campos da biotecnologia e biomedicina, também se apresentam como grandes desafios para o desenvolvimento da área no Brasil.

2.1. Princípios básicos da Ressonância Magnética Nuclear

Tradicionalmente a Cristalografia de raios-X vem sendo utilizada como a principal técnica na determinação da estrutura de macromoléculas em nível atômico. Devido a sua alta eficiência metodológica, a Cristalografia hoje é técnica mais rápida para chegar-se a uma estrutura 3D (Billeter et al., 2008). No entanto, a técnica de RMN surge como uma possibilidade não só de determinar a estrutura de macromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos, carboidratos), como de estudar a sua dinâmica em solução, gerando novas perguntas acerca deste tema (Page et al., 2004).

Antes de discorrer sobre os temas de resolução de estrutura de proteínas e os princípios da dinâmica molecular por RMN, é interessante introduzir alguns conceitos básicos que facilitam a compreensão destes tópicos e também dos dados apresentados neste trabalho.

Um dos principais conceitos é a origem do efeito da Ressonância Magnética Nuclear. Os núcleos com número de *spin* diferente de zero, como o ^1H , ^{15}N e ^{13}C , por exemplo, possuem um momento magnético capaz de interagir com um campo magnético aplicado. O hidrogênio, por exemplo, possui *spin* $I=1/2$ o qual é capaz de gerar, quando num campo magnético, dois níveis de energia. Esses níveis de energia podem ser caracterizados pelo número quântico de *spin* nuclear (m_I), que são separados por uma quantidade ΔE de energia dependente do campo aplicado. A equação abaixo, mostra a relação entre a energia ΔE e o campo magnético aplicado, chamado de estático (B_0), onde γ é a taxa magnetogírica (explicada logo a seguir) e h é a constante de plank.

$$\Delta E = h\gamma B_0 / 2\pi$$

Deste modo, os dois estados de energia podem ser representados pelo estado $m_I = +1/2$ no qual o momento magnético é paralelo a B_0 e o estado $m_I = -1/2$, antiparalelo ao campo aplicado. Em outras palavras, este núcleo com *spin* $1/2$ está agora alinhado ao campo magnético estático B_0 (campo magnético gerado pelo supercondutor do equipamento de ressonância). A resultante da diferença entre estas duas populações de *spins* chamamos de vetor magnetização (M_z). A partir desta relação, podemos visualizar (Figura 7) que a perturbação destas populações de *spins* (M_z) só irá ocorrer quando outro campo magnético (B_1) for aplicado, fazendo os *spins* saírem da condição de equilíbrio. A aplicação deste campo B_1 é feita através de pulsos de radiofrequência pelo espectrômetro. Sabe-se que núcleos como o hidrogênio, após sofrerem o efeito de um segundo campo magnético (B_1), saem da condição de equilíbrio e o vetor magnetização desenvolve um movimento chamado de precessão mostrado na figura 7 (Silverstein et al., 1979).

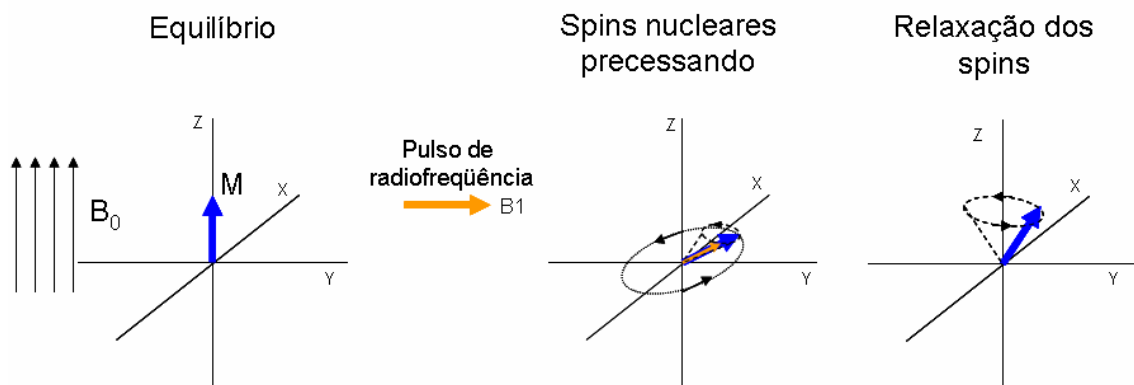


Figura 7. Representação simplificada do efeito da aplicação de um pulso de radiofrequência sobre a população de *spins* alinhados a um campo magnético (B_0). O vetor magnetização M representa a resultante das populações de *spins* após a aplicação do campo magnético estático. Esta resultante após a aplicação do pulso passa a precessar sobre B_1 . Na figura o vetor magnetização termina voltando ao equilíbrio (relaxação dos spins).

A velocidade de precessão é chamada de frequência de Larmor e é dada pela equação abaixo:

$$\omega = \gamma B_0 \quad \text{ou} \quad \nu = \gamma B_0 / 2\pi$$

onde ν é a frequência de ressonância em Hertz e ω é a frequência em radianos/segundo. A taxa magnetogírica γ é uma constante de proporcionalidade que relaciona a frequência observada para um núcleo em particular com a intensidade do campo magnético aplicado (Sanders e Hunter, 1993).

Para que o núcleo desejado precesse ao redor do campo aplicado (B_1) é necessário que a frequência do pulso (aplicado de forma perpendicular a B_0) seja igual à frequência de Larmor deste núcleo. Este é o efeito de Ressonância Magnética Nuclear. O sinal de ressonância detectado provém da conversão do decaimento da magnetização em função do tempo (FID – *free induction decay*). Este decaimento ocorre de maneira exponencial e é convertido a um domínio de frequências através de uma operação matemática chamada transformada de Fourier (Sanders e Hunter, 1993). Após esta operação podemos observar os típicos espectros de uma dimensão (1D) como mostrados no segundo artigo desta tese (DePaula et al., 2008). As diferenças entre as frequências de ressonância mostradas num espectro 1D irão depender da chamada blindagem dos núcleos, levando em conta sua vizinhança, ou seja, os elétrons que o cercam (Silverstein et al., 1979; Nascimento e Bloch jr, 2001; Sanders e Hunter, 1993;).

2.1.1 Assinalamento das frequências de ressonâncias através de experimentos 3D: caso dos sistemas poliprolina

Para obter o assinalamento das frequências de ressonância de uma proteína marcada isotópicamente com ^{13}C e ^{15}N , diversos experimentos de tripla-ressonância (^1H , ^{13}C e ^{15}N) são comumente utilizados. Estes experimentos, após transferirem a magnetização para os núcleos N e C, detectam no hidrogênio amídico da proteína o resultado final da transferência.

Quando seqüências protéicas apresentam-se ricas em prolina, de forma seqüencial, como o caso do alergeno Art v 1, o assinalamento das frequências de ressonância se torna mais difícil. Normalmente, para se obter o assinalamento seqüencial de uma cadeia polipeptídica, as seqüências de pulso básicas para realizar o assinalamento da cadeia principal são a CBCA(CO)NH e a HNCACB (Grzesiek e Bax, 1992) como mostra a figura 8. No entanto, as prolina não possuem o hidrogênio livre do grupamento amídico como os demais aminoácidos. Sendo assim, os experimentos

citados anteriormente não irão detectar o nitrogênio amídico destas prolinas. Para superar a dificuldade técnica de assinalamento das poliprolinas, outras seqüências de pulso 3D são utilizadas como a HCAN (Kanelis et al. 2000). A seqüência de pulso HCAN transfere a magnetização para os átomos $C\alpha$, $H\alpha$, N e N+1 da cadeia polipeptídica e a sua seqüência par equivalente NCACON, transfere a magnetização para os átomos $C\alpha$, $H\alpha$ e N+1 (ver figura 8c). Deste modo, o assinalamento seqüencial é feito analisando-se fatias do plano de nitrogênio do espectro 3D, conectando-os pela seqüência do peptídeo.

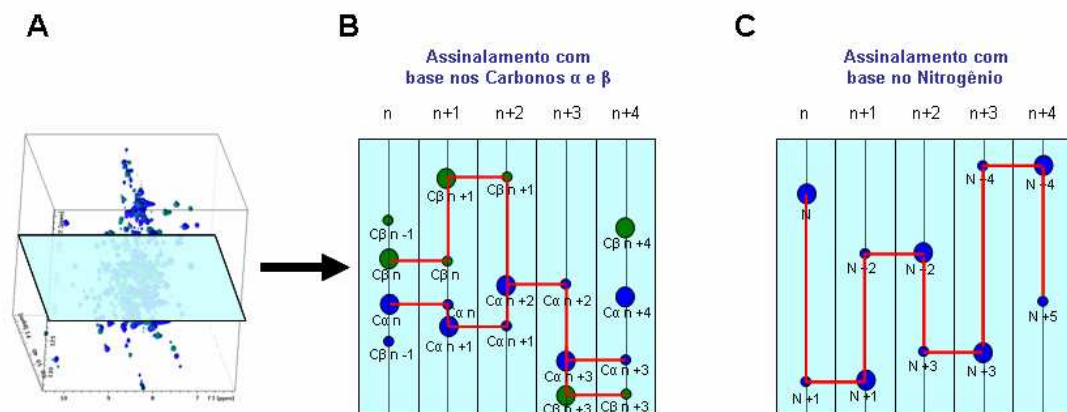


Figura 8. Representação esquemática do assinalamento da cadeia principal de uma proteína. (A) Um espectro 3D típico, no caso o HNCACB. (B) Assinalamento a partir de experimentos de tripla ressonância HNCACB. (C) Assinalamento específico de prolinas a partir do experimento HCAN.

Outros experimentos utilizados para o assinalamento das freqüências de ressonância do alergeno Art v 1 são descritos na seção de materiais e métodos.

2.2. Determinação Semi-Automática de Estruturas por RMN

A Genômica Estrutural contribuiu bastante para o desenvolvimento de novas metodologias. Campos de estudo como a biologia computacional e a biologia molecular com técnicas *high-throughput*, por exemplo, têm se beneficiado do esforço da genômica estrutural. Um destes avanços está no aprimoramento técnico para a resolução de estruturas 3D, sendo que hoje, um grande número de proteínas já tiveram suas estruturas resolvidas de uma forma bastante automatizada. No entanto, Billeter M, et al. (2008) ressaltam que ainda há grandes desafios na investigação em nível atômico de

macromoléculas, como, por exemplo: proteínas localizadas ou que interagem com membranas biológicas; moléculas que não estão totalmente enoveladas em solução ou que são intrinsecamente desenoveladas nas células.

As técnicas automatizadas de resolução estrutural de proteínas, são hoje importantes ferramentas em desenvolvimento para a Ressonância Magnética Nuclear. Assim como a cristalografia, a RMN também começa buscar alternativas para agilizar os processos de determinação de estrutura.

A técnica original, desenvolvida por Wüthrich, em 1986, baseia-se no reconhecimento e classificação de NOEs (Nuclear Overhauser Enhancement) gerados através da seqüência de pulsos do espectro de NOESY (Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy), combinado com o assinalamento de frequências de ressonância provenientes do espectro de TOCSY (Total Corelation Spectroscopy).

Os NOEs são o resultado da relaxação-cruzada devido a interações dipolo-dipolo entre pares vizinhos de *spins* nucleares que se movimentam de forma Browniana (Wüthrich, 1986). Em um espectro bidimensional [¹H,¹H]-NOESY, os NOEs manifestam-se através de picos de relação-cruzada (*cross-peaks*). Basicamente, os dados conformacionais, que restringem as múltiplas possibilidades estruturais durante o cálculo de uma estrutura protéica, provém de NOEs de longa distância. Devido à relação $1/r^6$ entre intensidade do NOE e a distância entre o par de *spins* no espaço, uma parte significativa da informação necessária para o cálculo, de longa distância, encontra-se muito próxima do nível de ruído do espectro. (Herrmann, T et al., 2002 b). Contudo, um dos grandes gargalos da resolução de estruturas por RMN está no assinalamento dos NOEs. Muitos picos de correlação do espectro de NOESY são ambíguos gerando múltiplos sistemas de *spins*. Além disso, o reconhecimento dos NOEs envolve ultrapassar os problemas de sobreposição dos sinais e, ainda, de ausência de determinados sinais devido à relaxação rápida ou à troca conformacional. Muitas vezes artefatos são gerados nos espectros de NOESY dificultam ainda mais o reconhecimento e o posicionamento dos sinais (Hermann, et al., 2002 a). A estratégia clássica de assinalamento dos NOEs em proteínas era feita somente através de procedimentos manuais, buscando os NOEs não ambíguos e calculando uma estrutura para, posteriormente, julgar os demais NOEs encontrados. Este procedimento era efetuado

inúmeras vezes (Wüthrich, 1986). Vale ressaltar que esta estratégia ainda é amplamente utilizada, principalmente para peptídeos.

No intuito de agilizar os processos árduos que requerem profissionais experientes em RMN, alguns grupos têm se dedicado a automatização no reconhecimento de NOEs e na sua classificação relativa à distância na estrutura 3D. Alguns algoritmos para assinalamento de NOEs foram ou são ainda bastante utilizados como o CANDID (Etezady-Esfarjani, 2006) ARIA (Linge et al., 2003) e NOAH (Xu et al., 1999). O algoritmo CANDID (Combined Automated NOE assignment and Structure Determination), que contém elementos dos outros já desenvolvidos anteriormente, será focado neste trabalho. De um modo geral, o CANDID realiza diversos ciclos de assinalamento de NOEs ambíguos seguidos por cálculos estruturais usando dinâmica de ângulos torcionais. O CANDID é, portanto, utilizado em conjunto com programas de cálculo de estruturas 3D (figura 9).

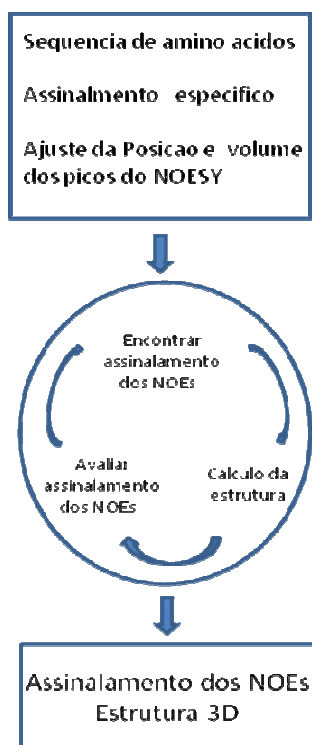


Figura 9. Esquema geral da combinação do assinalamento automático dos NOEs feito pelo CANDID com o cálculo de uma estrutura (adaptado de Guntert, 2005).

No início desse procedimento é feita a leitura dos dados experimentais: lista de deslocamentos químicos, provenientes do assinalamento das ressonâncias específicas da

proteína de interesse; lista do posicionamento e volume dos picos de co-relação dos espectros de NOESY. Posteriormente os assinalamentos são classificados. Para cada pico do NOESY é feita uma avaliação da concordância entre os valores da lista de deslocamentos químicos fornecida, a posição de cada pico no espectro (incluindo a existência de simetria nos picos cruzados) e a compatibilidade com a estrutura 3D gerada no ciclo anterior. Em seguida, ocorre a calibração das restrições de distância. Para isso, a partir do NOESY, o volume e intensidade dos picos ambíguos e não ambíguos são calculados. Como último passo antes do cálculo da estrutura, ocorre a eliminação de picos cruzados que não são compatíveis com o *score* da rede de ancoramento (*network-anchoring score*) e com a estrutura 3D intermediária gerada no ciclo anterior, quando houver (Guntert, 2005). Um passo importante do algoritmo CANDID é o julgamento de restrições de distâncias ambíguas. O resultado dos diversos ciclos pode ser melhor visualizado na figura 10.

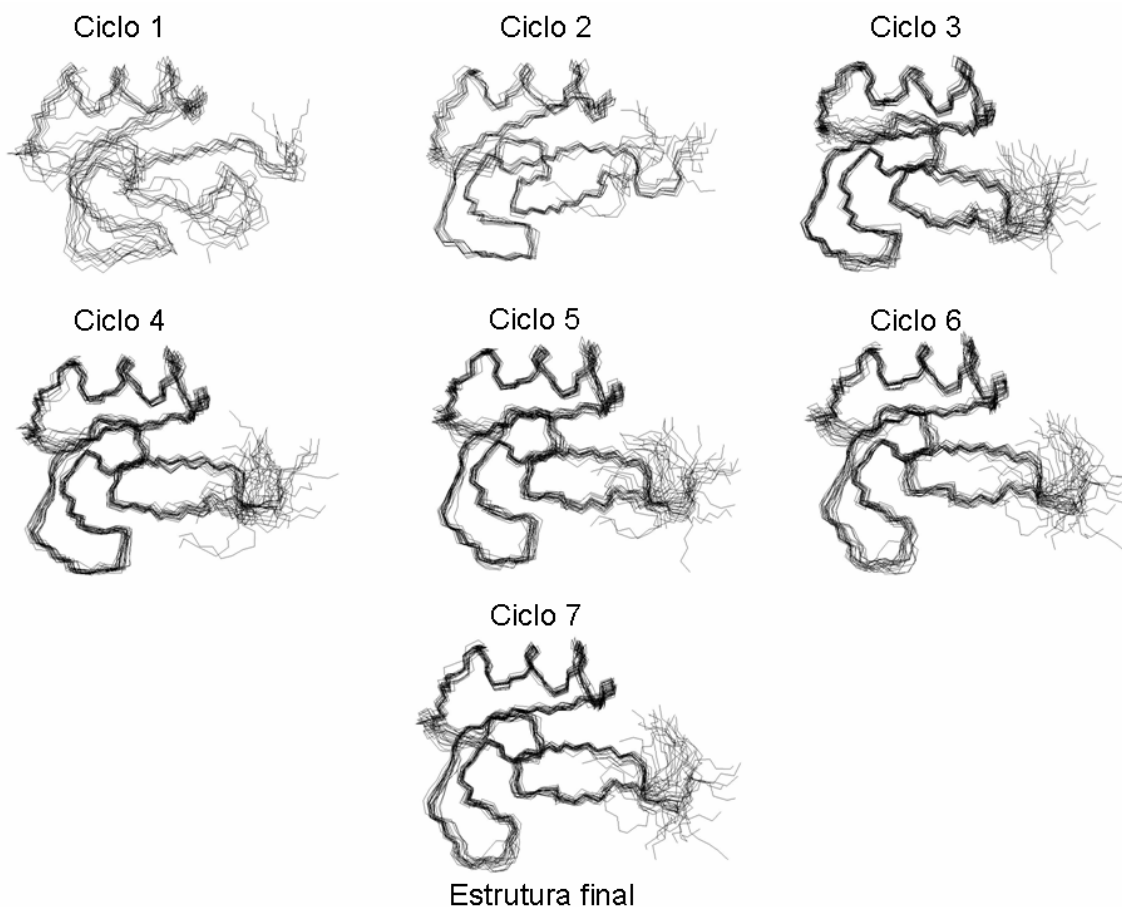


Figura 10. Resultado dos cálculos feitos com CYANA 2.1 (Güntert, 2004) para domínio defensina da proteína Art v 1 (Razzer et al., 2009b) combinados com o algoritmo CANDID (Etezady-Esfarjani, 2006) nos diversos ciclos efetuados pelo programa.

2.3. Avaliação estrutural de sistemas desordenados por RMN

Diversas metodologias têm sido empregadas para caracterizar estruturalmente as proteínas em estado desordenado, como dicroísmo circular, fluorescência, FTIR (*Fourier transform infrared*), RMN, SAXS (*Small-Angle X-ray Scattering*) e Ressonância Paramagnética de Elétrons (PRE). Dentre estas técnicas, duas têm fornecido valiosas informações estruturais: RMN, a qual fornece informações em resolução atômica de estruturas secundárias, contatos terciários, exposição ao solvente e propriedades dinâmicas da molécula; e SAXS, pois é uma técnica altamente especializada para medidas de dimensão molecular (Forman-kay, et al., 2007). Parte

deste trabalho será focada no uso da RMN para caracterização de uma molécula flexível (Artigos 1 e 2).

Uma das maneiras de se avaliar ordem é através dos assinalamentos das frequências de RMN que, além de necessários para a obtenção de resultados específicos, geram muita informação a partir dos dados brutos. O desvio dos dados experimentais em relação aos valores esperados para estruturas desordenadas ($\Delta\delta = \delta_{\text{experimental}} - \delta_{\text{randômico}}$), por exemplo, pode refletir o conteúdo de estrutura secundária de uma proteína (Wüthrich, 1986). Valores entre ± 2 ppm para a combinação dos deslocamentos químicos de $^{13}\text{C}\alpha$ e $^{13}\text{C}\beta$ em resíduos consecutivos, normalmente refletem estruturas secundárias bem definidas. Já valores abaixo de 2 refletem flutuações na amostragem dos ângulos de torção nas regiões típicas de estrutura secundária α e β no *plot* de Ramachandran. Estes dados podem ser utilizados para prever tendências estruturais em proteínas desenoveladas (Horng e Raines, 2006).

2.4. Dinâmica Molecular por RMN

Sabe-se que processos como reações enzimáticas, reconhecimento de substratos e interações entre proteínas ocorrem em nível molecular. Na tentativa de explicar estes fenômenos, figuras complexas são rotineiramente mostradas nas capas das mais populares revistas e, enquanto essas imagens são amplamente divulgadas, a idéia de moléculas rígidas, sólidas e estáticas, erroneamente é transmitida. Há o risco de que mesmo a comunidade científica da área bioquímica tenha a mesma impressão (Zhang, Y et al., 2007). Sabe-se que os enovelamentos bem estruturados, ricos em estruturas secundárias bem definidas representam apenas uma parte do universo biológico molecular. Mesmo estas estruturas “mais rígidas” precisam ser estudadas como moléculas dinâmicas capazes de muitas interações e que dependem também do tempo de vida do organismo, ou seja, sua função deve ser avaliada de acordo com o momento do desenvolvimento do organismo (Nimrod et al., 2008).

Como resultado de grandes avanços no campo da biologia estrutural, as proteínas por muito tempo foram estudadas como materiais que assumem uma série de conformações ao redor de uma média resultante de uma baixa energia térmica. No

entanto, para se ter uma análise completa, é necessário um diagrama multidimensional de energia que defina as probabilidades relativas dos estados conformacionais (termodinâmica) e as barreiras energéticas entre eles (cinética). Contudo, para entender as proteínas em funcionamento a quarta dimensão, tempo, deve ser considerada (Henzler-Wildman e Kern, 2007).

A comparação do parâmetro de ordem em diferentes condições pode fornecer uma estimativa da contribuição do movimento do próton amídico à entropia do sistema e à estabilidade da proteína (Palmer, 2001; Akke et al. 1993; Yang e Kay, 1996). A análise de rotação difusional pode fornecer uma representação, mesmo sem a estrutura determinada, do tamanho e da forma da molécula. Isto pode ser muito útil, por exemplo, para identificar agregações ou orientação de domínios (Case, 2002).

Os dados de relaxação dos *spins* têm sido utilizados para medir mudanças na energia livre devido: à cooperatividade, como no caso da proteína *Calbinding* ligadora de Ca^{2+} (Akke et al. 1993); às mudanças na entropia resultantes da transição durante o enovelamento protéico, como mostram Yang e Kay (1996) para o domínio SH3; e às contribuições entrópicas envolvidas na transição do estado desordenado para o ordenado mostrado para o fator de transcrição GCN4 (Bracken et al., 1999). Sabe-se, também, que mudanças nos parâmetros de ordem S^2 têm sido utilizadas para identificar regiões de ligação de pequenos ligantes (Stivers et al., 1996; Zidek et al., 1999) e mutações sítio-específicas.

A marcação isotópica (^{15}N , ^{13}C e ^2H) de proteínas permitiu que os parâmetros de relaxação dos *spins* nucleares pudessem ser medidos especificamente tanto no esqueleto protéico quanto em suas cadeias laterais. Nos experimentos de relaxação da RMN a magnetização dos *spins* nucleares é excitada pela aplicação de campos de radiofrequência eletromagnética e o retorno da magnetização dos *spins* ao equilíbrio térmico é monitorado usando experimentos multidimensionais. Comumente, os parâmetros de relaxação medidos são os tempos T1 (relaxação longitudinal), T2 (relaxação transversa) e Efeito Overhauser Heteronuclear (Case, 2002). Em 1946, Bloch introduziu o conceito de tempo de relaxação com uma descrição fenomenológica da relaxação dos *spins*. A chamada equação de Bloch (abaixo) descreve de forma vetorial a magnetização M oscilando em um campo magnético. Assume-se que a componente da

magnetização (M_z) decai exponencialmente até um valor de equilíbrio (M_z^{eq}) através de um tempo constante T_1 e as componentes M_x e M_y decaem através de T_2 .

$$d\mathbf{M}/dt = \gamma(\mathbf{M} \times \mathbf{H}) - [M_z - M_z^{eq}]\mathbf{k}/T_1 - (M_x\mathbf{i} + M_y\mathbf{j})/T_2$$

Logo depois, em 1948, uma teoria proposta por Bloembergen, Purcell e Pound relaciona a relaxação dos *spins* a transições de probabilidades entre diferentes níveis energéticos. Em 1955, Solomon propõem uma expressão para a relaxação dipolar transversa e longitudinal em um sistema de dois *spins*. Quatro níveis de energia são propostos para este sistema, (α,α) , (α,β) , (β,α) e (β,β) (Dayie et al., 1996).

Sabe-se que a taxa de retorno de um *spin* a seu estado de equilíbrio em um campo magnético é determinada por uma relação dependente do tempo para cada núcleo atômico. A capacidade deste campo flutuante induzir transições nos *spins* é também dependente da intensidade de freqüências que correspondem à soma e às diferenças das freqüências de Larmor dos *spins* nucleares. Isto é representado através de densidades espectrais ($J(\omega)$), que são as transformadas de Fourier das funções de correlação no tempo (Cage).

Na década de 80, Lipar e Szabo (1982), interpretam os dados de R_1 ($1/T_1$), R_2 ($1/T_2$) e NOE heteronuclear através da análise chamada “livre de modelo” (*model-free*). A análise do *model free* ajusta os dados usando modelos de rotação difusional. O postulado do modelo de rotação difusional diz que a densidade da probabilidade $f(\Phi,t)$ de ter uma molécula com orientação Φ num tempo t , é governada pela equação de difusão, que para uma molécula esférica é:

$$\frac{\partial}{\partial t} f(\Phi,t) = D\nabla^2 f(\Phi,t)$$

A relação Stokes-Einstein-Debye é dada por $D = kT/(8\pi R_h^3 \eta)$, onde R_h^3 é o raio hidrodinâmico da molécula e η é viscosidade do solvente. Num movimento isotrópico de rotação, a função exponencial de correlação é $C(\tau) = \exp(-\tau/\tau_c)$, onde τ_c é a constante do tempo e segue a relação de $1/6D$. Logo, a transformada de Fourier é igual a:

$$J^{\text{rigid}}(\omega) = \frac{2\tau_c}{1 + \omega^2\tau_c^2}$$

Para se obter os valores referentes à amplitude e ao tempo do movimento de vetores de ligação química com N-H (em proteínas), é necessário o ajuste das medidas de relaxação dos *spins* aos modelos representados pelas equações de densidade espectral e também a análise estatística da comparação dos diferentes modelos testados. A relaxação do núcleo ^{15}N amídico é determinada pela interação dipolar com o próton no qual ele está ligado e pela anisotropia do deslocamento químico do ^{15}N (Abragam, 1961). Os parâmetros de relaxação comumente medidos (R1, R2 e {1}HeteroNOE) são determinados pela combinação de densidades espectrais ($J(\omega)$) e de forças interações interatômicas dipolo-dipolo que dominam a relaxação dos Spins nucleares. Os valores de R1, R2 e NOE heteronuclear seguem as seguintes equações:

$$R1 = 1/T1 = (d^2/4) [J(\omega_H - \omega_N) + 3J(\omega_N) + 6J(\omega_H + \omega_N)] + c^2 J(\omega_N)$$

$$R2 = 1/T2 = (d^2/8) [4J(0) + J(\omega_H - \omega_N) + 3J(\omega_N) + 6J(\omega_H) + 6J(\omega_H + \omega_N)] + c^2 [3J(\omega_N) + 4J(0)]$$

$$\text{NOE} = 1 + (\gamma_H/\gamma_N)(d^2/4)[6J(\omega_H + \omega_N) - J(\omega_H - \omega_N)] T1$$

Onde d^2 e c^2 são definidos por:

$$d = (h/2\pi)(\mu_0/4\pi)\gamma_H\gamma_N(r^{-3})$$

$$c = (1/3)^{1/2} \omega_N (\sigma_{\parallel} - \sigma_{\perp})$$

Onde h é a constante de Plank, μ_0 é a permeabilidade no vácuo, γ_H e γ_N são as constantes giromagnéticas dos núcleos de ^1H e ^{15}N , respectivamente, ω_H e ω_N são as frequências de Larmor dos núcleos de ^1H e ^{15}N , respectivamente, r é a distância internuclear $^1\text{H} - ^{15}\text{N}$ (1,02 Å), e $\sigma_{\parallel} - \sigma_{\perp}$ são os componentes paralelo e perpendicular, respectivamente, do tensor de deslocamento químico do núcleo de ^{15}N .

A análise feita através de *model free*, além do modelo de rotação difusional, usa para o ajuste dos dados, no caso de proteínas, um parâmetro de ordem chamado S^2 e um tempo de correlação intrínseco (τ_c) para cada próton amídico. O parâmetro de ordem S^2 mede a amplitude angular do movimento interno do vetor N-H e, portanto, reflete a entropia (S) associada à flutuação da ligação amídica. Dessa forma, os valores se aproximam de um (1) quando houver movimentos muito restritos e se aproximam de

zero (0) quando os movimentos forem totalmente isotrópicos em solução. O tempo τ_e mede o tempo efetivo para este movimento interno. A função de densidade espectral esperada se os movimentos global e interno fossem desacoplados e se a função de correlação decaísse de um valor inicial de 1 até um valor *plateau* de S^2 com um respectivo τ_e é dada por:

$$J^{LS} = \frac{2S^2\tau_c}{1 + \omega^2\tau_c^2} + \frac{2(1 - S^2)\tau}{1 + \omega^2\tau^2}$$

Nesta equação τ corresponde a relação $\tau^{-1} = \tau_c^{-1} + \tau_e^{-1}$ e τ_e é mais curto se comparado com τ_c . Esta equação é válida para a maioria dos grupos N-H de regiões de estrutura secundária de proteínas globulares (Lipari e Szabo 1982 a,b).

O tensor de difusão rotacional é especificado por três componentes principais, que correspondem às constantes de difusão ao redor dos eixos principais x, y, z. Quando a difusão é isotrópica, estes componentes (D_{xx} , D_{yy} e D_{zz}) são iguais. É necessário, portanto, avaliar como estes tensores estão distribuídos para cada molécula para definir o tipo de movimento em solução (isotrópico ou anisotrópico).

O modelo comumente utilizado, adaptado por Clore et al, (1990 a,b), é representado por uma equação de três termos, que inclui dois tempos de correlação τ_f e τ_s para movimentos internos rápidos e lentos respectivamente. Na maioria das vezes, esta é a equação que melhor representa os dados e está representada abaixo:

$$J(\omega) = \frac{S_f^2 S_s^2 \tau_c}{(1 + \omega^2 \tau_c^2)} + \frac{S_f^2 (1 - S_s^2) \tau}{(1 + \omega^2 \tau^2)} + \frac{(1 - S_f^2) \tau_f}{(1 + \omega^2 \tau_f)}$$

Observa-se nesta equação que o parâmetro de ordem também está representado por movimentos rápidos e lentos ($S^2 = S_f S_s$). É importante ressaltar aqui que a escala de tempo destes movimentos é de pico a nanosegundos ($S_s < 20\text{-}50$ ps e $S_f 0,5 - 4$ ns).

Muitas vezes os movimentos encontrados em proteínas são mais lentos, com valores na faixa de milli a microsegundos. A análise do *model-free* leva em conta o alargamento de linha devido à troca química (R_{ex}). O termo R_{ex} considera as interações

dipolares e de anisotropia do deslocamento químico que contribuem para o decaimento da magnetização transversa durante os experimentos que medem R_2 . O termo R_{ex} também pode ser determinado através de experimentos de dispersão da relaxação baseados em seqüências de pulso CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) (Luz e Meiboom, 1963). Esses experimentos permitem uma análise quantitativa dos movimentos no regime de tempo entre 1 e 10^3 s^{-1} , permitindo que seja identificado R_{ex} através da sua modulação pela aplicação de CPMG *field-strength* durante a relaxação. Estes experimentos, apesar de importantes, não foram utilizados neste trabalho e constituem perspectivas futuras de estudo.

2.5. Ressonância Paramagnética Nuclear

As metaloproteínas representam uma grande parte dos genomas, sendo que somente em humanos estima-se que componha 30% das proteínas expressas. Muitas estruturas reportadas não contem o íon metálico nativo, ou mesmo não contém nenhum metal e, portanto, podem não representar a forma ativa da proteína. Um grande número de metaloproteínas contém íons metálicos paramagnéticos, os quais possuem elétrons desemparelhados, ou íons metálicos que se alternam entre diferentes estados de oxidação, sendo um deles o paramagnético. A presença do centro paramagnético afeta os parâmetros da RMN, podendo causar problemas na detecção do sinal. Pode, e também, reduzir a intensidade do Efeito Nuclear *Overhauser* e a eficiência da transferência do acoplamento escalar em experimentos homo e heteronucleares, fazendo com que experimentos de assinalamento e determinação estrutural tradicionais não possam ser utilizados (Arnesano et al., 2005). O foco desta sessão não é a determinação da estrutura de proteínas paramagnéticas por RMN e sim o uso da ressonância paramagnética para responder questões específicas.

As moléculas paramagnéticas são caracterizadas pela presença de um ou mais elétrons desemparelhados. Estes elétrons possuem um grande efeito sobre os deslocamentos químicos observados na RMN, como consequência da forte interação eletro-nuclear chamada *hyperfine interaction*. Esta interação, que é responsável por gerar os deslocamentos paramagnéticos (δ_{para}) é composta de contribuições escalares (entre os elétrons e o núcleo - δ_{esc}) e contribuições dipolares ou espaciais (δ_{dip})

$$\delta_{\text{para}} = \delta_{\text{esc}} + \delta_{\text{dip}}$$

Quando um único nível de *spin* é observado (ex $S = 1/2$), com um tensor isotrópico, a lei de Curie é válida. Dessa forma, há um comportamento linear regido pela equação abaixo:

$$M = C \cdot B/T$$

onde C é uma constante referente a material, B é o campo magnético aplicado e T a temperatura absoluta. Nesta condição a contribuição de contato (δ_{esc}) do deslocamento paramagnético é dada por:

$$\delta_{\text{esc}} = \frac{Ag\beta S(S+1)}{3\gamma_N \hbar kT}$$

onde, S é o número quântico total de spin, g é tensor isotrópico médio, γ é a taxa-magnetogírica do núcleo, T é a temperatura absoluta, B é o magnéton Bohr, k é a constante de Boltzmann e A é a constante de acoplamento escalar hyperfine entre o spin do elétron e o núcleo de interesse (Rivera e Caignan, 2004). Neste trabalho utilizamos estes conceitos para identificar a natureza dos *spins* encontrados para uma metaloproteína de *Herbaspirillum seropedicae* (Artigo 4).

OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Objetivos específicos:

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Clonagem dos genes alvo

As defensinas de cana-de-açúcar foram identificadas a partir da análise por BLAST de seqüências EST fornecidas pelo projeto SUCEST. As buscas foram realizadas utilizando a seqüência da defensina Psd1 (*Pisum sativum*) (Almeida et al. 2001) como entrada ao programa BLAST. Cinco seqüências foram identificadas e usadas em uma segunda busca. As seqüências foram selecionadas pela presença de oito cisteínas conservadas, por conter o peso de aproximadamente 5KDa e por conter resíduos básicos (alto pI). Esta busca resultou em seis candidatos (CA112870, CA095771, CA259771, CA259589, CA297803 e CA188998) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Chamamos estes candidatos de SD 1 a 6.

Os genes das defensinas SD1, SD2, SD3, SD4, SD5 e SD6 com aproximadamente 200 pb foram amplificados por PCR a partir de clones fornecidos pelo projeto SUCEST. Para as reações de PCR utilizou-se a enzima Pfu DNA polimerase (Fermentas) e iniciadores específicos (Invitrogen) (Tabela 1). Os iniciadores continham sítios de restrição para as Bam HI e Nde I. Os produtos de PCR foram digeridos com estas enzimas e purificados através do kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) para posteriormente serem ligados ao vetor pET28a (Novagen) previamente digerido com as mesmas enzimas. Bactérias competentes DH5 α (Invitrogen) foram utilizadas para a transformação dos produtos de subclonagem. Os clones resultantes foram em seguida seqüenciados por seqüenciamento automático (Macrogen).

O gene da Hs-trHb1 foi amplificado por PCR utilizando a enzima Taq DNA polimerase (Fermentas) a partir de clones fornecidos pelo projeto GENOPAR. O gene da Hs-trHb1 foi identificado a partir da anotação genômica feita pelo projeto. Fragmentos de 423 pb foram digeridos com Bam HI e Nde I e ligados ao vetor pET14b (Novagen) previamente digerido com as mesmas enzimas. Os plasmídeos recombinantes foram transformados em células DH5 α e identificados por sequenciamento automático (UFPR – facilidade de sequenciamento do departamento de bioquímica).

O gene da Art v 1 (AF493943) foi subclonado em vetor pHIS paralelo2, usando as enzimas NdeI e XhoI produzindo uma proteína livre de seqüências fusão (Sheffield 1999; Dedic et al. 2008)¹

Tabela 1 Proteínas putativas analisadas neste trabalho

Nome abreviado	Código de acesso	Nº de aa	Seqüencia dos iniciadores ^a
Sd1	CA112870	49	5' GGTGGCGCATATG CGTTACTGCCTGTGCG3' 3' CCAGCAG AGGATC CCCTAGCATATCTTCTGCAG 5'
Sd2	CA095771	47	5' TTGGCGCATATG CGTGTGTGCCGGCG 3' 3' TAGCTAG GGATC CCCTAGCACTGCCTGATGCA 5'
Sd3	CA259771	51	5' GTGGCGCATATG CGTCACCGTCACTGCTTCTCG 3' 3' CGGCCGGATC CCCTAGCAGATCCGCTTG 5'
Sd4	CA259589	49	5' GTGGCGCATATG CGTACGTGCCAGTCG3' 3' GCCCGGGATC CTCAGTTGCCGAGTG5'
Sd5	CA297803	71	5' GCTGCGCATATG CATACTCCTACTCCTAC 3' 3' GAGCAC GGATC CTCAGAGCCTGGCCA 5'
Sd6	CA188998	47	5' GTGGCGCATATG CGTGTGTGCATGGG 3' 3' TTAGTGGATC CTTAGCATGCCTTCTGGCAC 5'
Hs-trHb1	Não publicado	153	5' GGAAAACATATG CAAATCGAAGACCCCAACCAAACC 3' 3' GTTTTCGGATT CTTACTCGGGCTTGTGCGCATCC 5'

^a Em negrito estão indicados sítios de clivagem para as enzimas *Nde* I and *Bam*HI.

2. Expressão e purificação das proteínas subclonadas

A estratégia de clonagem para as defensinas de cana-de-açúcar e para a Hs-trHb1, foi adicionar uma cauda de histidinas N-terminal para facilitar a purificação. As defensinas foram expressas em linhagens *E.coli* BL21 (DE3) e/ou Rosetta-gami (DE3). Já a Hs-trHb1 e Art v 1 foram expressas em BL21 (DE3) e Rosetta-gami b (DE3) pLysS respectivamente. As células foram transformadas com o respectivo plasmídeo e crescidas a 37°C. Pré-inóculos foram utilizados suplementados com os respectivos antibióticos: Canamicina a 50 µg/mL para defensinas em BL21 e para expressão em Rosetta-gami foi adicionado Cloranfenicol a 34µg/mL; para Hs-trHb1 e Art v1 foram utilizados 100 e 50 µg/ml de Ampicilina, respectivamente.

As proteínas foram expressas em meio mínimo ou LB, de acordo com o experimento, crescidas até D.O 600 nm de aproximadamente 0,7 (exceto trHb1 = 1.2 D.O) e induzidas com IPTG em concentrações de 0,4 mM para Art v 1, 0,5mM para Hs-trHb1 e 1mM para as defensinas. As defensinas cresceram a 37°C por 3h durante a expressão. Já a Art v 1 e Hs-trHb1 cresceram *overnight* a 22°C e 37°C respectivamente.

¹ Trabalho realizado em colaboração com a prof. Fátima Ferreira do Christian Doppler Laboratory for Allergy Diagnosis and Therapy, University of Salzburg, Austria

Particularmente a hemoglobina trHb1 necessitou do suplemento de ácido δ -aminolevulinato (500 μ M) e FeCl^3 (200 μ M) para a produção do grupamento heme. Estes componentes foram adicionados durante o crescimento bacteriano a 0.5 D.O. Após o crescimento as células foram centrifugadas a 5-6000 g por 20-30 min (4°C) e ressuspendidas nos respectivos tampões: Art v 1- NH_4HCO_3 10 mM, NaCl 10 mM, pH 7, 8; Hs-trHb1 e defensinas – fosfato de sódio 20mM, NaCl 500mM, pH 8,0. Todos os tampões continham lisozima a 0,02 mg/mL. As células expressando as defensinas e Hs-trHb1 foram rompidas através de Sonicação (8 ciclos de 30 seg) no gelo, centrifugadas a 6-10000g por 30 min a 4°C) e o sobrenadante adicionado a colunas de níquel (Ni-NTA, Invitrogen). As células contendo Art v 1 foram rompidas por ciclos de congelamento e descongelamento e o sobrenadante adicionado a resina de troca iônica HiTrap SP FF (GE).

Os sobrenadantes dos lisados das proteínas solúveis com cauda de histidinas foram incubados com resinas de afinidade a níquel, lavados (20 mM imidazol) e eluídos com 250 mM de imidazol para a Hs-trHb1 e 800 mM para a SD5. Um segundo passo de purificação foi necessário, onde a defensina SD5 foi purificada através de uma coluna de fase reversa C_8 PRP-3 (Hamilton) e eluídas através de um gradiente linear de acetonitrila (10-45 %) a um fluxo de 2 ml/min. A proteína pura foi secada à vácuo e guardada a -20°C. Para a Hs-trHb1, o segundo passo de purificação foi adicionar a fração eluída a partir da coluna de níquel à coluna de gel-filtração Superdex 75.

A Art v 1 foi eluída da coluna de troca iônica HiTrap SP FF através de um gradiente de 0 a 1M de NaCl em tampão acetato 50 mM a pH 5.35. As frações puras foram secadas e guardadas a -20°C. A pureza de todas as proteínas foi inicialmente checada através de géis SDS-PAGE (16-18%) corados com Coomassie Brilliant blue R-250.

2.1 Re-novelamento das defensinas SD1, SD3 e SD6 de cana-de-açúcar

Os precipitados celulares foram ressuspendidos em tampão A (fosfato de sódio 50mM pH 7,4, NaCl 300 mM e fluoreto de fenil-metil-sulfonila 1 mM e 2-mercaptoetanol 12.4 mM) e lisados por sonicação. Os corpos de inclusão foram isolados por centrifugação (15000g, 15 min a 4°C), solubilizados em tampão B (fosfato de sódio

50 mM pH 7, 4, NaCl 300 mM, Imidazol 20 mM e hidrocloreto de guanidina 6M) e incubados com a resina de afinidade a níquel Ni-NTA. Um re-novelamento na coluna foi realizado de acordo com Veldkamp et al. (2007). Após 30 min de incubação, a coluna foi lavada com um tampão detergente (Tris 20 mM, pH 8, NaCl 100 mM, 1% Triton X-100 (v/v) e 2-mercaptoetanol 10 mM), com um tampão oxidante (Tris 20 mM, pH 8, NaCl 100 mM, β -ciclodextrina 5 mM, Glutathiona reduzida 1 mM e 0,5 mM de glutathiona oxidada), com Tris 20 mM, pH 8, NaCl 500 mM e, posteriormente, eluída com Hepes 25 mM, pH 6.4, NaCl 300 mM e Imidazol 800 mM). O passo seguinte de purificação foi idêntico ao realizado para a SD5.

3. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Os experimentos unidimensionais foram realizados a 298K em espectrômetros Bruker Avance de 600 e 400 MHz. Para experimentos multidimensionais um espectrômetro Bruker Avance III de 800MHz também foi utilizado. Todos os espectrômetros são equipados com sondas de tripla ressonância de 5 mm.

As amostras (0.4 - 1.2 mM) foram preparadas em 10 ou 100% D₂O em tampão fostato 5 e 20 mM a pH 4 e 7.5 para as defensinas e Hs-trHb1, respectivamente, ou em acetato 10mM no caso da Art v 1. Os experimentos multidimensionais: ¹⁵N-HMQC (1024 x 320 pontos, oitos *scans*) obtido para SD5; e o ¹³C-HMQC (1024 x 80 pontos, 11k *scans*) ¹⁵N-HSQC (1024 x 512 pontos, 64 *scans*) e NOESY para Hs-trHb1 foram coletados através de States-TPPI para detecção por quadratura na dimensão indireta. Taxas de repetições de 0,3 a 1,2 s foram utilizadas. Para experimentos de dependência do deslocamento químico em função da temperatura, o intervalo medido foi de 283-323K.

3.1 Assinalamento das frequências de ressonância do alergeno Art v 1

Os dados de RMN foram adquiridos a 298K e os deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono foram referenciados ao DSS. Os deslocamentos químicos de ¹⁵N foram referenciados usando as taxas de frequência absoluta segundo Whishart et al. (1995). Um conjunto de experimentos de tripla ressonância (HNCACB, HNCACB(CO)NH, HCC(CO)NH) foi coletados para o assinalamento da cadeia

principal da Art v 1. As cadeias laterais foram assinaladas usando os seguintes experimentos: HBHA(CBCA(CO)NH, 3D H(CC)(CO)NHTOCSY e ^{15}N - 3D TOCSY-HSQC. Os assinalamentos foram confirmados e completados com experimentos de ^{15}N NOESY-HSQC (tempo de mistura de 120 ms) e ^{13}C -NOESY-HSQC (tempo de mistura de 120 ms). O assinalamento das prolinas se deu através de correlações intra e inter-resíduais das ressonâncias $^1\text{H}\alpha/^{13}\text{C}\alpha$ e ^{15}N obtidas pelos experimentos (HCAN e NCACON - Kanelis et al., 2000). Todos os espectros foram processados usando o programa Topspin 2.0 e analisados através do programa CARA 1.8.4 (Keller, 2004).

3.2 Determinação da estrutura da Art v 1

Os espectros ^{13}C -NOESY-HSQC (120 ms) e ^{15}N -NOESY-HSQC (120ms) foram usados para coletar as informações de restrição de distância durante o cálculo da estrutura 3D da Art v 1. Os assinalamentos de correlação-cruzada dos NOESY foram realizados de forma semi-automática através do módulo ATNOS/CANDID do programa Unio08 (Herrmann et al., 2002). O cálculo das estruturas foi feito através do programa CYANA 2.1 (Gunter et al., 1997) utilizando o protocolo de anelamento simulado (simulated annealing) com dinâmica molecular torcional. Um total de 100 confômeros randômicos foram anelados em 10000 passos com 7 ciclos. Após o ciclo final, as vinte estruturas de menor *target function* foram selecionadas para representar a Art v 1. A partir dos deslocamentos químicos da Art v 1, ângulos de diedro adicionais foram preditos pelo programa TALOS (Cornilescu et al., 1999) e utilizados como restrições ao cálculo. As estruturas foram validadas através do programa Procheck-NMR versão 3.5.4 (Laskowski et al., 1996). Todos os espectros foram processados usando o programa Topspin 2.0 e analisados pelo CARA 1.8.4 (Keller, 2004).

3.3 Dinâmica da cadeia principal da Art v 1

Os experimentos de relaxação de nitrogênio ^{15}N foram realizados utilizando amostras de Art v 1 marcadas com ^{15}N . Nestes experimentos foram medidas as taxas de relação *spin-rede* (R1), *spin-spin* (R2) e o efeito nuclear Overhauser ($\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N NOE) dos núcleos de ^{15}N da Art v 1. Os valores de R1 foram coletados de forma randômica através de 10 intervalos de tempo de relaxação de 0,05, 0,1, 0,2, 0,3 0,5, 0,7 0,9 1,0 1,2

e 1,5 segundos. Os valores de R2 foram adquiridos de forma randômica nos tempo de relaxação (16,8, 33,6 50,4 67,2 84, 100,8, 117,6 e 134,4 milisegundos). Os dados foram ajustados assumindo um decaimento exponencial da intensidade dos picos. Os experimentos de $\{^1\text{H}\}\text{-}^{15}\text{N}$ NOE foram obtidos através da aquisição de dois espectros, com e sem um período de pré-saturação dos núcleos de hidrogênio com um tempo de 5s entre cada acumulação.

A otimização dos tensores de difusão e a análise por *Modelfree* foram realizadas através do programa TENSOR 2 (Dosset et al. 2000) definindo um modelo de movimentos para a Art v 1. A estimativa do tempo de correlação rotacional global τ_c foi obtida a partir dos dados de relaxação R2/R1, onde estes encontravam-se dentro de um desvio padrão em relação a média de R2/R1 para o domínio defensiva (1-56). Além disso, os valores obtidos acima de 0,65 para $\{^1\text{H}\}\text{-}^{15}\text{N}$ NOE foram descartados nesta primeira análise (Farrow et al. 1994). Os resultados sugeriram que o tombamento em solução da Art v 1 é anisotrópico, com D_{xx} , D_{yy} e D_{zz} assumindo valores relativos de 0,85:0,80:1,00 e τ_c de $5,87 \pm 0,02$ ns. A análise também mostrou que há significância estatística diferenciando o modelo anisotrópico do simétrico.

Os dados de relaxação foram interpretados usando o formalismo *Modelfree* de Lipari-Szabo (Lipari and Szabo, 1982a, b) modificado por Clore et al. (1990). As análises consideram 5 modelos de formas semi-empíricas da função de densidade espectral, nas quais cada uma representa termos que descrevem o movimento do vetor N-H da ligação amídica da proteína. Assume-se com estes modelos que os movimentos internos ocorrem em duas escalas de tempo, uma rápida e outra lenta. Estas escalas são caracterizadas por tempos de correlação, τ_f e τ_s (onde $\tau_f \ll \tau_s \ll \tau_c$) e o parâmetro de ordem S^2 é igual a S_f^2 e S_s^2 . Define-se nesta situação que o parâmetro de ordem como S^2 será igual a $S_f^2 * S_s^2$ ($0 \leq S^2 \leq 1$), correspondendo a restrição espacial do vetor N-H. A análise também leva em conta o alargamento de linha devido à troca conformacional, o termo *Rex*. Os dados de relaxação foram então ajustados para estes 5 modelos da tabela abaixo usando o programa TENSOR 2.

Tabela 2: Modelos de dinâmica interna.

<i>Modelo</i>	<i>Parâmetro</i>
1	S^2
2	S^2, τ_e
3	S^2, Rex
4	S^2, τ_e, Rex
5	$S^2_{f_i}, S^2_{s_i}, \tau_e$

4. Análise da Art v 1 nativa por RMN

Extratos de pólen de *Artemisia vulgaris* foram preparados para purificar a proteína nativa da Art v 1 através de coluna de troca iônica (CM Sepharose CL-6B – Amersham Biosciences) seguindo o protocolo de Himily et al. (2003). Frações contendo a proteína nArt v 1 foram reunidas e dializadas contra água destilada. Alíquotas foram secadas à vácuo e guardadas a -20°C ². A proteína nativa foi suspensa em 10% D₂O e espectros ¹³C – HSQC (10K *scans*) medindo a abundância natural de carbono foram coletados em um espectrômetro de 800 MHz.

5. Purificação de IgE policlonal e interação com Art v 1

Cinquenta pacientes austríacos alérgicos a pólen de *Artemisia vulgaris* foram selecionados com base em seus históricos clínicos. Estes pacientes apresentaram reação positiva para o teste de contato da pele e, também, para o teste de detecção de IgE *in vitro* (CAP system, Phadia AB, Uppsala, Suíça). Os experimentos realizados com amostras de sangue de pacientes foram aprovados previamente pelo Comitê de Ética da

² Trabalho realizado em colaboração com a prof. Fátima Ferreira do Christian Doppler Laboratory for Allergy Diagnosis and Therapy, University of Salzburg, Austria.

Universidade Médica e pelo Hospital Geral de Viena (n° EK497/2005). Os anticorpos policlonais foram purificados de soro de pacientes de acordo com Dedic et al. (2009).³

O estudo da interação entre Art v 1 e os anticorpos policlonais foi realizado utilizando-se 2 µM de IgEs purificados de pacientes alérgicos como descrito. Os anticorpos foram concentrados e tubos concentradores (Amicon) até o volume de 300 µL para atingir o volume do tubo de RMN. O alérgeno Art v 1 foi titulado à IgE usando diferentes concentrações de 10 a 150 µM. A interação foi monitorada através de experimentos ¹⁵N-HSQC e o desvio do deslocamento químico em relação a amostra controle foi representado em um gráfico em função ao número de aminoácidos da proteína. Os desvios foram avaliados de acordo com a equação abaixo:

$$\Delta\delta = [(\Delta^{\text{NH}})^2 + (\Delta^{\text{N}}/10)^2]^{1/2}$$

Onde Δ^{NH} e Δ^{N} são as diferenças de deslocamento químico em ppm observadas para as ressonâncias dos núcleos de hidrogênio e nitrogênio amídicos, respectivamente.

6. Dicroísmo Circular

Os espectros de dicroísmo circular foram medidos a 293K usando um espectropolarímetro JASCO J-715 e células de caminho ótico de 0.1 e 0.2 cm. Foram utilizados a velocidade de aquisição de 50 nm/min e os intervalos de resolução de 0.1 nm. A faixa de varredura espectral foi de 190 a 260 nm, sendo que cada medida foi adquirida de 2-5 vezes e o resultado final corresponde à média destas medidas. Um espectro referente ao tampão foi descontado de todas as medidas. As defensinas foram suspensas em fosfato de sódio 5 mM a pH 4 em uma concentração de 16 µM e a Hs-trHb1 foi medida a 10 µM em tampão fosfato a pH 7.5.

7. Espectrometria de massas

³ Trabalho realizado em colaboração com a prof. Fátima Ferreira do Christian Doppler Laboratory for Allergy Diagnosis and Therapy, University of Salzburg, Austria.

As proteínas foram analisadas por MALDI-TOF Pro (Applied Biosystems). As amostras de defensinas foram misturadas ao ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico contendo 50% (v/v) de acetonitrila e 0.1% (v/v) de ácido trifluoroacético. Os espectros foram adquiridos no modo direto e reflectivo ⁴. Para a Hs-trHb1, uma digestão trípica em gel de poliacrilamida foi realizada usando 5 μ g de proteína e posteriormente analisada em procedimento semelhante às defensinas.

8. Espectroscopia de UV-visível

Espectros foram coletados de 220-700 nm para a proteína Hs-trHb1 usando um espectrofotômetro JASCO a 296K em tampão fosfato pH 7.5. A condição reduzida da proteína foi obtida através da adição de ditionito de sódio após 10 min em gás nítrógeno. A forma ligada a monóxido de carbono foi obtida após saturação por 10 min com CO puro (99,9%). Titulações de pH foram medidas através de espectrofotometria e RMN para a proteína Hs-trHb1. Variou-se o pH de 6 a 8, com tampão fosfato e a pH 9 e 10 mantido com glicina, todos a 100 mM de concentração. Foram coletados espectros de 350 a 700 nm e a absorbância a 630 nm foi medida. Além disso, utilizamos RMN 1D (unidimensional) para avaliar cada medida de pH.

8.1. Decomposição de peróxido de hidrogênio

Com objetivo de testar a reatividade do grupo heme da proteína Hs-trHb1, realizamos testes de decomposição de peróxido de hidrogênio. Hemina (cloreto de ferriprotoporfirina IX) e hemoglobina bovina foram obtidas da empresa Sigma. A hemina foi dissolvida em 0.1 M NaOH e sua concentração foi determinada usando $\epsilon = 558.4$ mM a 390 nm (valor para o dímero do heme). A concentração das moléculas testadas foi de 10 μ M e foram adicionados 400 μ M de H₂O₂ para iniciar a reação de oxidação do heme. Em seguida, espectros foram coletados varrendo os comprimentos de onda de 300 a 600 nm em intervalos de tempo de 0,5, 3, 6 e 10 min. As bandas de Soret a 390, 406 e 408 nm foram monitoradas para cada molécula (hemina, Hemoglobina bovina e Hs-trHb1, respectivamente) (Grinverg et al. 1999).

⁴ Experimentos realizados através da *facility* encontrada no Instituto de Biofísica da UFRJ.

9. Determinação do peso molecular em solução por filtração em gel

A massa molecular aproximada da proteína foi estimada através de filtração em gel utilizando a coluna Superdex 75 HR 10/30 (Amersham-Pharmacia) conectada ao um sistema de cromatografia líquida de alta performance (Shimadzu). A coluna foi equilibrada com fosfato 20 mM, NaCl 300 mM, pH 7.4 e calibrada com as seguintes proteínas: BSA (66 KDa), anidrase carbônica com 29,0 KDa e lisozima (14,4 KDa). As proteínas foram eluídas com o mesmo tampão e as frações foram analisadas por SDS-PAGE.

10. Modelagem Molecular

O modelo estrutural da proteína Hs-trHb1 foi gerado através do program ProModII do SWISS-MODEL (modo automático de modelagem de proteínas desenvolvido na GlaxoSmithKline na Suíça). A sequência completa de aminoácidos da proteína foi submetida ao SWISS-MODEL (<http://www.expasy.ch/swissmod/SWISS-MODEL.html>) e sua qualidade foi avaliada automaticamente.

11. Teste de atividade antimicrobiana

Os testes de atividade antifúngica foram realizados através de placas de 96 poços de microespectrofotometria (Almeida et al. 2000). Diluições seriadas das proteínas foram feitas contendo a suspensão do esporo do fungo a ser avaliado em uma concentração de 10^4 esporos/ml. Os fungos foram cultivados em dextrose de batata (Difco) suplementada com extrato de levedura (2g/l), Peptona bacteriológica (Inlab) e Glicose D(+) (Merck). As misturas foram incubadas a 25°C por 36 h. A atividade antifúngica foi avaliada através da comparação do valor da D.O a 540 nm entre culturas de fungos com a incubação com as proteínas e culturas controle. Um controle positivo também foi feito utilizando a proteína Psd1 (Almeida et al. 2001). Todos experimentos foram feitos em triplicata ⁵.

⁵ Os testes antifúngicos foram realizados em colaboração com a prof. Eleonora Kurtenbach do Instituto de Biofísica da UFRJ)

Testes antibacterianos foram realizados através da metodologia de difusão radial, medindo a zona de inibição (Laher et al. 1991). As bactérias alvo foram crescidas em fase estacionária em meio de cultivo BHI (Difco) e colocadas em placas de petri. As proteínas (5-50 μM em tampão fosfato 5 mM pH 4 filtrado e esterilizado) foram adicionadas a poços feitos na superfície da placa e incubadas a 37°C. Após 16h as zonas de inibição foram medidas. O antibiótico ampicilina foi usado como controle positivo. Experimentos independentes foram testados pelo menos duas vezes para cada bactéria.

Nestes ensaios foram testados os seguintes microorganismos: bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Kocuria rhizophila* e *Bacillus megaterium*); bactérias gram-negativas (*Escherichia coli*) e os fungos (*Aspergillus niger*, *Fusarium solani* e *Neurospora crassa*).

RESULTADOS

PARTE I

Estudos estruturais do alérgeno Art v 1

Esta parte da Tese reuni todos os dados estruturais e de interação do alérgeno Art v 1, organizados em dois trabalhos: O primeiro trabalho corresponde ao assinalamento das frequências de ressonâncias ^1H , ^{15}N , ^{13}C do alérgeno (submetido a revista *Biological NMR Assignments*), e segundo, corresponde a resolução da estrutura, dinâmica e interação com IgE do Art v 1 (Manuscrito em preparação).

O Art v 1 é a principal proteína responsável pelas reações alérgicas a planta *Artemisia vulgaris*. É uma proteína de 108 aminoácidos que apresenta alta homologia na porção 1-56 com a família das defensinas de plantas. Além do domínio defensina, a Art v 1 apresenta um segundo domínio (predito como uma região estendida) com 21 prolínas, muitas delas formando seqüências em série de poliprolínas. Para realizar o assinalamento destas seqüências poliprolínas, utilizamos a seqüência de pulso HCAN e HCACON, pouco usuais no assinalamento de proteínas. Estas seqüências de pulso mostraram-se bastante eficazes para Art v 1 e somente dois resíduos de prolina não puderem ser assinalados. Nossos dados indicam que a Art v 1 apresenta elementos de estrutura secundária típicos do enovelamento α/β de defensinas. O domínio rico em prolínas apresenta indicativos de que não é totalmente flexível (trabalho submetido à *Biological NMR Assignments*).

Os processos alérgicos envolvem a participação de diversas células especializadas e a produção de anticorpos IgE que reconhecem os antígenos. A identificação dos epitopos de ligação a IgE é, portanto, extremamente importante para entender o mecanismo de alergenidade. Para avaliar os sítios específicos de ligação a IgE, resolvemos a estrutura, estudamos a dinâmica e mapeamos as superfícies de interação com IgE do alérgeno Art v 1. A estrutura 3D apresentou um domínio bem estruturado com enovelamento α/β de defensina e uma região estruturada na porção inicial do domínio de prolínas. Os dados de dinâmica mostram que esta região apresenta movimentos internos mais restritos e alguns resíduos apresentam troca conformacional. O restante do domínio de prolínas apresentou poucas restrições de distância indicando maior flexibilidade, corroborado pelos dados de dinâmica. Encontramos superfícies descontínuas envolvendo, principalmente, a porção N-terminal e a parte de ligação entre a porção rica em prolínas e o domínio defensina. Mostramos, também, as diferenças estruturais entre a proteína nativa (glicosilada) e a recombinante. Além das grandes modificações nas prolínas glicosiladas na proteína nativa, observamos diferenças significativas no domínio defensina. Estas regiões da Art v 1 foram mapeadas como

locais de interação com IgE e podem explicar as diferenças de reatividade mostradas por alguns pacientes. Acreditamos que os dados deste trabalho podem efetivamente contribuir para o desenvolvimento de vacinas hipoalergênicas (Manuscrito em preparação).

1. Assinalamento das frequências de ressonância do alergeno Art v 1 (Artigo submetido a revista *Biological NMR Assignments*)

Sequence-specific ^1H , ^{15}N and ^{13}C resonance assignments of Art v 1: a proline-rich allergen of *Artemisia vulgaris* pollen

Guilherme Razzera^a, Gabriele Gadermaier^b, Marcius S. Almeida^a, Fatima Ferreira^c, Fabio C.L. Almeida^a & Ana Paula Valente^{a,*}

^a *Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Bioquímica Médica, Rio de Janeiro, Brasil;*

^b *Christian Doppler Laboratory for Allergy Diagnosis and Therapy, University of Salzburg, Austria.*

Key words: Art v 1, NMR assignments, proline-rich allergen, Defensin-like

Abstract

Art v 1 is the major allergen of *Artemisia vulgaris*. The IgE raised against Art v 1 not only can cross-react with other proteins from the Asteraceae family members but also with components of various forms of food. Art v 1 is an important target for immunotherapy strategies, including vaccination with hypoallergenic derivatives or chimeras. We report the ^1H , ^{13}C , and ^{15}N resonance assignments of the recombinant Art v 1 and identification of secondary structures based on ^{13}C chemical shifts.

Biological context

Allergens are proteins able to stimulate inappropriate IgE production in atopic individuals leading to clinical manifestation such as asthma, rhinitis and atopic dermatitis (Akdis, 2006). To date, allergen immunotherapy is the only treatment that provides long-term clinical benefits. Novel strategies for development of allergen vaccines include the generation of low-affinity IgE-binding molecules (Wallner et al. 2007, Wild et al. 2007). Therefore, allergens structural determination is a crucial step for the understanding of the molecular interactions between the allergen cells of the immune system, the development of allergen therapeutics and the biological function of the protein in the pollen.

Pollen of *Artemisia vulgaris* (mugwort) is one of the main causes of allergic reactions in late summer and autumn in Europe, parts of Asia and North America (Himly et al 2003). More than ninety-five percent of mugwort pollen-allergic individuals are sensitized to Art v 1, the major allergen in mugwort pollen.

Several other members of the Asteraceae, a family of flowering plants, can lead to clinically significant cross-reactions due to structural similarities between allergens (Bauer et al. 1996; Schmid-Grendelmeier et al 2003). Natural Art v 1 is a 108 aa secreted protein and primary sequence analysis suggests that it is formed by two domains: a defensin-like and a proline-rich domain (Himly et al. 2003). Art v 1 shows similarity between ESTs recently sequenced from *Lactuca serriola* (DW116026, BU012812), *Cichorium intybus* (EH71010), *Taraxacum officinale* (DY835145) and *Helianthus annuus* (DY929461), all from Asteracea family (www.ncbi.nlm.nih.gov). The defensin domain reaches similarity values of 80 % while the whole protein sequence exhibits scores around 60 %.

Here we present, as the first step in the NMR structural analysis, the sequence-specific ^1H , ^{13}C , and ^{15}N resonance assignments of recombinant Art v 1 and secondary structure elements based on ^{13}C chemical shift. Remarkably, proline-rich domain was almost fully assigned.

Methods and Experiments

The Art v 1 mature sequence (accession number AF493943) was cloned into pHis parallel2 vector (Sheffield 1999; Dedic et al 2008), using NdeI and XhoI restriction sites to produce a non-fusion protein. Recombinant Art v 1 was over-expressed in *Escherichia coli* RosettaGami B (DE3) pLysS in minimal media (Silantes) with ^{13}C -labeled glucose and ^{15}N -labeled ammonium chloride, supplemented with 50 $\mu\text{g/ml}$ ampicillin. Cells were grown at 37°C to an optical density at 600 nm of 0.7, protein expression was induced with 0.4 mM IPTG and carried out at 20°C for 22 hours. The cells were harvested and dissolved in 10 mM NH_4HCO_3 pH 7.8, 10 mM NaCl, incubated with lysozyme (0.02 mg/ml) and disrupted with repeated cycles of freeze and thaw.

The rArt v 1 protein was purified with a cation exchange chromatography using a HiTrap SP FF column with 50 mM sodium acetate pH 5.35 as initial condition and eluted in a gradient mode from 0 to 1 M sodium chloride. The purified fractions were desalted with a NAP-25 column, freeze-dried and stored at -20°C.

NMR samples (1.0–1.2 mM) of purified isotopically labeled (^{15}N or ^{15}N , ^{13}C) Art v 1 were prepared in 10 mM sodium acetate pH 5.5 containing 10 % D_2O and 0.03 % sodium azide. These conditions were found to be optimal for the combination of sample stability and spectra quality.

NMR spectroscopy

NMR data were acquired at 298 K using Bruker Avance DRX 600 or Avance III 800 spectrometers equipped with a three-axis gradient 5 mm triple resonance probe. Proton and ^{13}C chemical shifts were referenced to DSS, whereas the ^{15}N was referenced using the absolute frequency ratios (Wishart et al. 1995). A set of 3D triple-resonance HNCACB, HNCACB(CO)NH, HCC(CO)NH spectra were collected for the sequential backbone resonance assignments. Side-chain resonance assignments have been achieved using the following experiments: HBHA(CBCA)(CO)NH, 3D H(CC)(CO)NHTOCSY, and ^{15}N -edited 3D TOCSY-HSQC. The assignments were confirmed and completed with ^{15}N -edited NOESY-HSQC (120 ms mixing time) and ^{13}C -edited NOESY-HSQC spectra (120 ms mixing time). Proline sequential resonance assignments of Art v 1 was obtained using the correlations of intra- and inter-residual $^1\text{H}\alpha/^{13}\text{C}\alpha$, ^{15}N resonances (HCAN/NCACON, Kanelis et al. 2000). All spectra were processed using Topspin 2.0 and analyzed using CARA 1.8.4 (Keller 2004).

Assignments and data deposition

The ^1H - ^{15}N HSQC spectrum of Art v 1 pH 5.5 and 298 K is shown in Figure 1. Art v 1 resonances show two distinct properties in the spectrum: well dispersed peaks (in black), related to the defensin domain and less dispersed ones (in red) related to the C-terminal proline-rich region. The resonances from the C-terminal were grouped close to random coil chemical shift, although a clear definition of most of the peaks could be observed. These features were observed in all spectra recorded. Despite the smaller

chemical shift dispersion, almost all residues of Art v 1 were assigned (98 %) both in the defensin and proline-rich domains, reaching a completeness value of 90 %. Unassigned systems were: two proline residues (79 and 102) could not be unambiguously assigned due to overlap; the amide proton of Cys17 was not observed, probably due to line broadening and some aromatic atoms of histidines could not be assigned: His34 (HE, HD1, CE1 and CG), His38 (HE2, HD1 and CG) and His108 (HD, HE, CG, CD and CE).

The ^1H - ^{15}N HSQC spectrum show that some peaks from the C-terminal region were duplicated, probably due to cis-trans isomerization of the adjacent prolines (Gly59, Ala63, Ala68, Asp82, Ser101) indicated by red circle and arrow in Figure 1. Remarkably, the majority of the prolines in the C-terminal tail are predominantly in trans-conformation. Only Pro103 and Pro95 are mainly in cis-conformation. The chemical shifts have been deposited in the BioMagRes- Bank (<http://www.bmrb.wisc.edu>) under the accession number 16111.

Identification of regular secondary structures from the ^{13}C chemical shifts.

The deviation of the experimental C^α and C^β chemical shifts from random coil values was used to identify possible secondary structure elements (ΔC^α or $^\beta$). Figure 2A shows the values of ΔC^α minus ΔC^β obtained for each residue and panel B shows the results obtained with the software CSI (Wishart and Sykes 1994). Positive values of the difference between ΔC^α and ΔC^β are indicative of α -helix and are clearly recognized between residues 19 to 28, in accordance to CSI results. Three regions showed high negative values of ΔC^α minus ΔC^β that are indicative of beta strands (residues 5-8; 37-39; 44-51). All these regions belong to the defensin domain.

Preliminary analysis of the NOEs and relaxation data suggested that part of the C-terminal is not completely flexible (data not shown). Full analysis of the data will be published in the future.

Acknowledgments This work was supported by the CNPq, MCT, FINEP, FAPERJ and Millennium Institute for Structural Biology in Biomedicine and Biotechnology.

References

- Akdis C (2006) Allergy and hypersensitivity mechanism of allergic disease. *Curr Opin Immunol* 18: 718-726.
- Bauer L, Ebner C, Hirschwehr R, Wüthrich R, Pichler C, Fritsch R, Scheiner O, Kraft D (1996) IgE cross-reactivity between birch pollen, mugwort pollen and celery is due to at least three distinct cross-reacting allergens: immunoblot investigation of the bichmugwort- celery syndrome. *Clin Exp Allergy* 26: 1161-1170.
- Cornilescu G, Delaglio F, Bax A (1999) Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology. *J Biomol NMR* 13:289-302.
- Dedic A, Gadermaier G, Vogel L, Ebner C, Vieths S, Ferreira F, Egger M (2008) Immune recognition of novel isoforms and domains of the mugwort pollen major allergen Art v 1. *Mol Immunol* in press.
- Wishart DS, Sykes BD (1994) The ¹³C chemical-shift index: a simple method for the identification of protein secondary structure using ¹³C chemical-shift data. *J Biomol NMR* 4:171-80.
- Kanelis V, Donaldson L, Muhandiram DR, Rotin D, Forman-Kay JD, Kay LE (2000) Sequential assignment of proline-rich regions in proteins: application to modular binding domain complexes. *J Biomol NMR* 16:253-9.
- Keller R (2004) *The Computer Aided Resonance Assignment Tutorial* first edition, ISBN 3-85600-112-3, CANTINA Verlag.
- Sheffield P, Garrard S, Derewenda Z (1999) Overcoming expression and purification problems of RhoGDI using a family of "parallel" expression vectors. *Protein Expr Purif* 15:34-9.
- Schmid-Grendelmeier P, Holzmann D, Himly M, Weichel M, Tresch S, Rückert B, Menz G, Ferreira F, Blaser K, Wüthrich B, Cramer R (2003) Native Art v 1 and recombinant Art v 1 are able to induce humoral and T cell-mediated in vitro and in vivo responses in mugwort allergy. *J Allergy Clin Immunol* 111:1328-36.
- Wallner M, Stöcklinger A, Thalhamer T, Bohle B, Vogel L, Briza P, Breiteneder H, Vieths S, Hartl A, Mari A, Ebner C, Lackner P, Hammerl P, Thalhamer J, Ferreira F (2007) Allergy multivaccines created by DNA shuffling of tree pollen allergens. *J Allergy Clin Immunol* 120:374-80.
- Himly M, Jahn-Schmid B, Dedic A, Kelemen P, Wopfner N, Altmann F, van Ree R, Briza P, Richter K, Ebner C, Ferreira F (2003) Art v 1, the major allergen of mugwort pollen, is a modular glycoprotein with a defensin-like and a hydroxyproline-rich domain. *FASEB J* 17:106-8.

-Wishart DS, Bigam CG, Yao J, Abildgaard F, Dyson HJ, Oldfield E, Markley JL, Sykes BD (1995) ^1H , ^{13}C and ^{15}N chemical shift referencing in biomolecular NMR. *J Biomol NMR* 6:135-40.

-Wild C, Wallner M, Hufnagl K, Fuchs H, Hoffmann-Sommergruber K, Breiteneder H, Scheiner O, Ferreira F, Wiedermann U (2007) A recombinant allergen chimer as novel mucosal vaccine candidate for prevention of multi-sensitivities. *Allergy* 62:33-41.

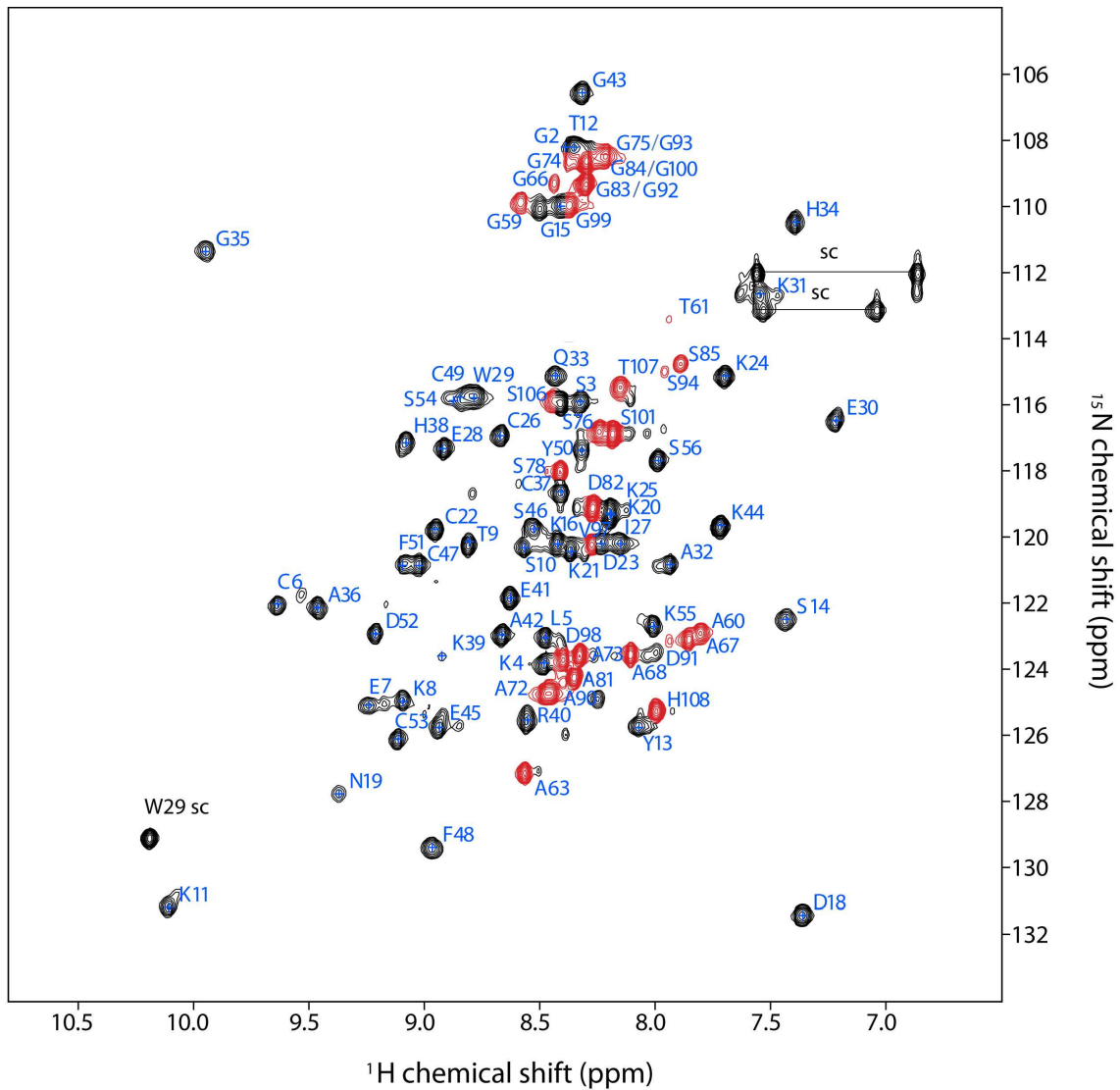


Figure 1: ^1H - ^{15}N HSQC spectrum of uniformly [^{13}C , ^{15}N]-labeled Art v 1 recorded in a Bruker Avance III 800 MHz and pH 5.5 at 298 K. Number correspond to residue numbers in Art v 1 primary sequence. Horizontal lines connect the side-chains of Asn19 and Gln33. The spectrum shows two distinct groups of peaks: one well dispersed, related to the defensin domain and less dispersed ones related to the C-terminal proline-rich region. Residues Gly59, Ala63, Ala68, Asp82 and Ser101 are doubled probably due to proline isomerization (indicated by red arrows and circles).

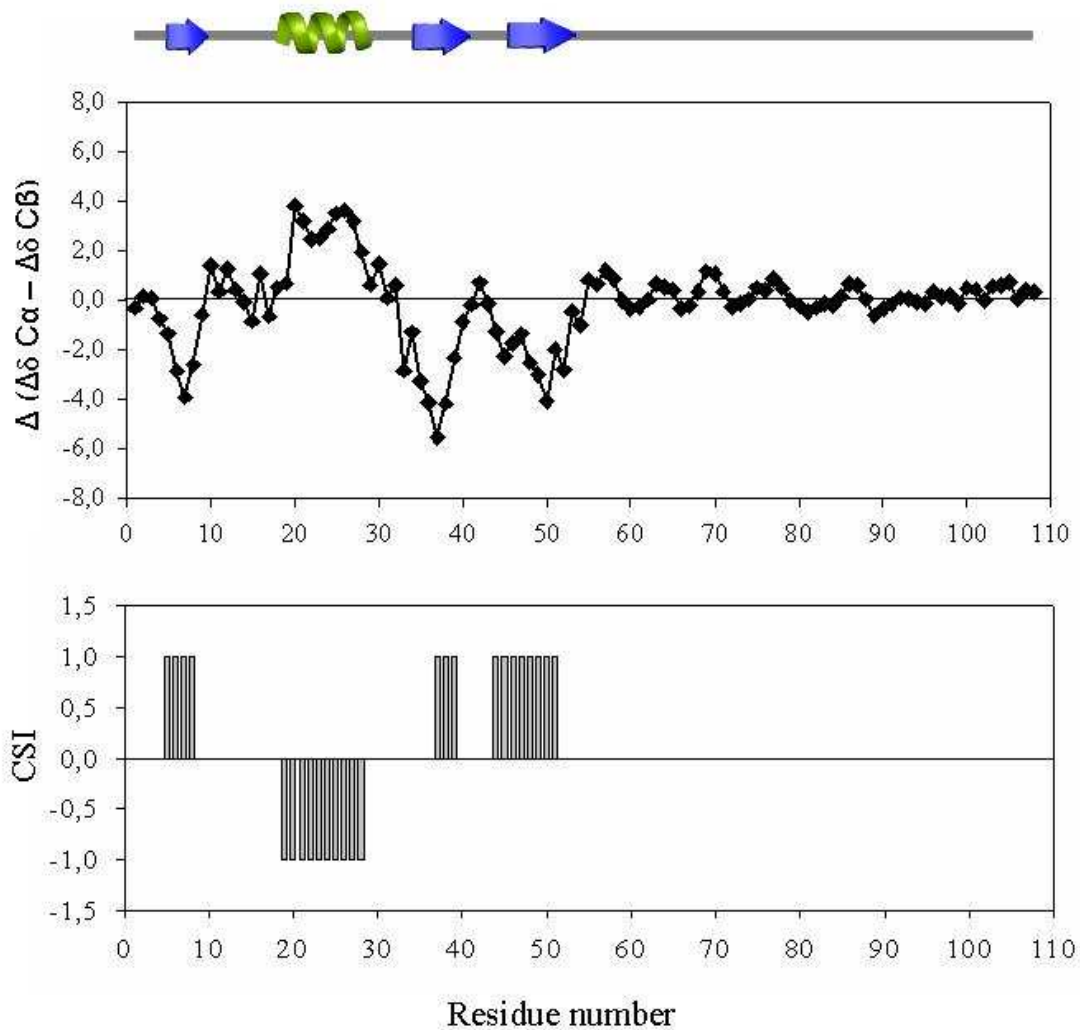


Figure 2: Deviation of experimental of chemical shift with random coil values. A- The difference in chemical shift between ΔC^{α} and ΔC^{β} carbons is presented for each residue. The region between residue 19-28 show positive values of $C\alpha$ minus $C\beta$ that is indicative of α -helix. Three other regions (5-8; 34-38; 45-51) show negative values that are indicative of beta strand. All these regions belong to the defensin domain and are confirmed by the software CSI (Wishart and Sykes 1994).

2. Estrutura, dinâmica e interação com IgE do alérgeno Art v 1 (Manuscrito em preparação)

ESTRUTURA E DINÂMICA EM SOLUÇÃO DO ALÉRGENO Art v 1 DE PÓLEN DE *Artemisia vulgaris*: MAPEANDO A INTERAÇÃO COM IgE

Guilherme Razzera ^a, Gabriele Gadermaier ^b, Marcius S. Almeida ^a, Fatima Ferreira ^c, Fabio C.L Almeida ^a & Ana Paula Valente^{a,*}

^a *Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Bioquímica Médica, Rio de Janeiro, Brasil;*

^b *Christian Doppler Laboratory for Allergy Diagnosis and Therapy, University of Salzburg, Austria.*

Palavras chave: Art v 1, Estrutura em solução, Dinâmica, Defensin-like, Poliprolina, Interação com IgE.

INTRODUÇÃO

A alergia, ou hipersensibilidade tipo I, é uma resposta inflamatória sistêmica caracterizada pela presença de anticorpos IgE específico no soro. As reações alérgicas envolvem a estimulação de células Th2-alérgeno-específicas para a produção de mediadores inflamatórios como a histamina (Venarske e deShazo 2003), causando, a partir da resposta mediada por IgE, doenças como asma, rinite e dermatites atópicas (Larché e Wraith, 2005). As estimativas prevêm que mais de 25% da população de países industrializados sofrem com sintomas alérgicos mediados por IgE (Valenta R 2002). Sabe-se que anticorpos IgE alérgeno-específicos são as principais moléculas envolvidas na resposta imune aos alérgenos. Por isso muitos estudos têm focado na identificação de epítopos de ligação a IgE (epítopos de célula B) (Tanabe, 2007). Até o momento, técnicas de mapeamento de epítopos têm focado a busca de epítopos lineares e sequenciais (Trevino et al., 2004), mas não obtiveram sucesso na identificação de epítopos descontínuos ou conformacionais. Um número limitado de estruturas representando alérgenos de vias aéreas é conhecido. As similaridades de seqüências e nas estruturas 3D das proteínas alérgênicas oferecem importantes pistas para identificarmos reações cruzadas de IgE clinicamente relevantes. Entretanto, apenas

5% de todas os alergenios catalogados no SDAP (Structural Database of Allergenic Proteins) possuem estruturas 3D disponíveis no banco de dados PDB (Protein Data Bank) (Oezguez et al., 2008). A determinação da estrutura 3D de alergenios permite a identificação de aminoácidos expostos ao solvente que constituem a superfície molecular e permitem a identificação de resíduos de epitopos de células B.

Os alergenios são geralmente proteínas de diferentes fontes, incluindo gramíneas, pólen, alergenios *indoor* como ácaros de poeira doméstica e animais, e vários alimentos (Tanabe, 2007). Uma dessas proteínas encontradas no pólen de *Artemisia vulgaris* é a causa principal de alergias a pólen típicas de final de verão e outono na Europa. Esta erva da família Asteraceae, amplamente distribuída, é encontrada predominantemente em regiões temperadas e úmidas do hemisfério norte e ao longo do Mar Mediterrâneo (Futin et al., 1976). Mais de 95% dos pacientes alérgicos a esta planta reagem ao alergenio do pólen chamado Art v 1. Este alergenio é uma glicoproteína com peso molecular aparente de 24 a 28 KDa (Himily et al., 2003). O padrão de glicosilação da Art v 1 ligado à hidroxiprolinas é único, chamado de arabinogalactana tipo III. Este novo tipo é formado por centros β 1,6-galactana, os quais são substituídos por um número variável (5–28) de resíduos de α -arabinofuranose, formando cadeias laterais ramificadas com 5-, 2,5-, 3,5-, e arabinoses 2,3,5-substituídas. Um Segundo tipo de glicosilação encontrada é composta por simples β -arabinofuranoses (Leonard R et al., 2004). O envolvimento das glicosilações da Art v 1 na alergenicidade não foi totalmente esclarecido, mas sabe-se que a Art v 1 nativa e recombinante exibem pequenas diferenças na capacidade de ligação à IgE (Himily et al., 2003). Recentemente, Dedic et al. (2009) mostraram que o epitopo relevante para ligação à IgE está localizado no domínio defensina, o que sugere o baixo envolvimento dos carboidratos na alergenicidade da proteína nativa. O epitopo de reconhecimento de célula T da Art v 1 compreende a região 25-36 (Jahn-Schmid B et al., 2002), mas os resíduos envolvidos à ligação IgE (epitopo de célula B) ainda não foram identificados.

Este estudo descreve a estrutura tridimensional em solução da Art v 1, principal alergenio de *Artemisia vulgaris*. Esta é a primeira estrutura de um alergenio com enovelamento típico de defensinas. Neste trabalho apresentamos a dinâmica de ^{15}N da cadeia principal do alergenio Art v 1, que nos permitiu identificar os movimentos do domínio defensina e do domínio de prolinas. Mostramos também que a interação IgE-

Art v 1 sugere um epítipo descontínuo de célula B, formado por resíduos na porção N-terminal, no segundo *loop* e na porção intermediária que conecta os dois domínios. De acordo com os dados apresentados, uma troca conformacional na escala de mili a microsegundos é predita, com base na análise dos dados de relaxação de ^{15}N para resíduos envolvidos na interação com IgE. Usando a proteína Art v 1 nativa fomos capazes de identificar resíduos afetados pela glicosilação, que eventualmente podem explicar porque alguns pacientes são menos sensibilizados quando expostos à proteína recombinante. Os dados fornecem informações importantes para o desenvolvimento de vacinas hipoalergênicas para futuros tratamentos imunoterápicos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Expressão e purificação da Art v 1

O alérgeno Art v 1 (número de acesso AF493943) foi subclonado em pHis paralelo2 vector, usando as enzimas NdeI e XhoI produzindo uma proteína livre de seqüências fusão (Sheffield 1999; Dedic et al 2008). A proteína duplamente marcada ($^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$) foi superexpressada em *Escherichia coli* RosettaGami B (DE3) pLysS como descrito por Razzera et al., (2009). As amostras de RMN da Art v 1 isotopicamente marcadas (1.0–1.2 mM) foram preparadas em acetato de sódio 10 mM contendo D₂O a 10% e azida de sódio a 0.03 %. Essas condições foram otimizadas para se obter maior estabilidade e qualidade dos espectros de RMN.

Medidas estruturais e cálculo da estrutura da Art v 1 por RMN

Os espectros de RMN foram adquiridos a 298K usando espectrômetros Bruker Avance 1DRX operando a 600 MHz ou Avance III operando a 800 MHz. Ambos os espectrômetros equipados com sonda de tripla ressonância de 5 mm. Os dados de hidrogênio e carbono foram referenciados ao DSS. Os deslocamentos químicos de ^{15}N foram referenciados usando as taxas de frequência absoluta segundo Whishart et al. (1995). Um conjunto de experimentos de tripla ressonância (HNCACB, HNCACB(CO)NH, HCC(CO)NH) foi coletado para o assinalamento da cadeia principal da Art v 1. As cadeias laterais foram assinaladas usando os seguintes experimentos: HBHA(CBCA(CO)NH, 3D H(CC)(CO)NHTOCSY e ^{15}N -3D TOCSY-HSQC de acordo com Razzera et al., (2009). Os espectros ^{13}C -NOESY-HSQC (120 ms) e ^{15}N -NOESY-HSQC (120ms) foram usados para coletar as informações de restrição de distância durante o cálculo da estrutura 3D da Art v 1. Os assinalamentos de correlação-cruzada dos NOESY foram realizados de forma semi-automática através do módulo ATNOS/CANDID do programa Unio08 (Herrmann et al., 2002). O cálculo das estruturas foi feito através do programa CYANA 2.1 (Gunter et al., 1997) utilizando o protocolo de anelamento simulado (simulated annealing) com dinâmica molecular torcional. Um total de 100 confômeros randômicos foram anelados em 10000 passos com 7 ciclos. Após o ciclo final, as vinte estruturas de menor *target function* foram selecionadas para representar a Art v 1. A partir dos deslocamentos químicos da Art v 1, ângulos de diedro adicionais foram preditos pelo programa TALOS (Cornilescu et al., 1999) e utilizados como restrições ao cálculo. As estruturas foram validadas através do programa Procheck-NMR versão 3.5.4

(Laskowski et al., 1996). Todos espectros foram processados usando o programa Topspin 2.0 e analisados pelo CARA 1.8.4 (Keller, 2004)

Dinâmica da cadeia principal da Art v 1

Os experimentos de relaxação de nitrogênio ^{15}N foram realizados utilizando amostras de Art v 1 marcadas com ^{15}N . Nestes experimentos foram medidas as taxas de relaxação *spin-rede* (R1), *spin-spin* (R2) e o efeito nuclear Overhauser ($\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N NOE) dos núcleos de ^{15}N da Art v 1. Os valores de R1 foram coletados de forma randômica através de 10 intervalos de tempo de relaxação de 0,05, 0,1, 0,2, 0,3 0,5, 0,7 0,9 1,0 1,2 e 1,5 segundos. Os valores de R2 foram adquiridos de forma randômica nos tempo de relaxação (16,8, 33,6 50,4 67,2 84, 100,8, 117,6 e 134,4 milisegundos). Os dados foram ajustados assumindo um decaimento exponencial da intensidade dos picos. Os experimentos de $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N NOE foram obtidos através da aquisição de dois espectros, com e sem um período de pré-saturação dos núcleos de hidrogênio com um tempo de 5s entre cada acumulação.

A otimização dos tensores de difusão e a análise por *Modelfree* foram realizadas através do programa TENSOR 2 (Dosset et al. 2000) definindo um modelo de movimentos para a Art v 1. A estimativa do tempo de correlação rotacional global τ_c foi obtida a partir dos dados de relaxação R2/R1, onde estes encontravam-se dentro de um desvio padrão em relação a média de R2/R1 para o domínio defensina (1-56). Além disso, os valores obtidos acima de 0,65 para $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N NOE foram descartados nesta primeira análise (Farrow et al. 1994). Os resultados sugeriram que o tombamento em solução da Art v 1 é anisotrópico, com D_{xx} , D_{yy} e D_{zz} assumindo valores relativos de 0,85:0,80:1,00 e τ_c de $5,87 \pm 0,02$ ns. A análise também mostrou que há significância estatística diferenciando o modelo anisotrópico do simétrico.

Os dados de relaxação foram interpretados usando o formalismo *Modelfree* de Lipari-Szabo (Lipari and Szabo, 1982a, b) modificado por Clore et al. (1990). As análises consideram 5 modelos de formas semi-empíricas da função de densidade espectral, nas quais cada uma representa termos que descrevem o movimento do vetor N-H da ligação amídica da proteína. Assume-se com estes modelos que os movimentos internos ocorrem em duas escalas de tempo, uma rápida e outra lenta. Estas escalas são caracterizadas por tempos de correlação, τ_f e τ_s (onde $\tau_f \ll \tau_s \ll \tau_c$) e o parâmetro de

ordem S^2 é igual a S_f^2 e S_s^2 . Define-se nesta situação que o parâmetro de ordem como S^2 será igual a $S_f^2 * S_s^2$ ($0 \leq S^2 \leq 1$), correspondendo a restrição espacial do vetor N-H. A análise também leva em conta o alargamento de linha devido à troca conformacional, o termo *Rex*. Os dados de relaxação foram então ajustados para estes 5 modelos da tabela abaixo usando o programa TENSOR 2.

Análise do alérgeno Art v 1 nativo

Extratos de pólen de *Artemisia vulgaris* foram preparados para purificar a proteína nativa da Art v 1 através de coluna de troca iônica (CM Sepharose CL-6B – Amersham Biosciences) seguindo o protocolo de Himily et al. (2003). Frações contendo a proteína nArt v 1 foram reunidas e dializadas contra água destilada. Alíquotas foram secadas à vácuo e guardadas a -20°C. A proteína nativa foi suspensa em 10% D₂O e espectros ¹³C – HSQC (10K *scans*) medindo a abundância natural de carbono foram coletados em um espectrômetro de 800 MHz.

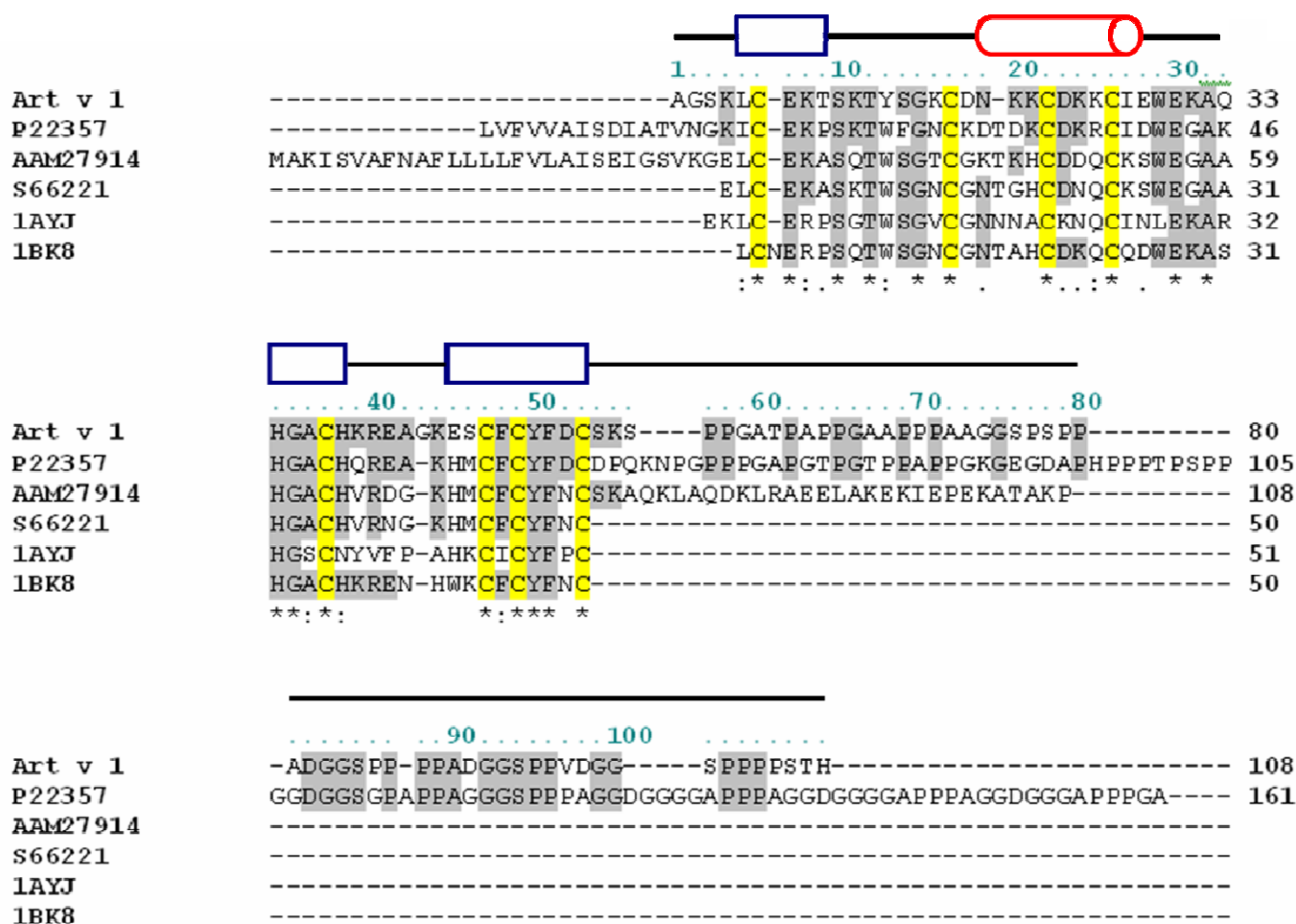
Purificação e interação de anticorpos policlonais com Art v 1

Cinquenta pacientes austríacos alérgicos a pólen de *Artemisia vulgaris* foram selecionados com base em seus históricos clínicos. Estes pacientes apresentaram reação positiva para o teste de contato da pele e, também, para o teste de detecção de IgE *in vitro* (CAP system, Phadia AB, Uppsala, Suíça). Os experimentos realizados com amostras de sangue de pacientes foram aprovados previamente pelo Comitê de Ética da Universidade Médica e pelo Hospital Geral de Viena (n° EK497/2005). Os anticorpos policlonais foram purificados de soro de pacientes de acordo com Dedic et al. (2009). O estudo da interação entre Art v 1 e os anticorpos policlonais foi realizado utilizando-se 2 µM de IgEs purificados de pacientes alérgicos como descrito. Os anticorpos foram concentrados e tubos concentradores (Amicon) até o volume de 300 µL para atingir o volume do tubo de RMN. O alérgeno Art v 1 foi titulado à IgE usando diferentes concentrações de 10 a 150 µM. A interação foi monitorada através de experimentos ¹⁵N-HSQC e o desvio do deslocamento químico em relação a amostra controle foi representado em um gráfico em função ao número de aminoácidos da proteína.

RESULTADOS

Estrutura por RMN do alergeno Art v 1

A estrutura do alergeno Art v 1 encontrado em grãos de pólen de *Artemisia vulgaris* foi resolvida por RMN. A Figura 1 mostra o alinhamento de seqüência primária da Art v 1 em comparação com as seqüências mais similares resultantes da análise feita com o programa BLAST (Altschul SF et al., 1990). As estruturas secundárias identificadas no domínio Defensina (1-56) da Art v 1 são extremamente conservadas entre as defensinas de plantas (Pelegriani et al. 2005). Particularmente, a seqüência P22357 de *Helianthus annuus* (girassol) apresenta um padrão similar na região C-terminal do domínio poliprolina (56-108) com vários resíduos conservados de Prolinas, glicinas, e Serinas. Outras seqüências encontradas em bancos de dados de EST mostraram alta similaridade com a Art v 1. Estas seqüências pertencem a espécies como *Lactuca serriola* (DW116026, BU012812), *Cichorium intybus* (EH71010), *Taraxacum officinale* (DY835145) e *Helianthus annuus* (DY929461), todas da família Asteracea (www.ncbi.nlm.nih.gov). O alinhamento de algumas destas seqüências apresentou resíduos bastante conservados do domínio defensina da incluindo fragmentos K4 a S10, K21 a A32, H34 a H38 e C47 a C53, assim como diversos resíduos da região de prolina (Figura S1 – Material Suplementar).



I - amino ácidos idênticos a Art v 1

Figure 1. Alinhamento do alérgeno Art v1 com sequências de diferentes defensinas. As primeiras três sequências são as primeiras encontradas através do programa BLAST. De cima para baixo temos as proteínas P22357 e AAM27914 de *Helianthus annuus*, e S66221 de *Dahlia merckii*. Os números em verde correspondem a sequência da proteína Art v 1. Os elementos de estrutura secundária baseados na estrutura da Art v 1 estão representados no topo da figura. As caixas em azul, representam as fitas-beta e o cilindro em vermelho representa a hélice α da Art v 1. Em amarelo estão representados os resíduos conservados de cisteínas comuns às defensinas de planta.

O alérgeno Art v 1 recombinante produzido em *E.coli*, marcado isotopicamente com ^{15}N e ^{13}C , foi utilizado para a coleta de experimentos de tripla ressonância. Os assinalamentos dos deslocamentos químicos foram depositados no BMRB (entry 16111). Um conjunto de 100 estruturas foi calculado a partir de 666 restrições de distância com X e X restrições de diedro. As 20 estruturas de menor energia, que não apresentaram violação das restrições de distância maiores que 0.25 Å e sem violações nos ângulos de diedro maiores que 3.0 ° foram escolhidas para representar a estrutura em solução da Art v 1. Este conjunto de estruturas, sobreposto em relação aos átomos pesados do esqueleto carbônico, pode ser observado na Figura 2A, assim como suas representações em *cartoon* podem ser visualizadas na Figura 2C.

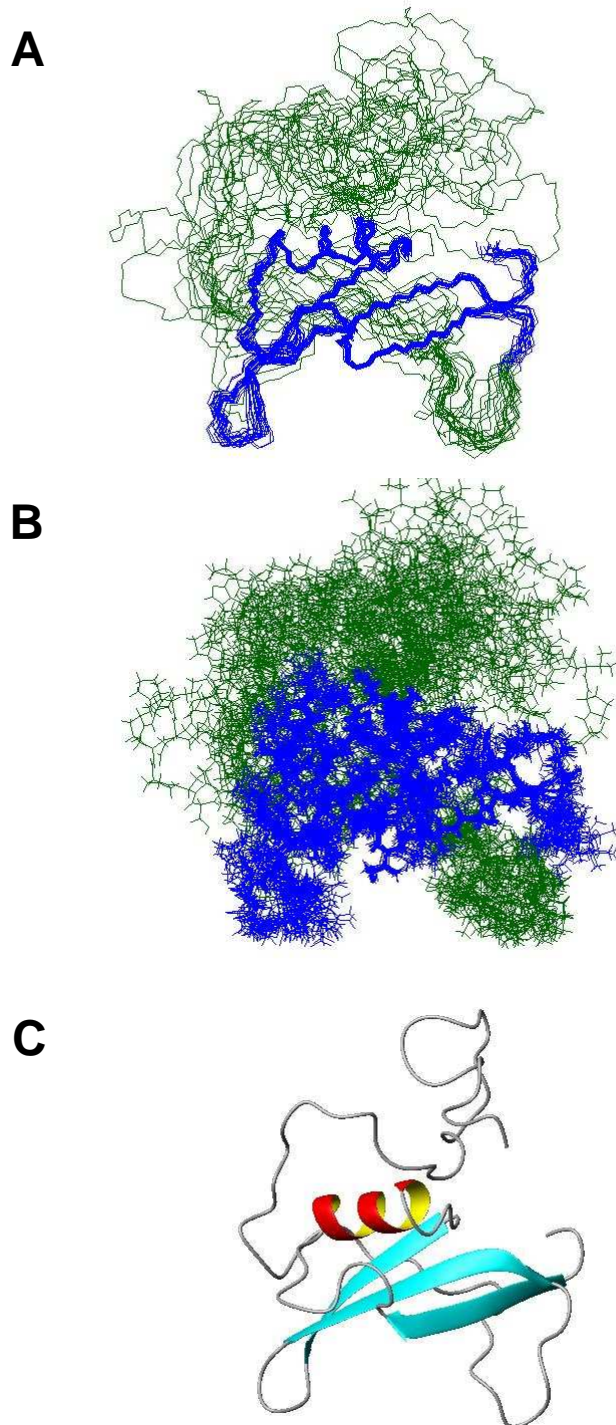


Figure 2. A estrutura do alergeno Art v 1 de *Artemisia vulgaris*. (A) Representação da sobreposição das 20 estruturas de menor energia do Art v 1. O domínio defensina esta colorido em azul enquanto o domínio rico em prolina esta representado em verde. (B) Representação idêntica ao painel A acrescido das cadeias laterais. (C) Forma de representação (em *cartoon*) dos elementos de estrutura secundária do Art v 1. As fitas β estão coloridas azul (setas) e a

hélice α colorida em vermelho e amarelo. A região intermediária de ligação entre os dois domínios (57-71) é formada por uma porção estruturada do alergeno.

A proteína Art v 1 adota um enovelamento α/β típico da família das defensinas de plantas (Thomma et al. 2002) para os resíduos 1 a 56, constituída de uma α -hélice dos resíduos 19 a 28 e três fitas beta antiparalelas. A beta 1 encontrada do resíduo 5 a 9, beta 2 do 34 a 39 e beta 3 de 45 a 53. A estrutura da Art v 1 contém oito resíduos de cisteínas ligados por pontes dissulfeto. O padrão de ligação encontrado foi 6-53, 17-37, 22-47 e 26-49, concordando com o motivo estrutural chamado de CSH (cysteine-stabilized α -helix). Este motivo estrutural consiste de um par de resíduos de cisteínas separados por uma sequência tripeptídica (Cis-X-X-X-Cis) na α -hélice com um fragmento Cis-X-Cis em uma fita beta (Thomma et al. 2002).

Em comparação com outras proteínas com enovelamento de Defensina reportadas a Art v 1 assemelha-se muito a Rs-AFP1 (PDB 1ayj) de acordo com o programa DALI (Holm L et al., 2008). O outro domínio da Art v 1, rico em prolinas, ao contrário do previsto pelos programas de estimativa de desordem (PONDR[®] - dados não mostrados) apresentou NOEs de longa distância que conectam os resíduos (X a X). Uma tendência estrutural formando uma estrutura helicoidal é observada neste domínio. Esta estrutura compreende os resíduos 56 a 71 totalizando uma volta e meia, separadas por X A de distância. Todas as prolinas nesta região encontram na forma isomérica *trans*. Nos demais resíduos de 72 a 108 foram encontrados poucos NOEs de longa distância indicando uma região de maior mobilidade na proteína.

O conjunto de estruturas apresentou para o esqueleto protéico um desvio médio quadrático (*root-mean-square-deviation* – RMSD) de 0.5 Å para as regiões de estrutura secundária do domínio defensina (3-56) e 4.3 Å para toda a cadeia polipeptídica. Considerando todos os átomos o domínio defensina apresentou 1.05 Å e toda a cadeia protéica 4.5 Å. Todas as estruturas satisfazem as restrições experimentais com pequenos desvios em relação à geometria covalente idealizada. Os detalhes estatísticos da estrutura podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1. Resumo das Restrições Conformacionais e da Análise Estatística

Restrições Experimentais

NOE	666
Intraresiduais (i, i)	163
Sequenciais (i, i ± 1)	219
de Média distância (1 < i - j < 5)	71
De Longa distância (i - j ≥ 5)	211
Ligações de Hidrogênio	
Ângulos de Dihedro	
Φ (°)	
Ψ (°)	
Rmsd from the Average Structure	
Structured region residues, 3-56	
Backbone (Å)	0.50 ± 0.12
Heavyatoms (Å)	1.05 ± 0.18
Qualidade da Estrutura	
Ramachandran plot (PROCHECK)	
Most favored regions (%)	59.9
Additional allowed regions (%)	39.4
Generously allowed regions (%)	4.2
Disallowed regions (%)	1.4
CYANA "Target Function" (Å ²)	0.74 ± 0.36

Avaliação dos parâmetros de Relaxação (R1, R2 e {1H}-15N-NOE) da Art v 1

Os parâmetros de relaxação R1, R2 e {¹H}-¹⁵N-NOE foram calculados para rArt v 1. As medidas destes parâmetros fornecem informações sobre a dinâmica da proteína. As medidas de R1 (relaxação longitudinal) são sensíveis a movimentos da ordem de pico a nanosegundos e as medidas de R2 (relaxação transversa) na faixa de pico a milissegundos. Deste modo valores de R2/R1 refletem somente os movimentos mais lentos da proteína e muitas vezes pode ser um indicativo da interconversão entre duas ou mais conformações para um determinado resíduo na proteína (mudança conformacional) (Kay et al., 1989). Os resíduos G2, T12, G83, G92, G84, G100, G75, G93 e S54, devido à sobreposição de sinais amídicos (Razzera et al., 2009) foram descartados da análise. Os resíduos K39 e S94 não se ajustaram aos modelos exponenciais de análise, provavelmente devido ao fraco sinal observado no espectro de HSQC ¹⁵N. Na figura 3, pode-se observar claramente que existem comportamentos diferentes para os dois domínios da Art v 1. As regiões de maior movimentação na proteína envolvem a porção N-terminal (3-5), os dois *loops* do domínio defensina (9-18 e 39-44) e o domínio poli-prolina. No domínio rico em prolina observam-se comportamentos diferentes para a porção de ligação entre os domínios (56-60), a porção poli-prolina (61-106) e os últimos resíduos da região C-terminal. Percebe-se que a mobilidade aumenta nesta ordem citada.

O domínio defensina (1-56) apresenta valores de R1, R2 e $\{^1\text{H}\}\text{-}^{15}\text{N}\text{-NOE}$ em média 1,73, 7,62 s^{-1} e 0,63 respectivamente. Já o domínio poli-prolina, na porção 61 a 108, apresenta valores médios dos parâmetros de relaxação de 1,26, 3,12 s^{-1} e -0,46, respectivamente. Os valores médios de relaxação para o restante do domínio poliprolina (57-60) apresentam-se intermediários entre os dois segmentos. Sendo assim, os desvios em relação à média foram tratados separadamente para os segmentos 1-56 e 61-108, indicados por linhas tracejadas na figura 3. No domínio defensina, os resíduos S3, K4, S14 e G15, mostrados em azul na Figura 3a, apresentaram valores de R1 maiores que um desvio padrão em relação à média. Para o segmento do domínio poliprolina de 61 a 108, estes resíduos foram o T61, A63, S76 e H108. Em azul na Figura 3a, estão representados os valores maiores que um desvio padrão em relação a esta média. Os dados de R2 e $\{^1\text{H}\}\text{-}^{15}\text{N}\text{-NOE}$ também foram tratados da mesma maneira e apresentaram os seguintes valores: R2 (1-56) médio de 7,6214 s^{-1} e 0,6387 s^{-1} para $\{^1\text{H}\text{-}^{15}\text{N}\}\text{-NOE}$. Os resíduos S3, K4, L5, T9, K11, G15, E41, A42, K44, F48 e S3 e K4 mostraram valores acima de um desvio padrão em relação à média de R2 e $\{^1\text{H}\text{-}^{15}\text{N}\}\text{-NOE}$ respectivamente. Já no domínio poli-prolina (61-108) os aminoácidos acima de um desvio padrão de R2 foram G66, A67, A68, G74 e H108. Para $\{^1\text{H}\text{-}^{15}\text{N}\}\text{-NOE}$ os resíduos acima da média foram A67, T107 e H108. Estes aminoácidos estão representados em azul na figura 3b e c. Apesar dos valores de $\{^1\text{H}\text{-}^{15}\text{N}\}\text{-NOE}$ da região 41 a 45 assim como a Gly 15, ficarem abaixo da linha de corte referente a um desvio padrão em relação a média, é bastante evidente que estes valores, ao redor de 0,4 se destacam em relação à média do domínio defensina. Estes resíduos compreendem a segunda volta do domínio defensina da Art v 1. Na figura 3d pode-se observar R2/R1. Novamente os valores que ultrapassam um desvio padrão em relação à média ($R2/R1_{(1-56)} \text{médio} = 4,38 \text{ s}^{-1}$; $R2/R1_{(61-108)} = 2,45 \text{ s}^{-1}$) estão representados em azul. Observa-se que os resíduos S3, K4, L5, T9, K11, S14, D18, A32, E41, A42, K44, G66, A68 e G74, possivelmente estão envolvidos em movimentos lentos (micro a milissegundos) na Art v 1. Os aminoácidos T9, K11, S14, D18, A32, G66, A68 e G74 são indicativos de troca conformacional, pois estão acima de um desvio padrão em relação as medias de R2/R1 para cada domínio.

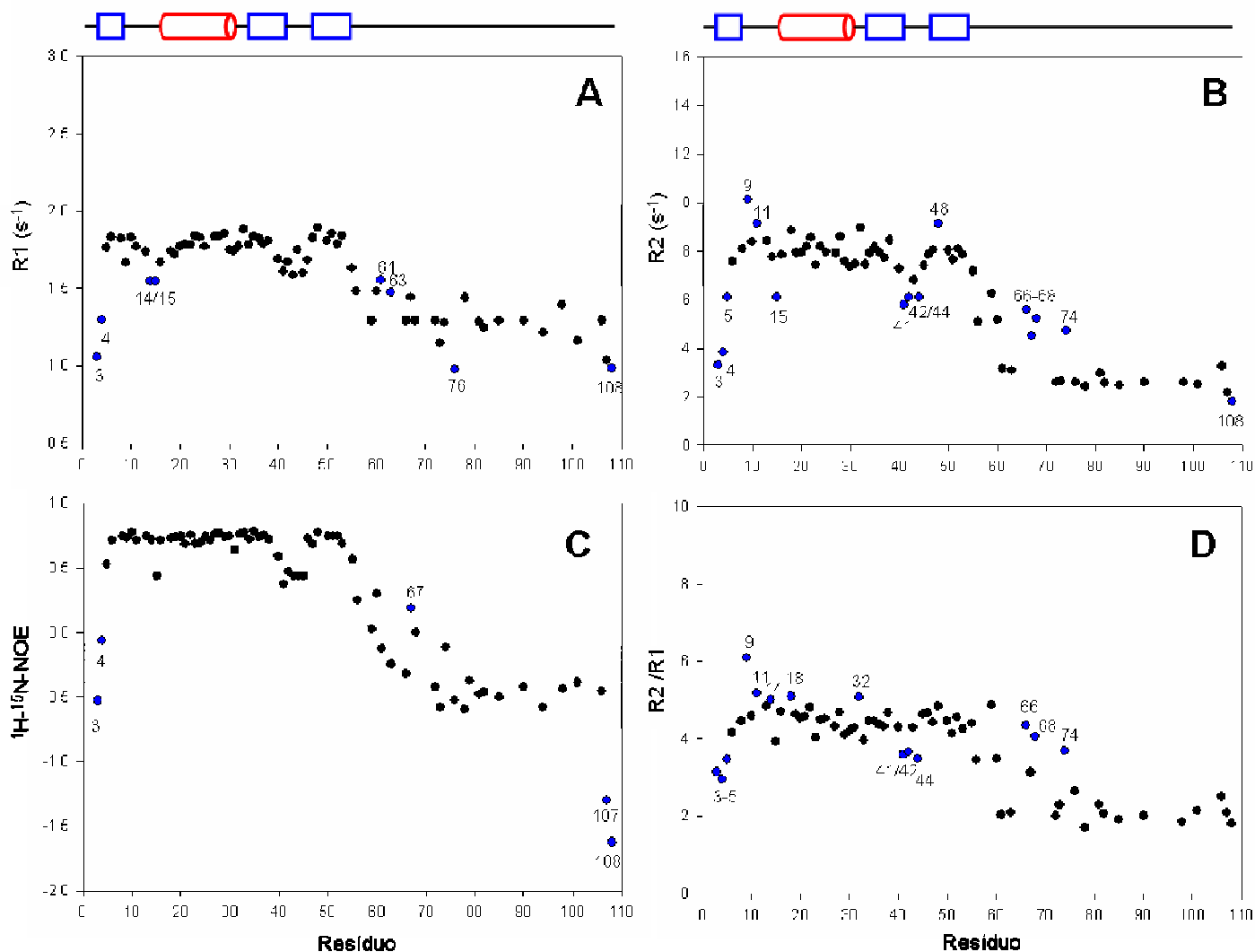


Figure 3. Parâmetros de relaxação para o alergeno Art v 1. (A) Valores de R1, (B), R2 e (C) $\{^1\text{H}\}\text{-}^{15}\text{N}$ NOE medidos para os picos bem resolvidos das ressonância amídicas da proteína. Os valores estão mostrados em função do número dos resíduos da Art v 1. Os números e os pontos em azul indicam valores da Art v 1 maiores que a média de cada medida ($> \Delta\delta$). Os elementos de estrutura secundária estão representados no topo dos painéis A e B.

O formalismo “livre de modelo” de Lipari e Szabo (Lipari e Szabo, 1982 a, b). foi utilizado para a estimativa do tempo de correlação rotacional global (τ_c) da Art v 1. Devido a presença de dois domínios com movimentos distintos e de acordo com a estrutura calculada, os dados ajustaram-se melhor a movimentos de tombamento anisotrópicos em solução. Os componentes de principais do tensor de difusão rotacional da Art v 1 foram calculados através do programa TENSOR (Dosset et al., 2000). Resíduos localizados em regiões de voltas e o domínio rico em prolínas da Art v 1

foram excluídos do cálculo de τ_c , pois estas regiões são bastante móveis na proteína. Os resíduos que apresentavam valores de R2/R1 maiores que um desvio padrão em relação à média também foram excluídos. O valor médio de τ_c calculado para Art v 1 foi de $5,87 \pm 0,02$ ns. Este valor de τ_c foi utilizado para a determinação dos parâmetros de dinâmica interna. Os parâmetros de dinâmica interna (S^2 e R_{ex}) da Art v 1 podem ser visualizados na figura 4. A análise feita considera cinco modelos para a função de densidade espectral, elucidando os movimentos rápidos na escala de nano a picosegundos (S^2 , τ_e) e lentos na escala de mili a microsegundos (R_{ex}). O modelo 1 (S^2) se ajustou bem a 18 resíduos da Art v 1 localizados no domínio defensina. O modelo 2 (S^2 , τ_e) ajustou-se a 15 resíduos. Dois resíduos ajustaram-se ao modelo três (S^2 e R_{ex}) e 9 e 29 aos modelos 4 (S^2 , τ_e e R_{ex}) e 5 (S^2_f , S^2_s e τ_e) respectivamente (Tabela S1-Material suplementar). A média dos valores de S^2 ficou em 0,81 para o domínio defensina e 0,32 para o domínio de prolinas. Os dados indicam que a região de prolinas a partir do resíduo T61 passa a apresentar valores que indicam movimentos na escala de picosegundos para este domínio. Diversos resíduos deste domínio foram ajustados por τ_e , mostrando que estes aminoácidos se diferenciam em relação ao domínio defensina. (Tabela S1 –Material Suplementar). No entanto, os resíduos G59, A60, G66, A67 e G74 apresentaram valores acima de um desvio padrão em relação à média de 0,32 para o domínio de prolinas mostrando uma dinâmica interna diferenciada para estes resíduos nesta escala de tempo para estas porções da Art v 1. O parâmetro R_{ex} , que contribui para o alargamento de linha das ressonâncias amídicicas durante as medidas de T2 devido a um processo de troca conformacional, foi necessário para o ajuste dos dados de relaxação dos resíduos T9, K11, S14, D18, N19, C22, E45, S46 e F48 do domínio defensina e G59, G66 e G68 do domínio de prolinas. Os resíduos 9, 11, 14, 18, 66 e 68 também apresentaram valores de R2/R1 maiores do que uma unidade de desvio padrão da média, como mostrado na Figura 3d. Isto indica que estes resíduos apresentam uma dinâmica na escala de tempo de micro- a milisegundos maior do que o restante da proteína.

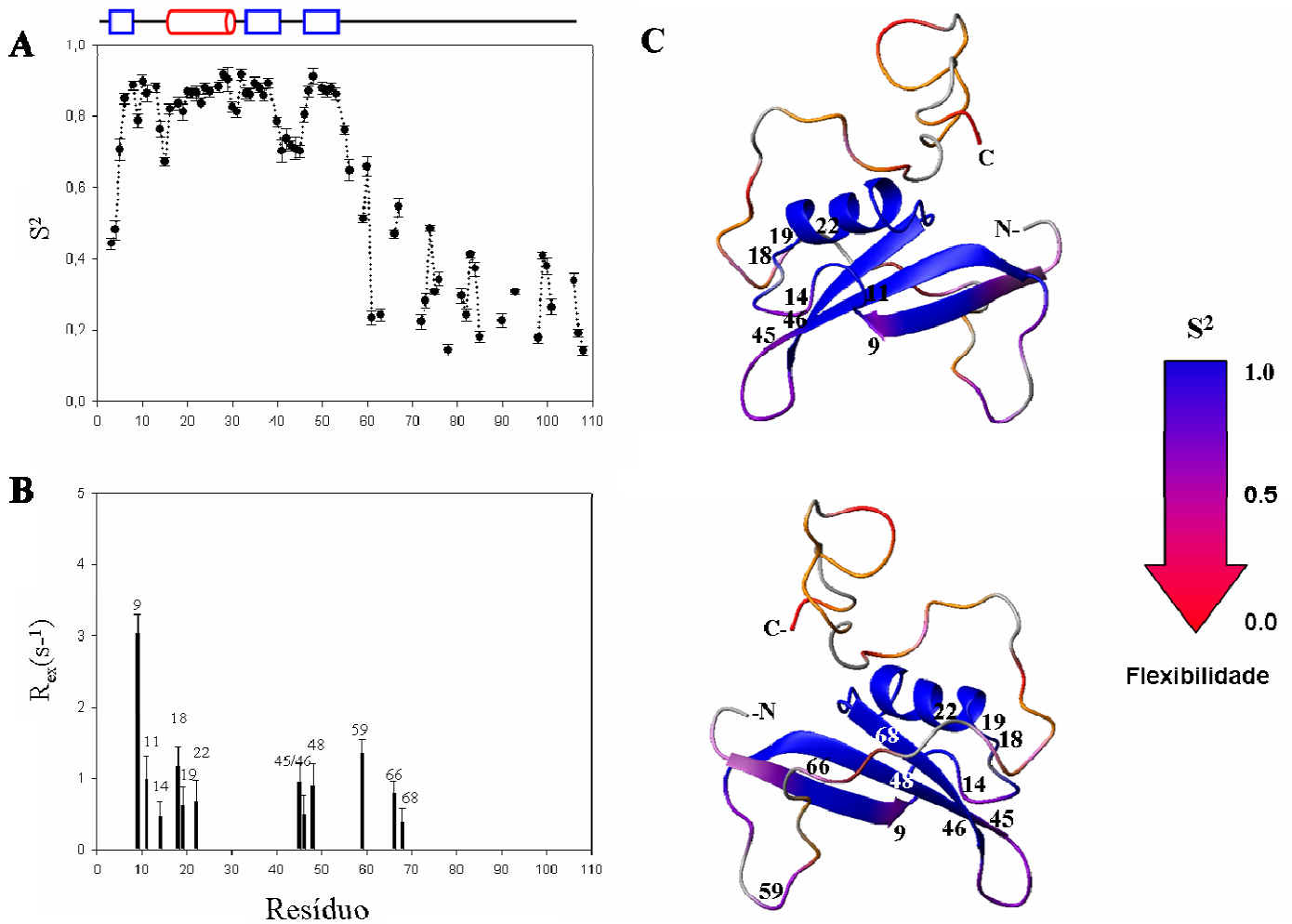


Figure 4. A dinâmica da cadeia principal da Art v 1. (A) Dinâmica da cadeia principal na escala de pico a nanosegundos. O parâmetro de ordem (S^2) está representado em função dos números dos resíduos da proteína. (B) As trocas químicas medidas através do parâmetro K_{ex} na escala de mili a microsegundos. Os valores de K_{ex} foram representados em função do número dos aminoácidos da Art v 1. (C) Representação do parâmetro de ordem colorido na estrutura da Art v 1. Valores próximos de zero representam maior flexibilidade nesta escala de tempo. Resíduos com indicativo de troc conformacional estão representados por números ao longo da estrutura. Os erros das medidas foram estimados pelo programa Tensor 2 (Dosset et al., 2000). A representação esquemática dos elementos de estrutura secundária está localizada no topo do painel A.

Análise comparativa entre a forma recombinante e nativa da Art v 1

A proteína Art v 1 foi purificada a partir de pólen de *Artemisia vulgaris* e experimentos de HSQC - ^{13}C foram coletados onde a abundância natural de ^{13}C foi detectada. As diferenças, utilizando a correlação C α -H α , entre a Art v 1 recombinante e a nativa podem ser observadas na Figura 5. Como o esperado, as prolinas que na Art v 1 nativa são do tipo hidroxiprolina ligadas a resíduos de Arabnose – Galactose (Leonard et al., 2005), foram os aminoácidos que mais apresentaram diferenças. Todas as prolinas foram tratadas como agrupamentos, pois os sinais encontravam-se sobrepostos no espectro de HSQC. Deste modo as prolinas formaram agrupamentos: 58, 65, 71 e 103 – grupo I; 57, 62, 64, 69, 77 e 89 – grupo II; 70, 80, 95 e 96 - grupo III e 86, 87, 88, 104 e 105 – grupo IV. Resíduos da região N-terminal C6 e K8 mostram-se também bastantes diferenças. Os resíduos, H34 localizado na beta 2, A42 na segunda volta, Y50 na beta 3, C53 fazendo ligação dissulfeto com C6 e S56 todos localizados no domínio defensina, também apresentaram alterações acima da média porém somente a K8 e S56 tiveram valores acima de um desvio padrão em relação a média de 0.04. Já no domínio poliprolina, além das prolinas já descritas, o resíduo A63 mostrou alteração bastante acima da média. Estes resíduos localizam-se na região de ligação entre os domínios defensina e prolina, de acordo com a estrutura da Art v 1 recombinante. É interessante que os resíduos 56 e 63 localizam-se em uma região estruturada de ligação entre os domínios e não são ambíguos no espectro de ^{13}C -HSQC corroborando com a estrutura da Art v 1. Ou seja, a região de ligação está próxima a porção N-terminal. Outros resíduos (S77, T107 e H108) onde há poucas restrições de distância definindo a estrutura da rArt v 1, também mostraram alterações bem pronunciadas.

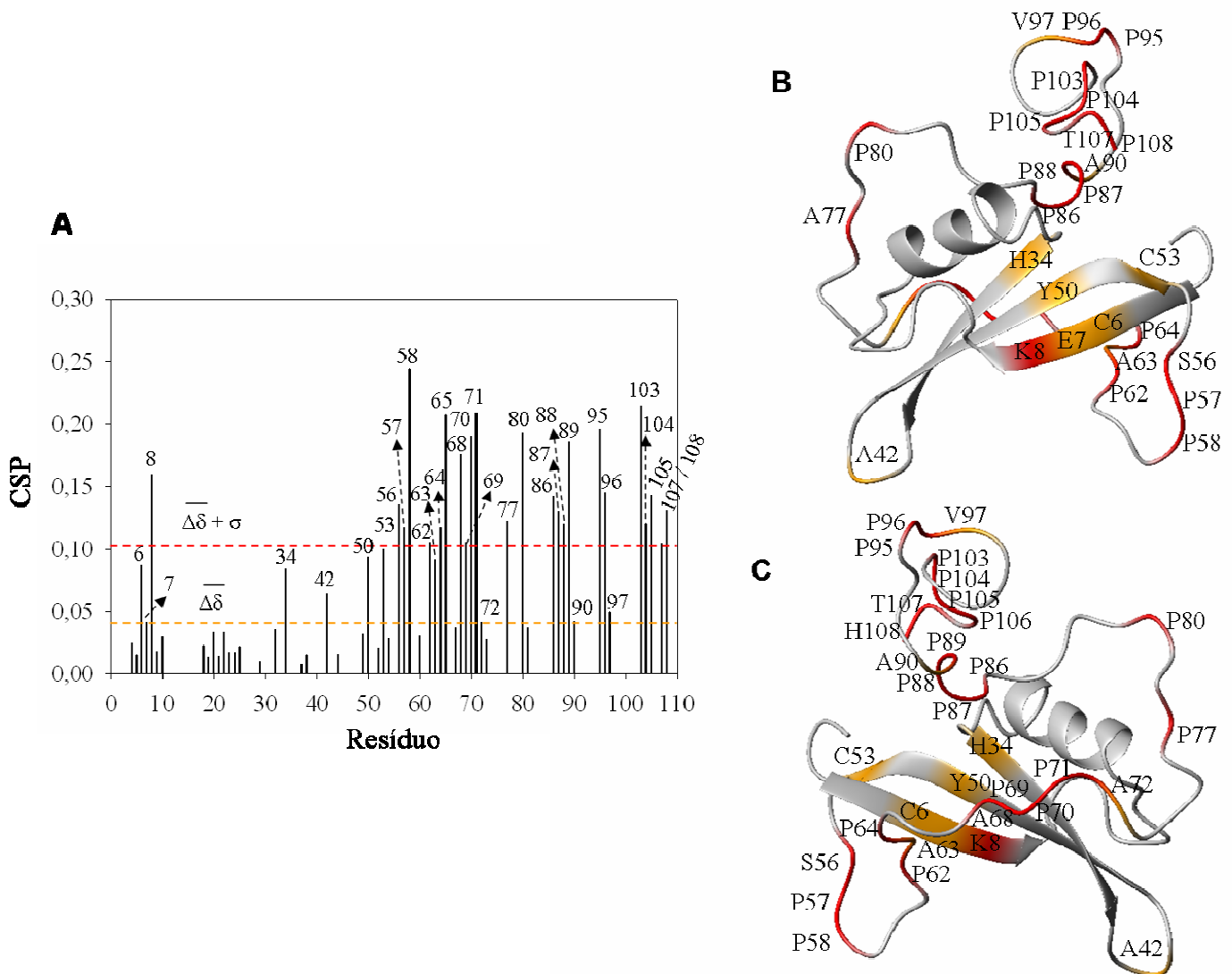


Figure 5. Análise por RMN da forma nativa do Art v 1 baseada em espectros HSQC, medindo abundância natural de ^{13}C . A forma nativa foi purificada a partir de pólen de *Artemisia vulgaris*. (A) Desvio do deslocamento químico entre a forma nativa e a recombinante da Art v 1. Os desvios do deslocamento químico de hidrogênios e carbonos α foram utilizados para a análise. As linhas de corte para a média ($\Delta\delta$, em laranja) e para um desvio padrão em relação a média ($\Delta\delta + \sigma$, em vermelho) estão representados em linhas tracejadas. (B) e (C) mostram os desvios do painel A na estrutura do alergeno Art v 1 recombinante.

Interação de anticorpo IgE humano policlonal com rArt v 1

A resposta imunológica típica de processos alérgicos produz uma grande quantidade de anticorpos IgE em resposta ao alérgeno. Sendo assim, anticorpos policlonais IgE extraídos a partir do soro de 50 pacientes foram utilizados para os experimentos de interação com a proteína recombinante Art v 1. A figura 6 mostra os resíduos mapeados que sofrem perturbações no deslocamento químico após a interação com IgE. Os resíduos S3, K4, E45, K55, S56, A63, G83, S85 e H108 apresentam perturbações do deslocamento químico maiores que um desvio padrão em relação à média ($\Delta\delta = 0,0026$) (mostrados em vermelho na figura 6). Resíduos que mostraram menores perturbações, acima da média (K8, S14, D18, R40, E41, S46, Y50, G74, G75 e G93) estão coloridos em laranja na estrutura da figura 6a. Observa-se que a superfície predominante de interação envolve a região ao redor da porção N-terminal e o início da região de ligação entre os domínios defensina e poliprolina. No entanto mais de uma superfície possíveis afetadas pela interação foram mapeadas. A superfície mais significativa (Figura 6b) envolve os resíduos S3, K4, K55, S56 e A63 (Superfície I). A segunda, envolve os aminoácidos D18, E45, G75 (Superfície II – Figura 6c) e uma terceira, composta pelos aminoácidos, S46, S14, D18 (Superfície III – Figura 6d) composta somente de pequenas perturbações do deslocamento químico.

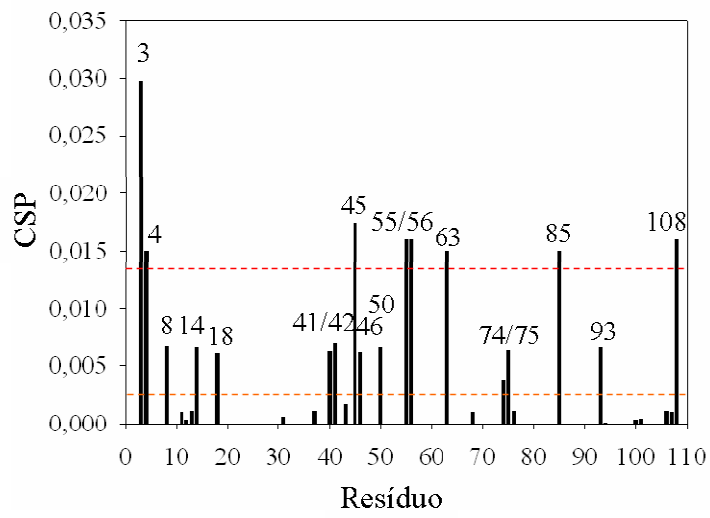
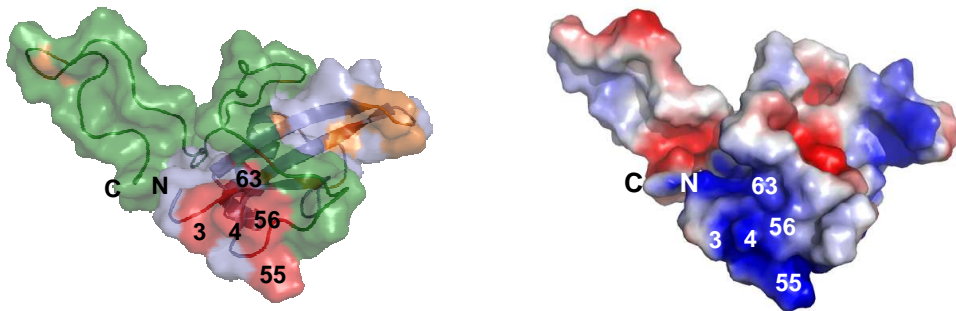
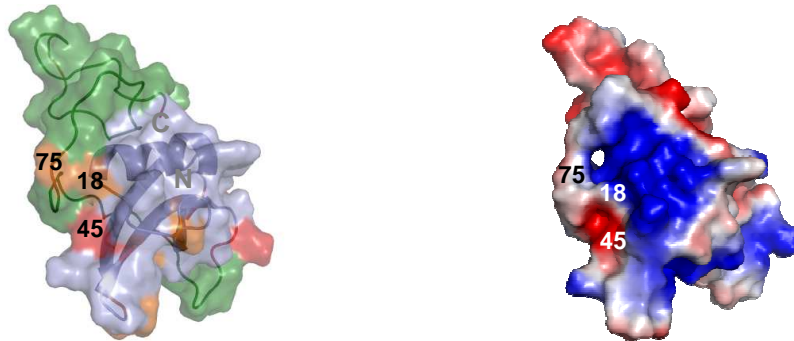
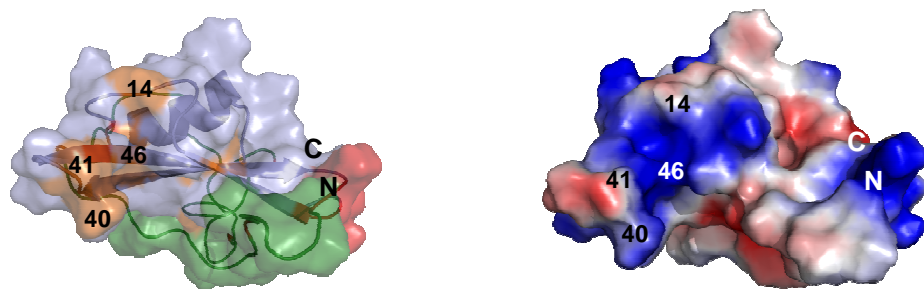
A**B****C****D**

Figure 6. Interação Art v 1 – IgE. Espectros HSQC de amostras marcadas com ^{15}N (50 mM) foram adquiridos na presença e ausência de IgE (Anticorpos policlonais a 2mM de soro). Em A, a perturbação do deslocamento químico (CSP) após a interação com IgE. Em B, C e D são mostrados, em vermelho, os resíduos com os maiores desvios ($> \Delta\delta + \sigma$) e em laranja, os resíduos de menor perturbação ($> \Delta\delta$). O mapa de superfície de cargas está representado ao lado de cada figura, onde as cargas positivas estão em azul, as negativas em vermelho e as neutras em branco. O domínio rico em prolina está colorido em verde. A região do epítipo conformacional com as maiores perturbações do deslocamento químico envolve a superfície I (em B), composta pela porção N-terminal, pela região terminal do domínio defensa, e pelo resíduo A63 do domínio de prolina (superfície I). Esta superfície é formada por uma região positiva do alérgeno Art v 1 (em B).

DISCUSSÃO

Características estruturais da Art v 1

A análise da estrutura da Art v 1 revelou uma estrutura bem enovelada para o domínio defensina (1-56), com uma α -hélice e três fitas β antiparalelas, característico do enovelamento α/β estabilizado por cisteínas (Thomma et al. 2002). A porção de conexão entre o domínio defensina e o domínio de prolinas do resíduo 56 a 71 apresentou um valor de RMSD de 1.46 Å, portanto, relativamente bem estruturada, formando voltas de prolinas. O restante do domínio de prolinas (71-108), devido a falta de NOEs, não apresentou uma tendência à formação de voltas, mas até o resíduo P95 em todas as prolinas predominou a conformação do tipo *trans*. Estes resultados contrariam as previsões feitas com o programa PONDR®, para estimativa de regiões flexíveis, que prevê uma grande região desordenada a partir do resíduo 59 até o 108.

Em comparação através do programa Dali (Holm L et al. 2008) a Art v1 assemelha-se mais com a estrutura da defensina de planta antifúngica Rs-AFP1 (PDB 1ayj) de *Raphanus sativus* (Fant F et al. 1998). A análise feita com o domínio de prolinas isolado não apresentou nenhuma estrutura semelhante para esta região da Art v 1. Regiões desestruturadas, ou mesmo proteínas intrinsecamente desenoveladas apresentam alguns aminoácidos com maior prevalência como ácido aspártico, metionina, lisina, arginina, serina, glutamina, prolina, alanina, glicina e ácido glutâmico (Dunker A et al., 2008). O domínio de prolinas da Art v 1, além de muitas prolinas também apresenta ácido aspártico, serina e é rico em glicinas e alaninas. Todos esses aminoácidos são reportados como promotores de desordem. No entanto, estruturas repetitivas ricas em prolinas tem sido reportadas, principalmente quando as seqüências apresentam regiões poli-prolinas formando hélices bastante características, como a hélice tipo II do colágeno (Matsushima N et al., 2008). Apesar da Art v 1 não apresentar uma hélice de prolinas, as hélices tipo II possuem giro a esquerda e todas as prolinas encontram-se na sua forma isomérica *trans* (Horng J e Raines R, 2006), semelhante a Art v 1. Análises feitas por diósmo circular mostraram que o domínio de prolinas da Art v 1 isolado apresenta valores um pico negativo típico de poliprolina tipo II (Himily et al., 2003; Dedic et al., 2009). É bastante provável que, devido a grande mobilidade do domínio de prolinas da Art v 1, com poucos NOEs de longa distância encontrados, o cálculo da estrutura desta região não tenha convergido para a formação de uma hélice. No entanto, voltas a

esquerda são observadas. A existência de uma região estruturada no domínio de prolinas da Art v 1 pode também ser uma característica de outras proteínas homólogas como a P22357 de *Helianthus annuus* ou outras proteínas encontradas no banco de dados de EST provenientes de espécies também da família das Asteraceas como: *Lactuca serriola*, *Cichorium intybus*, *Taraxacum officinale* e *Helianthus annuus*. A comparação com seqüências de EST mostrou que a região intermediária (57-71) que apresenta maior convergência na Art v 1 é bastante conservada entre estas espécies citadas (Figura S1- Material Suplementar). Sabe-se que outras plantas da família das Asteraceas são potenciais produtoras de alérgenos (ref). É interessante que os resíduos K4 e K55 da superfícies I de interação com IgE são conservados entre estas seqüências. Portanto, é possível que outras plantas expressem proteínas potencialmente alérgênicas. A função da Art v 1 em *Artemisia vulgaris* é desconhecida, no entanto, é bastante plausível que esta proteína possa ser uma defensina real e que o domínio rico em prolinas participe da função de defesa. A semelhança com a proteína Dm-Amp1 (S66221) RS-AFP1 (1AYJ) e Ah-Amp1 (1BK8), conhecidas como proteínas antimicrobianas sugerem esta função para Art v 1. Sabe-se que mucinas, por exemplo, presentes na saliva humana, são potentes bactericidas e são compostos de repetições poli-prolina (T-T-A-A-P-P-T-P-S-A-T-T-P-A-P-P-S-S-S-A-PP –Mucina 2) formando hélices do tipo II (Krane S, 2008; Antonyraj K et al., 1998). A hipótese da Art v 1 atuar como uma proteína antifúngica e/ou antibacteriana está sendo testada experimentalmente.

Características da Dinâmica da Art v 1

A dinâmica dos alérgenos tem sido pouco relatada, e somente um trabalho mostrou a dinâmica de epitópos (Naik M et al., 2008). A dinâmica da cadeia principal de dois alérgenos foi reportada até o momento: Bet v 4 (Neudecker et al., 2004) e Blo t 5 (Naik M et al., 2008). De acordo com os parâmetros de ordem (S^2) reportados para a Art v 1 o domínio defensina apresentou valores altos, indicando ser bastante estruturado. Já o domínio rico em prolinas apresentou uma maior flexibilidade com valores em torno de 0,2. No entanto, valores intermediários são observados para a região de S56 a A60. De acordo os valores reportados para o desvio dos deslocamentos químicos em relação a aminoácidos livres da Art v1 (Razzera et al., 2009), sugere-se uma região randômica para este domínio a partir do resíduo 90 e com maior ordem de 57 a 89. Até o momento,

este é o primeiro relato de uma proteína semelhante a defensinas de plantas que possui uma região mais flexível compreendendo quase a metade dos aminoácidos da molécula. As evidências sugerindo que a troca conformacional está relacionada com importantes processos bioquímicos em proteínas vem crescendo bastante (Henzler-Wildman e Kern, 2007 ; Boehr et al., 2006; Valente et al., 2006). As análises feitas com base no formalismo "livre de modelo" de Lipari e Szabo (Lipari e Szabo, 1982 a, b) prevêm troca conformacional no primeiro *loop* do domínio defensina (T9, K11, S14 e D18), nos resíduos E45, S46 e F48 da beta 3 e nos resíduos G59, 66 e 68 do domínio de prolinas. É interessante que dos resíduos que estão em troca conformacional, quatro pertencem a superfícies do mapeamento de ligação a IgE (S14, D18, E45 e S46) e a T9 também envolvido em troca é vizinha do resíduo K8 também relacionado a interação.

O epitopo de células B e T na Art v 1

A determinação do epitopo de célula B é de grande importância para o desenvolvimento de vacinas hipoalergênicas. Somente três epitopos mapeados estruturalmente são encontrados na literatura (Mirza et al., 2000; Padavattan et al., 2007; NaiK M et al., 2008). O epitopo do alergeno Blo t 5 mapeado por NaiK M et al, 2008 mostrou-se descontínuo, apresentando duas superfícies de interação do resíduo L43-K-47 e K54-R57 localizados nas hélices A e B do domínio da Blo t 5. No alergeno de pólen Bet v 1, estudos cristalográficos do complexo entre o alergeno e anticorpo monoclonal IgG1 Fab (Bet v 1- mAb BV16) mostraram um epitopo principal do resíduo E42 a T52 e uma outra região envolvendo os resíduos R70, D72, H76, I86 e K97 (Mirza et al., 2000). A mutação E45S é capaz de abolir completamente a ligação de mAb e reduzir a interação em de IgE policlonal humano em 50% (Spangfort et al., 2003). Percentuais em torno de 50% são observados para a inibição de IgEs policlonais feita com mAb (Padavattan et al., 2007; Mirza et al., 2000; NaiK M et al., 2008). Para os experimentos de interação com IgE utilizamos anticorpos policlonais extraídos do soro de 50 pacientes (descrito em material e métodos). Este é o primeiro trabalho na literatura que utiliza esta metodologia para o mapeamento de epitopos de células B em nível atômico. Três superfícies são observadas. A primeira é formada por resíduos que obtiveram as maiores perturbações do deslocamento químico, envolvendo os resíduos, S3, K4, K55, S56 e A63 (Superfície I). A segunda envolvendo os aminoácidos D18, E45, G75 (Superfície II) com um resíduo que sofre maior alteração (E45) e uma terceira, com os aminoácidos, S46, S14, D18 (Superfície III) composta somente de perturbações pequenas do

deslocamento químico. As superfícies observadas, assim como apresentado para Bet v 1 e Blo v 5 são descontínuas e envolvem resíduos carregados como K4, D18, R40, E41, E45 e K55. Apesar de serem conhecidos somente 16 epitopos de ligação a IgE. Estudos através de modelagem molecular de 433 alérgenos (Oezguen et al., 2008) sugerem que resíduos de lisina são os mais comumente encontrados em superfícies de interação. Experimentalmente também tem sido mostrado a propensão destes resíduos interagirem com IgE (Gehlhar et al., 2006). O alinhamento de seqüência (figura 1) mostra que entre as duas regiões do epitopo da Art v 1 metade dos resíduos não são conservados (3, 18, 45, 46, 55, 56, 63). A outra metade apresenta alta similaridade com outras defensinas homólogas (4, 8, 14, 40, 41 e 50). Vale ressaltar que a K55 é conservada entre seqüências similares a Art v 1 encontradas em bancos de dados de ESTs (Figura S1 – Material Suplementar).

A análise feita com o programa PEPOP (Moreau et al., 2008) para a predição de epitopos encontra quatro segmentos (\geq a 5 resíduos) no domínio defensina da Art v 1: 1-7; 27-31; 38-45 e 51-55. Com isso, o programa PEPOP prevê que os epitopos possíveis para o domínio defensina da Art v 1 residem: na região N-terminal e primeira beta (1-7), que contém dois resíduos da superfície I de interação; na porção final do domínio defensina (51-55) que contém os demais resíduos fortes de interação da superfície I e no segmento de 38-45, que contém o resíduo 45 da superfície II e os resíduos 40 e 41 da superfície III. Regiões que corroboram com as mapeadas pela interação com IgEs policlonais, especialmente a superfície I. Uma outra região também foi identificada (27-31), parte central do conhecido epitopo de células T da Art v 1 (25-36) (Jahn-Schmid B et al., 2002), onde os resíduos críticos para o reconhecimento do epitopo são C26, I27, E28, W29, E30 e K31 (Jahn-Schmid B et al., 2005). É possível que a acessibilidade desta porção central seja um ponto de reconhecimento para enzimas envolvidas na clivagem e exposição do epitopo imunodominante. A partir dos 4 segmentos previstos pelo programa PEPOP, 3 foram mapeadas neste trabalho e um deles está de acordo com o epitopo de células T.

Análise da forma nativa da Art v 1

A partir de extratos de pólen de *Artemisia vulgaris*, as diferentes isoformas encontradas para nArt v 1 foram purificadas. Basicamente as isoformas encontradas para Art v 1 variam em resíduos do domínio rico em prolina nos resíduos A68S, S78P, G83S,.

A90V, V97A e T107A, I ou G. Essas modificações parecem não influenciar a ligação a IgE de pacientes sensibilizados por pólen de *A. vulgaris*. A partir da construção isolada do domínio defensina (1-56) e do domínio de prolinas (57-108) o domínio de prolinas parece não participar do epítipo principal de células B (Dedic A et al., 2009). No entanto, sabe-se que alguns pacientes alérgicos a Art v 1 reagem com a forma nativa do alérgeno e não com a sua forma recombinante (Himily et al., 2003). De acordo com as modificações encontradas (com base nos carbonos e hidrogênios α) entre a Art v 1 recombinante e o conjunto de isoformas nativas, acredita-se que as alterações não ambíguas nos resíduos C6, K8, A42, Y50, C53, S56 e A63, devido as glicosilações, indicam mudanças estruturais em regiões importantes para a interação com IgE policlonais. Os volumes ocupados pelos arranjos de galactose e arabinose do tipo III (Leonard R et al., 2005) estariam provocando mudanças estruturais em resíduos envolvidos nas superfícies de interação com IgEs mostrados neste trabalho (8, 50, 56 e 63) ou estariam na vizinhança deles (6, 53 e 42). Os dados apresentados por Dedic et al. (2009), mostrando que o domínio defensina (1-56) é o principal responsável pela ligação a IgE, estão em concordância com esta hipótese, pois a formação de uma superfície de interação com IgE somente a partir do domínio de prolinas (57-108) é bem pouco provável. Por outro lado, quando expresso junto com o domínio defensina, formaria uma estrutura (em *loop*) que pode contribuir para a alergenicidade. Neste caso, os resíduos A63 e eventualmente G75 e H108 também podem contribuir para estas diferenças observadas entre os pacientes alérgicos a *A. vulgaris*.

Implicações para a Imunoterapia

A imunoterapia utilizando alérgenos modificados pode ser uma alternativa as terapias empregadas até o momento, pois frequentemente são observadas reações anafiláticas devido às altas doses de antígeno aplicadas quando extratos são usados (Larché et al., 2006; Niederberger e Valenta, 2006). Estes extratos de fontes naturais apresentam algumas desvantagens, como a presença de compostos não identificados, grande variabilidade na amostra, e a contaminação com outros alérgenos de outras fontes (Valenta e Niederberger, 2007). A utilização de uma molécula modificada do alérgeno Art v 1 que reduza sua alergenicidade e mantenha o reconhecimento a células T seria uma boa alternativa para o futuro desenvolvimento de uma vacina hipoalergênica. Neste trabalho resolvemos a estrutura e avaliamos a dinâmica por RMN do principal alérgeno encontrado no pólen de *Artemisia vulgaris* (Art v 1). Mostramos um epítipo descontínuo

de reconhecimento a IgEs policlonais extraídos de pacientes alérgicos a *A.vulgaris* e podemos especular aqui que a substituição de resíduos carregados pertencentes ao epitopo de ligação a IgE (K4, K8, D18, R40, E41, E45 e K55) podem facilitar o desenvolvimento de vacinas hipoalergênicas. Acreditamos que as informações apresentadas neste trabalho podem contribuir para o tratamento imunoterápico de doenças alérgicas.

Referências bibliográficas:

Aerts, A.M, François, I.E., Cammue, B.P., Thevissen K. (2008). The mode of antifungal action of plant, insect and human defensins. *Cell Mol Life Sci.* 65(13):2069-2079.

Aerts, A.M., François, I.E., Bammens, L., Cammue, B.P., Smets, B., Winderickx, J. (2006). Level of M(IP)2C sphingolipid affects plant defensin sensitivity, oxidative stress resistance and chronological life-span in yeast. *FEBS Lett* 580(7):1903–1907.

Aerts, A.M., François, I.E., Meert, E.M., Li, Q.T., Cammue, B.P., Thevissen, K. (2007). The antifungal activity of RsAFP2, a plant defensin from *Raphanus sativus*, involves the induction of reactive oxygen species in *Candida albicans*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 13(4):243–247.

Akdis, C. (2006). Allergy and hypersensitivity mechanism of allergic disease. *Curr Opin Immunol* 18: 718-726.

Akke M., Skelton, N.J., Kördel, J., Palmer, A.G. 3rd., Chazin, W.J. (1993). Effects of ion binding on the backbone dynamics of calbindin D9k determined by ¹⁵N NMR relaxation. *Biochemistry* 32(37):9832-9844.

Almeida, M.S., Cabral, K.M., Zingali, R.B., Kurtenbach, E. (2000). Characterization of two novel defense peptides from pea (*Pisum sativum*) seeds. *Arch Biochem Biophys* 378(2):278–286.

Almeida, M.S., Cabral, K.M.S., de Medeiros, L.N., Valente, A.P., Almeida, F.C., Kurtenbach, E. (2001). cDNA cloning and heterologous expression of functional cysteine-rich antifungal protein Psd1 in the yeast *Pichia pastoris*. *Arch Biochem Biophys* 395:199–207.

Almeida, M.S., Cabral, K.M.S., Kurtenbach, E., Almeida, F.C.L., Valente, A.P. (2002). Solution structure of plant defensin 1 from *Pisum sativum*: plant defensins, identical backbone with different mechanism. *J Mol Biol* 315:749–757.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403–410.

Arnesano, F., Banci, L., Piccioli, M. NMR structures of paramagnetic metalloproteins. (2005). *Q Rev Biophys.* 38(2):167-219.

Antonyraj, K.J., Karunakaran, T., Raj, P.A. (1998). Bactericidal activity and poly-L-proline II conformation of the tandem repeat sequence of human salivary mucin glycoprotein (MG2). *Arch Biochem Biophys.* 356(2):197-206.

Balandín, M., Royo, J., Gómez, E., Muniz, L.M., Molina, A., Hueros, G. (2005). A protective role for the embryo surrounding region of the maize endosperm, as evidenced by the characterisation of ZmESR-6, a defensin gene specifically expressed in this region. *Plant Mol Biol* 58(2):269–282.

Baldani, J.I., Pot, B., Kirchhof, G., Falsen, E., Baldani, V.L., Olivares, F.L., Hoste, B., Kersters, K., Hartmann, A., Gillis, M., Dobereiner, J. (1996). Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a milk plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. *Int J Syst Bacteriol* 46:802–810

Bauer, L., Ebner, C., Hirschwehr, R., Wuthrich, R., Pichler, C., Fritsch, R., Scheiner, O., Kraft, D. (1996). IgE cross-reactivity between birch pollen, mugwort pollen and celery is due to at least three distinct cross-reacting allergens: immunoblot investigation of the bichmugwort- celery syndrome. *Clin Exp Allergy* 26: 1161-1170.

Bertolucci, C., Ming, L.J., Gonzalez, G., Gilles-Gonzalez, M.A. (1996). Assignment of the hyperfine-shifted ¹H-NMR signals of the heme in the oxygen sensor FixL from *Rhizobium meliloti*. *Chem Biol* 3:561–566

Billeter, M., Wagner, G., Wüthrich, K. (2008) Solution NMR structure determination of proteins revisited. *J Biomol NMR*. 42(3):155-158.

Bloch, C. Jr., Richardson, M. (1991). A new family of small (5 kDa) protein inhibitors of insect alpha-amylases from seeds of sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench) have sequence homologies with wheat gamma-purothionins. *FEBS Lett* 279:101–104.

Boehr, D.D., Dyson, H.J., and Wright, P.E. (2006). An NMR perspective on enzyme dynamics. *Chem Rev*. 2006 Aug;106(8):3055-79.

Bonamore, A., Ilari, A., Giangiacomo, L., Bellelli, A., Morea, V., Boffi, A. (2005). A novel thermostable hemoglobin from the actinobacterium *Thermobifida fusca*. *FEBS J* 272:4189–4201

Bradford, M.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

Brahmachary, M., Krishnan, S.P., Koh, J.L., Khan, A.M., Seah, S.H., Tan, T.W., Brusica, V., Bajic, V.B. (2004). A database of antimicrobial sequences. *Nucleic Acids Res*. Jan 1;32 (Database issue):D586-9.

Bracken, C., Carr, P.A., Cavanagh, J., Palmer, A.G. 3rd. (1999). Temperature dependence of intramolecular dynamics of the basic leucine zipper of GCN4: implications for the entropy of association with DNA. *J Mol Biol*. Feb 5;285(5):2133-46.

Bruce, T.J., Pickett, J.A. (2007). Plant defence signalling induced by biotic attacks. *Curr Opin Plant Biol* 10:387–392.

Bulet, P., Stöcklin, R., Menin, L. (2004). Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol Rev* 198:169–184.

Cabral, K.M.S., Almeida, M.S., Valente, A.P., Almeida, F.C.L., Kurtenbach, E. (2003). Production of the active antifungal *Pisum sativum* defensin 1 (Psd1) in *Pichia pastoris*: overcoming the inefficiency of the STE13 protease. *Protein Expr Purif* 31:115–122.

Caillet-Saguay C, Delepierre M, Lecroisey A, Bertini I, Piccioli M, Turano P (2005) Direct-detected ¹³C NMR to investigate the iron(III) hemophore HasA. *J Am Chem Soc* 128:150–158

Case, D.A. (2002). Molecular dynamics and NMR spin relaxation in proteins. *Acc Chem Res.* 2002 Jun;35(6):325-31.

Chapman, M.D., Pomés, A., Breiteneder, H., Ferreira, F. (2007). Nomenclature and structural biology of allergens. *J Allergy Clin Immunol.* 2007 Feb;119(2):414-20.

Clore, G.M., Szabo, A., Bax, A., Kay, L.E., Driscoll, P.C., and M., G.A. (1990). Deviations from the simple two-parameter model-free approach to the interpretation of Compton LA, Johnson WC Jr (1986) *Anal Biochem* 155:155–167.

Cornilescu, G., Delaglio, F., and Bax, A. (1999). Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology. *J Biomol NMR* 13, 289-302.

Couture, M., Yeh, S.R., Wittenberg, B.A., Wittenberg, J.B., Ouellet, Y., Rousseau, D.L., Guertin, M. (1999). A cooperative oxygen-binding hemoglobin from *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:11223–11228.

Das, T.K., Couture, M., Lee, H.C., Peisach, J., Rousseau, D.L., Wittenberg, B.A., Wittenberg, J.B., Guertin, M. (1999). [Identification of the ligands to the ferric heme of *Chlamydomonas chloroplast hemoglobin*: evidence for ligation of tyrosine-63 \(B10\) to the heme.](#) *Biochemistry* 38:15360–15368.

Dayie, K.T., Wagner, G., Lefèvre, J.F. (1996). Theory and practice of nuclear spin relaxation in proteins. [Annu Rev Phys Chem.](#) 47:243-82.

D'Amato G, Cecchi L, Bonini S, Nunes C, Annesi-Maesano I, Behrendt H, Liccardi G, Popov T, van Cauwenberge P. (2007). Allergenic pollen and pollen allergy in Europe. *Allergy.* Sep;62(9):976-90

De-Paula, V.S., Razzera, G., Medeiros, L., Miyamoto, C.A., Almeida, M.S., Kurtenbach, E., Almeida, F.C., Valente, A.P. (2008). Evolutionary relationship between defensins in the Poaceae family strengthened by the characterization of new sugarcane defensins. *Plant Mol Biol* 68:321-335.

Dedic A., Gadermaier, G., Vogel, L., Ebner, C., Vieths, S., Ferreira, F., Egger, M. (2009). Immune recognition of novel isoforms and domains of the mugwort pollen major allergen Art v 1. *Mol Immunol.* 46(3):416-421.

de Groot, H., Brand, P.L., Fokkens, W.F., Berger, M.Y. (2007). Allergic rhinoconjunctivitis in children. *BMJ.* Nov 10;335(7627):985-8.

Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G.W., Zhu, G., Pfeifer, J., Bax, A. (1995). NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J Biomol NMR* 6:277–293.

Dethlefsen, L., McFall-Ngai, M., Relman, D.A. (2007). An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. *Nature.* Oct 18;449(7164):811-8.

Dillon, S.L., Lawrence, P.K., Henry, R.J. (2001). The use of ribosomal ITS to determine phylogenetic relationships within *Sorghum*. *Plant Syst Evol* 230:97–110.

Dosset, P., Hus, J.C., Blackledge, M., Marion, D. (2000). Efficient analysis of macromolecular rotational diffusion from heteronuclear relaxation data. *J Biomol NMR.* 16(1):23-8.

Dunker, A.K. (2007). Another window into disordered protein function. [Structure.](#) Sep;15(9):1026-8.

Dunker, A. K., Oldfield, C. J., Meng, J., Romero, P., Yang, J. Y., Chen, J. W., Vacic, V., Obradovic, Z. and Uversky, V. N. (2008). The unfoldomics decade: an update on intrinsically disordered proteins. *BMC Genomics* 2008, 9(2).

Duvignaud, J.B, Savard, C., Fromentin, R., Majeau, N., Leclerc, D., Gagné, S.M. (2009). Structure and dynamics of the N-terminal half of hepatitis C virus core protein: an intrinsically unstructured protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 378(1):27-31.

Dygert, S., Li, L.H., Don Florida, R., Thoma, J.A. (1965). Determination of reducing sugar with improved precision. *Anal Chem* 13:367–374.

Egorov, T.A., Odintsova, T.I., Pukhalsky, V.A., Grishim, E.V. (2005). Diversity of wheat anti-microbial peptides. *Peptides* 26:2064–2073.

Eisenmesser EZ, Bosco DA, Akke M, Kern D. (2002). Enzyme dynamics during catalysis. *Science.* Feb 22;295(5559):1520-3.

Fabozzi, G., Ascenzi, P., Renzi, S.D., Visca, P. (2006). Truncated hemoglobin GlbO from *Mycobacterium leprae* alleviates nitric oxide toxicity. *Microb Pathog* 40:211–220.

Fant, F., Vranken, W., Broekaert, W., Borremans, F. (1998). Determination of the three-dimensional solution structure of *Raphanus sativus* antifungal protein 1 by ¹H NMR. *J Mol Biol.* 279(1):257-70.

Farrow, N.A., Ranjith, M., Singer, A.U., Pascal, S.M., Kay, C., Gish, M., Shoelson, S.E., Pawson, T., Forman-Kay, J.D., Kay, L.E. (1994). Backbone dynamics of a free and phosphopeptidecomplexed Src homology 2 domain studied by ¹⁵N NMR relaxation. *Biochemistry* 33, 5984-6003.

Feis, A., Lapini, A., Catacchio, B., Brogioni, S., Foggi, P., Chiancone, E., Boffi, A., Smulevich, G. (2008). Unusually strong H-bonding to the heme ligand and fast geminate recombination dynamics of the carbon monoxide complex of *Bacillus subtilis* truncated hemoglobin. *Biochemistry* 47:902–910

Mittag, T., Forman-Kay, J.D. (2007). Atomic-level characterization of disordered protein ensembles. [Curr Opin Struct Biol.](#) Feb;17(1):3-14.

Freitas, T.A., Hou, S., Dioum, E.M., Saito, J.A., Newhouse, J., Gonzalez, G., Gilles-Gonzalez, M.A., Alam, M. (2004). Ancestral hemoglobins in Archaea. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:6675–6680.

Freitas, T.A., Saito, J.A., Hou, S., Alam, M. (2005). Globin-coupled sensors, protoglobins, and the last universal common ancestor. *J Inorg Biochem* 99:23–33.

Gajhede M, Osmark P, Poulsen FM, Ipsen H, Larsen JN, Joost van Neerven RJ, Schou C, Løwenstein H, Spangfort MD. (1996). X-ray and NMR structure of Bet v 1, the origin of birch pollen allergy. *Nat Struct Biol.* Dec;3(12):1040-5.

Gale, M., Moore, G., Devos, K. (2001). Rice—the pivotal genome in cereal comparative genetics. *Novartis Found Symp* 236:46–53.

Galli, S.J., Tsai, M., Piliponsky, A.M. (2008). The development of allergic inflammation. *Nature.* Jul 24;454(7203):445-54.

Gardiner, J., Schroeder, S., Polacco, M.L., Sanchez-Villeda, H., Fang, Z., Morgante, M. (2004). Anchoring 9,371 maize expressed sequence tagged unigenes to the bacterial artificial chromosome contig map by two-dimensional overgo hybridization. *Plant Physiol* 134:1317–1326.

Garrocho-Villegas, V., Gopalasubramaniam, S.K., Arredondo-Peter, R. (2007). Plant hemoglobins: what we know six decades after their discovery. *Gene* 398:78–85.

Gehlhar, K., Rajashankar, K.R., Hofmann, E., Betzel, C., Weber, W., Werner, S., Bufe, A. (2006). Lysine as a critical amino acid for IgE binding in Phl p 5b C terminus. *Int Arch Allergy Immunol.* 140(4):285-94. Epub 2006 May 21.

Giangiaco, I., Ilari, A., Bofia, A., Morea, V., Chiancone, E. (2005). The truncated oxygen-avid hemoglobin from *Bacillus subtilis*: X-ray structure and ligand binding properties. *J Biol Chem* 280:9192–9202.

Grabowski, M., Joachimiak, A., Otwinowski, Z., Minor, W. (2007). Structural genomics: keeping up with expanding knowledge of the protein universe. *Curr Opin Struct Biol* 17:347–353.

Grinverg, L.N., O'brien, P.J., Hrkal, Z. (1999). The effects of heme-binding proteins on the peroxidative and catalatic activities of hemin. *Free Radic Biol Med* 27:214–219.

Grzesiek e Bax. (1992). Correlating backbone amide and side-chain resonances in larger proteins by multiple relayed triple resonance NMR. *J. Am. Chem. Soc.*114: 6291-6293.

Güntert P. (2004). Automated NMR structure calculation with CYANA. *Methods Mol Biol.* 278:353-78.

Guntert, P., Mumenthaler, C., and Wuthrich, K. (1997). Torsion angle dynamics for NMR structure calculation with the new program DYANA. *J Mol Biol* 273, 283-298.

de Halleux, S., Stura, E., VanderElst, L., Carlier, V., Jacquemin, M., Saint-Remy, J.M. (2006). Three-dimensional structure and IgE-binding properties of mature fully active Der p 1, a clinically relevant major allergen. *J Allergy Clin Immunol.* Mar;117(3):571-6. Epub 2006 Jan 30.

Hammami, R., Ben Hamida, J., Vergoten, G., Fliss, I. PhytAMP: a database dedicated to antimicrobial plant peptides. (2009). *Nucleic Acids Res.* Jan;37 (Database issue):D963-8.

Hancock RE. (2001). Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infect Dis.* Oct;1(3):156-64.

Hardison, R. (1999). The effects of heme-binding proteins on the peroxidative and catalatic activities of hemin. *Am Sci* 87:126–137.

Hardison, R.C. (1996). [A brief history of hemoglobins: plant, animal, protist, and bacteria.](#) *Proc Natl Acad Sci USA* 93:5675–5679.

Henzler-Wildman, K., Kern, D. (2007). Dynamic personalities of proteins. *Nature* 13;450(7172):964-72.

Herrmann, T., Güntert, P. and Wüthrich, K. (2002a). Protein NMR structure determination with automated NOE-identification in the NOESY spectra using the new software ATNOS. *Journal of Biomolecular NMR*, 24: 171–189.

Herrmann, T., Güntert, P. and Wüthrich, K. (2002b). Protein NMR Structure Determination with Automated NOE Assignment Using the New Software CANDID and the Torsion Angle Dynamics Algorithm DYANA. *J. Mol. Biol.* 319, 209–227.

Hill, D.R., Belbin, T.J., Thorsteinsson, M.V., Bassam, D., Brass, S., Ernst, A., Böger, P., Paerl, H., Mulligan, M.E., Potts, M. (1996). GlnN (cyanoglobin) is a peripheral membrane protein that is restricted to certain *Nostoc* spp. *J Bacteriol* 178:6587–6598.

Himly, M., Jahn-Schmid, B., Dedic, A., Kelemen, P., Wopfner, N., Altmann, F., van Ree, R., Briza, P., Richter, K., Ebner, C., Ferreira, F. (2003). Art v 1, the major allergen of mugwort pollen, is a modular glycoprotein with a defensin-like and a hydroxyproline-rich domain. *FASEB J* 17:106-8.

Holm, L., Kääriäinen, S., Rosenström, P., Schenkel, A. (2008). Searching protein structure databases with DaliLite v.3. *Bioinformatics*. 24(23):2780-1.

Hornig, J.C., Raines, R.T. (2006). Stereoelectronic effects on polyproline conformation. *Protein Sci.* 15(1):74-83.

Hoy, J.A., Hargrove, M.S. (2008). The structure and function of plant hemoglobins. *Plant Physiol Biochem* 46:371–379.

Ilari, A., Kjelgaard, P., von Wachenfeldt, C., Catacchio, B., Chiancone, E., Boffi, A. (2007). Crystal structure and ligand binding properties of the truncated hemoglobin from *Geobacillus stearothermophilus*. *Arch Biochem Biophys* 457:85–94.

Jahn-Schmid, B., Fischer, G.F., Bohle, B., Faé, I., Gadermaier, G., Dedic, A., Ferreira, F., Ebner, C. (2005). Antigen presentation of the immunodominant T-cell epitope of the major mugwort pollen allergen, Art v 1, is associated with the expression of HLA-DRB1 *01. *J Allergy Clin Immunol.* 115(2):399-404.

Jahn-Schmid, B., Kelemen, P., Himly, M., Bohle, B., Fischer, G., Ferreira, F., Ebner, C. (2002). The T cell response to Art v 1, the major mugwort pollen allergen, is dominated by one epitope. *J. Immunol.* 169(10):6005-11.

James, E.K., Gyaneshwar, P., Mathan, N., Barraquio, W.L., Reddy, P.M., Iannetta, P.P., Olivares, F.L., Ladha, J.K. (2002). Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. *Mol Plant Microbe Interact* 15:894–906.

Jannoo, N., Grivet, L., Chantret, N., Garsmeur, O., Glaszmann, J.C., Arruda, P. (2007). Orthologous comparison in a gene-rich region among grasses reveals stability in the sugarcane polyploid genome. *Plant J* 50:574–585.

Jayasekera, N.P., Toma, T.P., Williams, A., Rajakulasingam, K. (2007). Mechanisms of immunotherapy in allergic rhinitis. *Biomed Pharmacother.* Jan;61(1):29-33. Epub 2006 Dec 5.

Jelinek, R., Kolusheva, S. (2005). Membrane interactions of host-defense peptides studied in model systems. *Curr Protein Pept Sci* 6:103–114.

Jia, J., Fu, J., Zheng, J., Zhou, X., Huai, J., Wang, J. (2006). Annotation and expression profile analysis of 2073 full-length cDNAs from stress-induced maize (*Zea mays* L.) seedlings. *Plant J* 48:710–727.

Juszczak, L., Dantsker, D., Samuni, U., Ouellet, Y.H., Savard, P.Y., Wittenberg, J.B., Wittenberg, B.A., Friedman, J.M., Guertin, M. (2003). Reactions of *Mycobacterium*

tuberculosis truncated hemoglobin O with ligands reveal a novel ligand-inclusive hydrogen bond network. *Biochemistry* 42:5764–5774.

Kaiser, L., Grönlund, H., Sandalova, T., Ljunggren, H.G., van Hage-Hamsten, M., Achour, A., Schneider, G. (2003). The crystal structure of the major cat allergen Fel d 1, a member of the secretoglobin family. [J Biol Chem](#). Sep 26;278(39):37730-5.

Kandu, S., Trent, J.T.III, Hargrove, M.S. (2003). [Plants, humans and hemoglobins](#). *Trends Plant Sci* 8:387–393.

Kanelis, V., Donaldson, L., Muhandiram, D.R., Rotin, D., Forman-Kay, J.D., Kay, L.E. (2000). Sequential assignment of proline-rich regions in proteins: application to modular binding domain complexes. *J Biomol NMR* 16:253-9.

Kay, L. E., Torchia, D. A., Bax, A. (1989) Backbone dynamics of proteins studied by ¹⁵N inverse detected heteronuclear NMR spectroscopy: application to staphylococcal nuclease. *Biochemistry* 28: 8972-8979.

Keller, R. (2004). *The Computer Aided Resonance Assignment Tutorial* first edition. ISBN 3-85600-112-3, CANTINA Verlag.

Kendrew, J. C., Dickerson, R. E., Strandberg, B.E., Hart, R.G., Davies, D.R., Phillips, D.C., Shore, V.C. (1960). Structure Of Myoglobin: A Three-Dimensional Fourier Synthesis At 2 Å Resolution. *Nature*. Feb 13;185:422-7.

Kolarich, D., Léonard, R., Hemmer, W., Altmann, F. (2005). The N-glycans of yellow jacket venom hyaluronidases and the protein sequence of its major isoform in *Vespa vulgaris*. *FEBS J*. Oct;272(20):5182-90.

Koshikawa, K., Yamamoto, Y., Kamimura, S., Matsuoka, A., Shikama, K. (1998). ¹H NMR study of dynamics and thermodynamics of acid-alkaline transition in ferric hemoglobin of a midge larva (*Tokunagayusurika akamusi*). *Biochem Biophys Acta* 1385:89–100.

Koskenkorva T, Frey AD, Kallio PT. (2006). Characterization of heterologous hemoglobin and flavohemoglobin promoter regulation in *Escherichia coli*. *J Biotechnol*. Mar 23;122(2):161-75.

Krane, S.M. (2008). The importance of proline residues in the structure, stability and susceptibility to proteolytic degradation of collagens. *Amino Acids*. 35(4):703-10.

Kumaki, Y., Kawano, K., Hikichi, K., Matsumoto, T., Matsushima, N. (2008). A circular loop of the 16-residue repeating unit in ice nucleation protein. *Biochem Biophys Res Commun*. Jun 20;371(1):5-9.

Kushmerick, C., de Souza Castro, M., Santos Cruz, J., Bloch, C. Jr., Beirão, P.S. (1998). Functional and structural features of gamma-zethionins, a new class of sodium channel blockers. *FEBS Lett* 440:302–306.

Kvist, M., Ryabova, E.S., Nordlander, E., Biilow, L. (2007). An investigation of the peroxidase activity of *Vitreoscilla* hemoglobin. *J Biol Inorg Chem* 12:324–334.

Leher, R.I., Rosenman, M., Fragel-Madeira, L., Medeiros, L.N., Cabral, L.M., Faria, J. et al. (1991) Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial poly-peptides. *J Immunol Methods* 137:167-173.

Lama, A., Pawaria, S., Dikshit, K.L. (2006). Oxygen binding and NO scavenging properties of truncated hemoglobin, HbN, of *Mycobacterium smegmatis*. *FEBS Lett* 580:4031–4041.

Larché, M., Akdis, C.A., and Valenta, R. (2006). Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy, *Nat Rev Immunol* 6, pp. 761–771.

[Larché, M., Wraith, D.C.](#) (2005). Peptide-based therapeutic vaccines for allergic and autoimmune diseases. [Nat Med.](#) 11(4):69-76.

Laskowski, R.A., Rullmann, J.A., MacArthur, M.W., Kaptein, R., Thornton, J.M. (1996) [AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR.](#) *J Biomol NMR.* 8(4):477-86.

Lay, F.T., Schirra, H.J., Scanlon, M.J., Anderson, M.A., Craik, D.J. (2003). The three-dimensional solution structure of NaD1, a new floral defensin from *Nicotiana glauca* and its application to a homology model of the crop defense protein alfAFP. *J Mol Biol* 325:175–188.

Lecomte, J.T., Scott, N.L., Vu, B.C., Falzone, C.J. (2001). Binding of ferric heme by the recombinant globin from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochemistry.* May 29;40(21):6541-52.

Lecomte, J.T., Vuletich, D.A., Lesk, A.M. (2005). Structural divergence and distant relationships in proteins: evolution of the globins. *Curr Opin Struct Biol* 15:290–301.

Lehrer, R.I., Rosenman, M., Harwig, S.S.S.L., Jackson, R., Eisenhauer, P. (1991) Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides. *J Immunol Methods* 137:167–173.

Leonard, R., Petersen, B.O., Himly, M., Kaar, W., Wopfner, N., Kolarich, D., van Ree, R., Ebner, C., Duus, J.Ø., Ferreira, F., Altmann, F. (2005). [Two novel types of O-glycans on the mugwort pollen allergen Art v 1 and their role in antibody binding.](#) *J Biol Chem.* 4;280(9):7932-40.

Linge JP, Habeck M, Rieping W, Nilges M. (2003). ARIA: automated NOE assignment and NMR structure calculation. *Bioinformatics.* 2003 Jan 22;19(2):315-6.

Lipari, G., and Szabo, A. (1982a). Model-free approach to the interpretation of nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. 1. Theory and range of validity. *J Am Chem Soc* 104, 4546-4559.

Lipari, G., and Szabo, A. (1982b). Model-free approach to the interpretation of nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. 2. Analysis of experimental results. *J Am Chem Soc* 104, 4559-4570.

Lobo, D.S., Pereira, I.B., Fragel-Madeira, L., Medeiros, L.N., Cabral, L.M., Faria, J. (2007). Antifungal *Pisum sativum* defensin 1 interacts with *Neurospora crassa* cyclin F related to the cell cycle. *Biochemistry* 46:987–996.

Lu, C., Egawa, T., Wainwright, L.M., Poole, R.K., Yeh, S.R. (2007). Structural and functional properties of a truncated hemoglobin from a food-borne pathogen *Campylobacter jejuni*. *J Biol Chem* 282:13627–13636.

Luz, Z., Meiboom, S. (1963) Nuclear magnetic resonance study of protolysis of trimethylammonium ion in aqueous solution – order of reaction with respect to solvent. *J. Chem. Phys.* 39: 366-370.

Matsushima, N., Yoshida, H., Kumaki, Y., Kamiya, M., Tanaka, T., Izumi, Y., Kretsinger, R.H. (2008). [Flexible structures and ligand interactions of tandem repeats consisting of proline, glycine, asparagine, serine, and/or threonine rich oligopeptides in proteins.](#) *Curr Protein Pept Sci.* 9(6):591-610.

Milani, M., Pesce, A., Bolognesi, M., Ascenzi, P. (2001). *Biochem Mol Biol Educ* 29:123–125.

Milani, M., Pesce, A., Ouellet, Y., Ascenzi, P., Guertin, M., Bolognesi, M. (2001). *Mycobacterium tuberculosis* hemoglobin N displays a protein tunnel suited for O₂ diffusion to the heme. *EMBO J* 20:3902–3909.

Milani, M., Savard, P.Y., Ouellet, H., Ascenzi, P., Guertin, M., Bolognesi, M. (2003). A TyrCD1/TrpG8 hydrogen bond network and a TyrB10TyrCD1 covalent link shape the heme distal site of *Mycobacterium tuberculosis* hemoglobin O. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:5766–5771.

Mirza, O., Henriksen, A., Ipsen, H., Larsen, J.N., Wissenbach, M., Spangfort, M.D., and Gajhede, M. (2000). Dominant epitopes and allergic cross-reactivity: complex formation between a Fab fragment of a monoclonal murine IgG antibody and the major allergen from birch pollen Bet v 1. *J. Immunol.* 165, 331–338.

[Moreau, V., Fleury, C., Piquer, D., Nguyen, C., Novali, N., Villard, S., Laune, D., Granier, C., Molina, F.](#) (2008). PEPOP: computational design of immunogenic peptides. [BMC Bioinformatics.](#) 9:71.

Mun, J.H., Mun, J.H., Kim, D.J., Choi, H.K., Gish, J., Debellé, F., Mudge, J., Denny, R., Endré, G., Saurat, O., Duzde, A.M., Kiss, G.B., Roe, B., Young, N.D., Cook, D.R. (2006). Distribution of microsatellites in the genome of *Medicago truncatula*: a resource of genetic markers that integrate genetic and physical maps. *Genetics* 172(4):2541–2555.

Naik, M. T., Chang, C., Kuo, I., Camy, Kung, C.-H., Yi, F.-C., Chua, K.-Y., and Huang, T.H. (2008). Roles of Structure and Structural Dynamics in the Antibody Recognition

of the Allergen Proteins: An NMR Study on *Blomia tropicalis* Major Allergen. *Structure* 16, 125–136.

Nascimento, C.J., Bloch Jr, C. (2001). Ressonância Magnética Nuclear: gradus primus. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*. 21: 52-61.

Neudecker, P., Nerkamp, J., Eisenmann, A., Nourse, A., Lauber, T., Schweimer, K., Lehmann, K., Schwarzinger, S., Ferreira, F., Rösch, P. (2004). [Solution structure, dynamics, and hydrodynamics of the calcium-bound cross-reactive birch pollen allergen Bet v 4 reveal a canonical monomeric two EF-hand assembly with a regulatory function.](#) *J Mol Biol.* 5;336(5):1141-57.

Niederberger, V., Valenta, R. (2006). Molecular approaches for new vaccines against allergy. *Expert Rev Vaccines*. Feb;5(1):103-10.

Nimrod, G., Schushan, M., Steinberg, D.M., Ben-Tal, N. (2008). Detection of functionally important regions in "hypothetical proteins" of known structure. *Structure*. Dec 10;16(12):1755-63.

Nitti, G., Orru, S., Bloch, C. Jr., Morhy, L., Marino, G., Pucci, P. (1995). Amino acid sequence and disulphide-bridge pattern of three gamma-thionins from *Sorghum bicolor*. *Eur J Biochem* 228:250–256.

Notredame, C., Higgins, D., Heringa, J. (2000). T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol* 302:205–217.

Oezguen, N., Zhou, B., Negi, S.S., Ivanciuc, O., Schein, C.H., Labesse, G., Braun, W. (2008). [Comprehensive 3D-modeling of allergenic proteins and amino acid composition of potential conformational IgE epitopes.](#) *Mol Immunol.* 45(14):3740-7.

Ouellet, H., Ranguelova, K., Labarre, M., Wittenberg, J.B., Wittenberg, B.A., Magliozzo, R.S., Guertin, M. (2007). Reaction of *Mycobacterium tuberculosis* truncated hemoglobin O with hydrogen peroxide: evidence for peroxidatic activity and formation of protein-based radicals. *J Biol Chem* 282:7491–7503.

[Padavattan, S., Schirmer, T., Schmidt, M., Akdis, C., Valenta, R., Mittermann, I., Soldatova, L., Slater, J., Mueller, U., Markovic-Housley, Z.](#) (2007). Identification of a B-cell epitope of hyaluronidase, a major bee venom allergen, from its crystal structure in complex with a specific Fab. *J Mol Biol.* 4;368(3):742-52.

Palmer, A. G. (2001). NMR probes of molecular dynamics: Overview and comparison with other techniques. *Annu. Rev. Biophys. Biomolec. Struct.* 30, 129-155.

Pan, Y.B., Burner, D.M., Legendre, B.L. (2000). An assessment of the phylogenetic relationship among sugarcane and related taxa based on the nucleotide sequence of 5S rRNA intergenic spacers. *Genetica* 108:285–295.

Pattaramanon, N., Sangha, N., Gafni, A. (2007). The carboxy-terminal domain of heat-shock factor 1 is largely unfolded but can be induced to collapse into a compact, partially structured state. *Biochemistry*. Mar 20;46(11):3405-15.

Pauli, G., Purohit, A., Oster, J.P., De Blay, F., Vrtala, S., Niederberger, V., Kraft, D., Valenta, R. (2000). Comparison of genetically engineered hypoallergenic rBet v 1 derivatives with rBet v 1 wild-type by skin prick and intradermal testing: results obtained in a French population. *Clin Exp Allergy*. Aug;30(8):1076-84.

Pawaria, S., Lama, A., Raje, M., Dikshit, K.L. (2008). Responses of Mycobacterium tuberculosis hemoglobin promoters to in vitro and in vivo growth conditions. *Appl Environ Microbiol*. Jun;74(11):3512-22.

Pelegri, P.B., Franco, O.L. (2005). Plant c-thionins: novel insights on the mechanism of action of a multi-functional class of defense proteins. *Int J Biochem Cell Biol* 37:2239–2253.

Peng, Z., Naclerio, R.M., Norman, P.S., Adkinson, Jr N.F. (1992). Quantitative IgE and IgG subclass responses during and after long-term ragweed immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 9:519-529.

Perutz MF, Muirhead H, Cox JM, Goaman LC, Mathews FS, McGandy EL, Webb LE. (1968). [Three-dimensional Fourier synthesis of horse oxyhaemoglobin at 2.8 Å resolution: \(1\) x-ray analysis](#). *Nature*. Jul 6;219(5149):29-32.

Perutz, M.F., Muirhead, H., Cox, J.M., Goaman, L.C. (1968). Three-dimensional Fourier synthesis of horse oxyhaemoglobin at 2.8 Å resolution: the atomic model. *Nature*. Jul 13;219(5150):131-9.

Perutz, M.F., Paoli, M., Lesk, A.M. (1999). Fix L, a haemoglobin that acts as an oxygen sensor: signalling mechanism and structural basis of its homology with PAS domains. *Chem Biol* 6:291–297.

Pesce, A., Couture, M., Dewilde, S., Guertin, M., Yamauchi, K., Ascenzi, P., Moens, L., Bolognesi, M. (2000). A novel two-over-two alpha-helical sandwich fold is characteristic of the truncated hemoglobin family. *EMBO J* 19:2424–2434.

Peschel, A. (2002). How do bacteria resist human antimicrobial peptides? *Trends Microbiol* 10:179–186.

Peschel, A., Sahl, H.G. (2006). The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nat Rev Microbiol* 4:529–536.

Piotto, M., Saudek, V., Sklenar, V. (1992). Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *J Biomol NMR* 2:661–665.

Potts, M., Angeloni, S.V., Ebel, R.E., Bassam, D. (1992). Myoglobin in a cyanobacterium. *Science* 256:1690–1691.

Razzera, G., Vernal, J., Baruh, D., Serpa, V.I., Tavares, C., Lara, F., Souza, E.M., Pedrosa, F.O., Almeida, F.C., Terenzi, H., Valente, A.P. (2008) Spectroscopic

characterization of a truncated hemoglobin from the nitrogen-fixing bacterium *Herbaspirillum seropedicae*. *J Biol Inorg Chem*. Sep;13(7):1085-96.

Reddy, K.V., Yedery, R.D., Aranha, C. (2004). Antimicrobial peptides: premises and promises. *Int J Antimicrob Agents*. Dec;24(6):536-47.

Rivera, M., Caignan, G.A. (2004). Recent developments in the ¹³C NMR spectroscopic analysis of paramagnetic hemes and heme proteins. *Anal Bioanal Chem*. Mar;378(6):1464-83.

Rondeau, P., Rouch, C., Besnard, G. (2005). NADP-malate dehydrogenase gene evolution in *Andropogoneae* (Poaceae): gene duplication followed by sub-functionalization. *Ann Bot (Lond)* 96:1307–1314.

Rouvinen, J., Rautiainen, J., Virtanen, T., Zeiler, T., Kauppinen, J., Taivainen, A., Mäntyjärvi, R. (1999). Probing the molecular basis of allergy. three-dimensional structure of the bovine lipocalin allergen Bos d 2. *J Biol Chem*. Jan 22;274(4):2337-43.

Royer, W.E. Jr., Knapp, J.E., Strand, K., Heaslet, H.A. (2001). Cooperative hemoglobins: conserved fold, diverse quaternary assemblies and allosteric mechanisms. *Trends Biochem Sci*. May;26(5):297-304.

Saccetti, E. & Rosato, A. (2008). The war of tools: how can NMR spectroscopists detect errors in their structures? *J Biomol NMR*.40 (4):251-261.

Sanders, J.K.M., Hunter, B.K. (1993) *em Modern NMR spectroscopy – a guide for chemists*. Oxford University Press, New York.

Sattler, M., Schleucher, J., Griesinger, C. (1999) Heteronuclear multidimensional NMR experiments for the determination of proteins in solution employing pulsed field gradients. *Prog NMR Spectrosc*. 34: 95-158.

Schimoler-O'Rourke, R., Richardson, M., Selitrenniko, C.P. (2001). Zeamatin inhibits trypsin and α -amylase activities. *Appl Environ Microbiol* 67:2365–2366.

Schmid-Grendelmeier, P., Holzmann, D., Himly, M., Weichel, M., Tresch, S., Rückert, B., Menz, G., Ferreira, F., Blaser, K., Wüthrich, B., Cramer, R. (2003). Native Art v 1 and recombinant Art v 1 are able to induce humoral and T cell-mediated in vitro and in vivo responses in mugwort allergy. *J Allergy Clin Immunol* 111:1328-36.

Schweers, O., Schönbrunn-Hanebeck, E., Marx, A., Mandelkow, E. (1994). Structural studies of tau protein and Alzheimer paired helical filaments show no evidence for beta-structure. *J Biol Chem*. 269(39):24290-24297.

Scott, N.L., Lecomte, J.T. (2000). [Cloning, expression, purification, and preliminary characterization of a putative hemoglobin from the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803](#). *Protein Sci* 9:587–597.

Seki, M., Narusaka, M., Kamiya, A., Ishida, J., Satou, M., Sakurai, T. (2002). Functional annotation of a full-length Arabidopsis cDNA collection. *Science* 296:141–145.

Sen, M., Kopper R., Pons, L., Abraham, E.C., Burks, A.W., Bannon, G.A. (2002). Protein structure plays a critical role in peanut allergen stability and may determine immunodominant IgE-binding epitopes. *J Immunol.* 169(2):882-887.

Shägger, H., von Jagow, G. (1987). [Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa](#). *Anal Biochem* 166:368–379.

Shai, Y. (2002). Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers* 66:236–248.

Sharopova, N. McMullen, M.D., Schultz, L., Schroeder, S., Sanchez-Villeda, H., Gardiner, J., Bergstrom, D., Houchins, K., Melia-Hancock, S., Musket, T., Duru, N., Polacco, M., Edwards, K., Ruff, T., Register, J.C., Brouwer, C., Thompson, R., Velasco, R., Chin, E., Lee, M., Woodman-Clikeman, W., Long, M.J., Liscum, E., Cone, K., Davis, G., Coe, E.H. Jr. (2002). Development and mapping of SSR markers for maize. *Plant Mol Biol* 48(5–6):463–481.

Sheffield, P., Garrard, S., Derewenda, Z. (1999). Overcoming expression and purification problems of RhoGDI using a family of "parallel" expression vectors. *Protein Expr Purif* 15:34-9.

Shokhireva, T.K., Shokhirev, N.V., Walker, F.A. (2003). [Assignment of the ferriheme resonances of the high-spin forms of nitrophorins 1 and 4 by 1H NMR spectroscopy: comparison to structural data obtained from X-ray crystallography](#). *Biochemistry* 42:679–693.

Shokhireva, T.K.H., Weichsel, A., Smith, K.M., Berry, R.E., Shokhirev, N.V., Balfour, C.A., Zhang, H., Montfort, W.R., Walker, F.A. (2008). Assignment of the ferriheme resonances of high- and low-spin forms of the symmetrical heme-reconstituted nitrophorins 1-4 by 1H and 13C NMR spectroscopy: the dynamics of heme ruffling deformations *Inorg Chem* 46:2041–2056

Sickmeier, M., Hamilton, J.A., LeGall, T., Vacic, V., Cortese, M.S., Tantos, A., Szabo, B., Tompa, P., Chen, J., Uversky, V.N., Obradovic, Z., Dunker, A.K. (2006). DisProt: the Database of Disordered Proteins. *Nucleic Acids Res.* 2007 Jan;35(Database issue):D786-93.

Silverstein, R. M., Bassler, G. C. E Morril, T. C. (1979) em Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. Koogan S.A.

Silverstein, K.A., Moskal, W.A. Jr., Wu, H.C., Underwood, B.A., Graham, M.A., Town, C.D., VandenBosch, K.A. (2007). Small cysteine-rich peptides resembling antimicrobial peptides have been under-predicted in plants. *Plant J* 51:262–280.

Spronk, C.A., Nabuurs, S.B., Bonvin, A.M., Krieger, E., Vuister, G.W., Vriend, G. (2003). The precision of NMR structure ensembles revisited. *J Biomol NMR* 25:225–234.

Stewart, E.J., A° slund, F., Beckwith, J. (1998). Disulfide bond formation in the *Escherichia coli* cytoplasm: an in vivo role reversal for the thioredoxins. *EMBO J* 17:5543–5550.

Stivers, J.T., Abeygunawardana, C., Mildvan, A.S. (1996) ¹⁵N NMR relaxation studies of free and inhibitor-bound 4-oxalocrotonate tautomerase: backbone dynamics and entropy changes of an enzyme upon inhibitor binding. *Biochemistry* 35: 16036-16047.

Takahashi, S., Furukawa, T., Asano, T., Terajima, Y., Shimada, H., Sugimoto, A. (2005). Very close relationship of the chloroplast genomes among *Saccharum* species. *Theor Appl Genet* 110:1523–1529.

Tanabe, S. (2007). Epitope peptides and immunotherapy. *Curr Protein Pept Sci*. Feb;8(1):109-18.

Tavares, L.S., Santos, M. de O., Viccini, L.F., Moreira, J.S., Miller, R.N., Franco, O.L. (2008). Biotechnological potential of antimicrobial peptides from flowers. *Peptides*. Oct;29(10):1842-51.

Terras, F.R., Schoofs, H.M., De Bolle, M.F., Van Leuven, F., Rees, S.B., Vanderleyden, J. (1992) Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *J Biol Chem* 267:15301–15309.

Thevissen, K., Cammue, B.P., Lemaire, K., Winderickx, J., Dickson, R.C., Lester, R.L., Ferket, K.K., Van Even, F., Parret, A.H., Broekaert, W.F. (2000). A gene encoding a sphingolipid biosynthesis enzyme determines the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to an antifungal plant defensin from dahlia (*Dahlia merckii*). *Proc Natl Acad Sci USA* 15;97(17):9531–9536.

Thevissen, K., Ferket, K.K., François, I.E., Cammue, B.P. (2003). Interactions of antifungal plant defensins with fungal membrane components. *Peptides* 24:1705–1712.

Thevissen, K., Warnecke, D.C., François, E.J.A., Leipelt, M., Heinz, E., Ott, C. (2004). Defensins from insects plants interact with fungal glucosylceramides. *J Biol Chem* 279:3900–3905.

Thomma, B.P.H.J., Cammue, B.P.A., and Thevissen, K. (2002). Plant Defensins. *Planta* 216: 193-202.

Thorsteinsson, M.V., Bevan, D.R., Ebel, R.E., Weber, R.E., Potts, M. (1996). Spectroscopical and functional characterization of the hemoglobin of *Nostoc commune* (UTEX 584 (Cyanobacterial)). *Biochim Biophys Acta* 1292:133–139.

Till, S.J., Francis, J.N., Nouri-Aria, K., Durham, S.R. (2004) Mechanisms of immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol.* Jun;113(6):1025-34.

Tompa, (2002). Intrinsically unstructured proteins. [Trends Biochem Sci.](#) Oct;27(10):527-33.

Traidl-Hoffmann, C., Jakob, T., Behrendt, H. (2009). Determinants of allergenicity. *J Allergy Clin Immunol.* Jan 17. (in press).

Treviño, M.A., García-Mayoral, M.F., Barral, P., Villalba, M., Santoro, J., Rico, M., Rodríguez, R., Bruix, M. (2004). [NMR solution structure of Ole e 6, a major allergen from olive tree pollen.](#) *J Biol Chem.* 279(37):39035-41.

Trompette, A., Divanovic, S., Visintin, A., Blanchard, C., Hegde, R.S., Madan, R., Thorne, P.S., Wills-Karp, M., Gioannini, T.L., Weiss, J.P., Karp, C.L. (2009). Allergenicity resulting from functional mimicry of a Toll-like receptor complex protein. *Nature.* Jan 29;457(7229):585-8.

Tuskan, G.A., Difazio, S., Jansson, S., Bohlmann, J., Grigoriev, I., Hellsten, U., Putnam, N., Ralph, S., Rombauts, S., Salamov, A., Schein, J., Sterck, L., Aerts, A., Bhalerao, R.R., Bhalerao, R.P., Blaudez, D., Boerjan, W., Brun, A., Brunner, A., Busov, V., Campbell, M., Carlson, J., Chalot, M., Chapman, J., Chen, G.L., Cooper, D., Coutinho, P.M., Couturier, J., Covert, S., Cronk, Q., Cunningham, R., Davis, J., Degroeve, S., Déjardin, A., Depamphilis, C., Detter, J., Dirks, B., Dubchak, I., Duplessis, S., Ehrling, J., Ellis, B., Gendler, K., Goodstein, D., Gribskov, M., Grimwood, J., Groover, A., Gunter, L., Hamberger, B., Heinze, B., Helariutta, Y., Henrissat, B., Holligan, D., Holt, R., Huang, W., Islam-Faridi, N., Jones, S., Jones-Rhoades, M., Jorgensen, R., Joshi, C., Kangasjärvi, J., Karlsson, J., Kelleher, C., Kirkpatrick, R., Kirst, M., Kohler, A., Kalluri, U., Larimer, F., Leebens-Mack, J., Leplé, J.C., Locascio, P., Lou, Y., Lucas, S., Martin, F., Montanini, B., Napoli, C., Nelson, D.R., Nelson, C., Nieminen, K., Nilsson, O., Pereda, V., Peter, G., Philippe, R., Pilate, G., Poliakov, A., Razumovskaya, J., Richardson, P., Rinaldi, C., Ritland, K., Rouzé, P., Ryaboy, D., Schmutz, J., Schrader, J., Segerman, B., Shin, H., Siddiqui, A., Sterky, F., Terry, A., Tsai, C.J., Uberbacher, E., Unneberg, P., Vahala, J., Wall, K., Wessler, S., Yang, G., Yin, T., Douglas, C., Marra, M., Sandberg, G., Van de Peer, Y., Rokhsar, D. (2006). The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* 15;313(5793):1596–1604.

Uzan, J., Dewilde, S., Burmester, T., Hankeln, T., Moens, L., Hamdane, D., Marden, M.C., Kiger, L. (2004). [Neuroglobin and other hexacoordinated hemoglobins show a weak temperature dependence of oxygen binding.](#) *Biophys J* 87:1196–1204.

Valenta, R., and Niederberger, V. (2007). [Recombinant allergens for immunotherapy.](#) *J Allergy Clin Immunol.* 119(4):826-30.

Valenta, R., Kraft, D. (2002). [From allergen structure to new forms of allergen-specific immunotherapy](#). *Curr Opin Immunol.* 14(6):718-27.

Valente, A.P., Miyamoto, C.A., Almeida, F.C. (2006). [Implications of protein conformational diversity for binding and development of new biological active compounds](#). *Curr Med Chem.* 13(30):3697-703.

Veldkamp, C.T., Peterson, F.C., Hayes, P.L., Mattmiller, J.E., Haugner, J.C., de la Cruz, N. (2007). On-column refolding of recombinant chemokines for NMR studies and biological assays. *Protein Expr Purif* 52:202–209.

Venarske, D. & deShazo, R.D. (2003). [Molecular mechanisms of allergic disease](#). *South Med J.* 2003 Nov;96 (11):1049-54.

Vettore, A.L., da Silva, F.R., Kemper, E.L., Souza, G.M., da Silva, A.M., Ferro, M.I., Henrique-Silva, F., Giglioti, E.A., Lemos, M.V., Coutinho, L.L., Nobrega, M.P., Carrer, H., França, S.C., Bacci-Júnior, M., Goldman, M.H., Gomes, S.L., Nunes, L.R., Camargo, L.E., Siqueira, W.J., Van Sluys, M.A., Thiemann, O.H., Kuramae, E.E., Santelli, R.V., Marino, C.L., Targon, M.L., Ferro, J.A., Silveira, H.C., Marini, D.C., Lemos, E.G., Monteiro-Vitorello, C.B., Tambor, J.H., Carraro, D.M., Roberto, P.G., Martins, V.G., Goldman, G.H., de Oliveira, R.C., Truffi, D., Colombo, C.A., Rossi, M., de Araujo, P.G., Sculaccio, S.A., Angella, A., Lima, M.M., de Rosa Júnior, V.E., Siviero, F., Coscrato, V.E., Machado, M.A., Grivet, L., Di Mauro, S.M., Nobrega, F.G., Menck, C.F., Braga, M.D., Telles, G.P., Cara, F.A., Pedrosa, G., Meidanis, J., Arruda, P. (2003). Analysis and functional annotation of an expressed sequence tag collection for tropical crop sugarcane. *Genome Res* 13(12):2725–2735.

Vinogradov, S.N., Hoogewijs, D., Bailly, X., Arredondo-Peter, R., Gough, J., Dewilde, S., Moens, L., Vanfleteren, J.R. (2006). A phylogenomic profile of globins. *BMC Evol Biol* 6:31.

Vrtala, S., Hirtenlehner, K., Vangelista, L., Pastore, A., Eichler, H.G., Sperr, W.R., Valent, P., Ebner, C., Kraft, D., Valenta, R. (1997). Division of the major birch pollen allergen, Bet v 1, into two non-anaphylactic fragments. *Int Arch Allergy Immunol.* May-Jul;113(1-3):246-8.

Vrtala, S., Hirtenlehner, K., Susani, M., Akdis, M., Kussebi, F., Akdis, C.A., Blaser, K., Hufnagl, P., Binder, B.R., Politou, A., Pastore, A., Vangelista, L., Sperr, W.R., Semper, H., Valent, P., Ebner, C., Kraft, D., Valenta, R. (2001). Genetic engineering of a hypoallergenic trimer of the major birch pollen allergen Bet v 1. [FASEB J.](#) Sep;15(11):2045-7.

Vrtala, S., Focke-Tejkl, M., Swoboda, I., Kraft, D., Valenta, R. (2004). Strategies for converting allergens into hypoallergenic vaccine candidates. *Methods.* Mar 32(3):313-20.

Vuletich, D.A., Lecomte, J.T. (2006). [A phylogenetic and structural analysis of truncated hemoglobins](#). *J Mol Evol* 62:196–210.

Wainwright, L.M., Wang, Y., Park, S.F., Yeh, S.R., Poole, R.K. (2006). Purification and spectroscopic characterization of Ctb, a group III truncated hemoglobin implicated in oxygen metabolism in the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni*. *Biochemistry* 45:6003–6011.

Wajcman, H., Kiger, L. (2002) Hemoglobin, from microorganisms to man: a single structural motif, multiple functions. *C R Biol. Dec*;325(12):1159-74.

Walgraffe, D., Mattéotti, C., El Bakkoury, M., Garcia, L., Marchand, C., Bullens, D., Vandenbranden, M., Jacquet, A. (2009). A hypoallergenic variant of Der p 1 as a candidate for mite allergy vaccines. *J Allergy Clin Immunol*. Jan 17.

Wallner, M., Stöcklinger, A., Thalhamer, T., Bohle, B., Vogel, L., Briza, P., Breiteneder, H., Vieths, S., Hartl, A., Mari, A., Ebner, C., Lackner, P., Hammerl, P., Thalhamer, J., Ferreira, F. (2007). Allergy multivaccines created by DNA shuffling of tree pollen allergens. *J Allergy Clin Immunol* 120:374-80.

Wang Z, Wang G. APD: the Antimicrobial Peptide Database. *Nucleic Acids Res*. 2004 Jan 1;32(Database issue):D590-2.

Watts, R.A., Hunt, P.W., Hvitved, A.N., Hargrove, M.S., Peacock, W.J., Dennis, E.S. (2001). A hemoglobin from plants homologous to truncated hemoglobins of microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:10119–10124.

Weber, R.E., Fago, A. (2004). [Functional adaptation and its molecular basis in vertebrate hemoglobins, neuroglobins and cytoglobins.](#) *Respir Physiol Neurobiol* 144:141–159.

Wild, C., Wallner, M., Hufnagl, K., Fuchs, H., Hoffmann-Sommergruber, K., Breiteneder, H., Scheiner, O., Ferreira, F., Wiedermann, U. (2007). A recombinant allergen chimer as novel mucosal vaccine candidate for prevention of multi-sensitivities. *Allergy* 62:33-41.

Wishart, D.S., Bigam, C.G., Yao, J., Abildgaard, F., Dyson, H.J., Oldfield, E., Markley, J.L., Sykes, B.D. (1995). ^1H , ^{13}C and ^{15}N chemical shift referencing in biomolecular NMR. *J Biomol NMR* 6:135-40.

Wishart, D.S., Sykes, B.D. (1994). The ^{13}C chemical-shift index: a simple method for the identification of protein secondary structure using ^{13}C chemical-shift data. *J Biomol NMR* 4:171-80.

Wittenberg, J.B., Bolognesi, M., Wittenberg, B.A., Guertin, M. (2002). Truncated hemoglobins: a new family of hemoglobins widely distributed in bacteria, unicellular eukaryotes, and plants. *J Biol Chem* 277:871–874.

Wolf-Watz, M., Thai, V., Henzler-Wildman, K., Hadjipavlou, G., Eisenmesser, E.Z., Kern, D. (2004). Linkage between dynamics and catalysis in a thermophilic-mesophilic enzyme pair. *Nat Struct Mol Biol.* Oct;11(10):945-9.

Wright, P.E., Dyson, H.J. (1999). Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm. *J Mol Biol.* Oct 22;293(2):321-31.

Wu, G., Wainwright, L.M., Poole, R.K. (2003). Microbial globins. *Adv Microb Physiol* 47:255–310.

Wultrich, K. (1986) *em NMR of proteins and Nucleic Acids.* Jon Wiley and Sons, New York.

Xu, Y., Wu, J., Gorenstein, D., Braun, W. (1999). Automated 2D NOESY assignment and structure calculation of Crambin(S22/I25) with the self-correcting distance geometry based NOAH/DIAMOD programs. *J Magn Reson.* Jan;136(1):76-85.

Yang, D., Kay, L.E. (1996). Contributions to conformational entropy arising from bond vector fluctuations measured from NMR-derived order parameters: application to protein folding. *J Mol Biol.* Oct 25;263(2):369-82.

Yeh, D.C., Thorsteinsson, M.V., Bevan, D.R., Potts, M., La Mar, G.N. (2000). Solution ¹H NMR study of the heme cavity and folding topology of the abbreviated chain 118-residue globin from the cyanobacterium *Nostoc commune*. *Biochemistry* 39:1389–1399.

Yount, N.Y., Yeaman, M.R. (2004). Multidimensional signatures in antimicrobial peptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:7363–7368.

Yount, N.Y., Yeaman, M.R. (2006). Structural congruence among membrane-active host defense polypeptides of diverse phylogeny. *Biochim Biophys Acta* 1758:1373–1386.

Yu, J., Wang, J., Lin, W., Li, S., Li, H., Zhou, J., Ni, P., Dong, W., Hu, S., Zeng, C., Zhang, J., Zhang, Y., Li, R., Xu, Z., Li, S., Li, X., Zheng, H., Cong, L., Lin, L., Yin, J., Geng, J., Li, G., Shi, J., Liu, J., Lv, H., Li, J., Wang, J., Deng, Y., Ran, L., Shi, X., Wang, X., Wu, Q., Li, C., Ren, X., Wang, J., Wang, X., Li, D., Liu, D., Zhang, X., Ji, Z., Zhao, W., Sun, Y., Zhang, Z., Bao, J., Han, Y., Dong, L., Ji, J., Chen, P., Wu, S., Liu, J., Xiao, Y., Bu, D., Tan, J., Yang, L., Ye, C., Zhang, J., Xu, J., Zhou, Y., Yu, Y., Zhang, B., Zhuang, S., Wei, H., Liu, B., Lei, M., Yu, H., Li, Y., Xu, H., Wei, S., He, X., Fang, L., Zhang, Z., Zhang, Y., Huang, X., Su, Z., Tong, W., Li, J., Tong, Z., Li, S., Ye, J., Wang, L., Fang, L., Lei, T., Chen, C., Chen, H., Xu, Z., Li, H., Huang, H., Zhang, F., Xu, H., Li, N., Zhao, C., Li, S., Dong, L., Huang, Y., Li, L., Xi, Y., Qi, Q., Li, W., Zhang, B., Hu, W., Zhang, Y., Tian, X., Jiao, Y., Liang, X., Jin, J., Gao, L., Zheng, W., Hao, B., Liu, S., Wang, W., Yuan, L., Cao, M., McDermott, J., Samudrala, R., Wang, J., Wong, G.K., Yang, H. (2005). The genomes of *Oryza sativa*: a history of duplications. *PLoS Biol* 3:E38.

de Zélicourt, A., Letousey, P., Thoiron, S., Campion, C., Simoneau, P., Elmorjani, K., Marion, D., Simier, P., Delavault, P. (2007). Ha-DEF1, a sunflower defensin, induces cell death in Orobanche parasitic plants. *Planta*. Aug;226(3):591-600.

Zhang Y, Stec B, Godzik A. (2007). Between order and disorder in protein structures: analysis of "dual personality" fragments in proteins [Structure. Sep;15\(9\):1026-8.](#)

Zidek L, Novotny MV, Stone MJ. (1999). Increased protein backbone conformational entropy upon hydrophobic ligand binding. *Nat Struct Biol*. Dec;6(12):1118-21.

Zilber-Rosenberg I, Rosenberg E. (2008). Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiol Rev*. Aug;32(5):723-35.

DADOS SUPLEMENTARES

Tabela S1. Parâmetros do Modelfree para Art v 1

Resíduo	Modelo	S^2	S^2 (erro)	τ_e	τ_e (erro)	Kex	Kex
3	5	0,4428	0,017	3,45E-10	5,23E-11		
4	5	0,4807	0,0271	6,27E-10	4,74E-11		
5	5	0,7061	0,0299	1,12E-09	1,46E-10		
6	2	0,849	0,0154	4,79E-11	1,77E-11		
7	1	0,8544	0,0144				
8	1	0,8865	0,0131				
9	4	0,787	0,0192	2,39E-11	1,08E-11	3,0368	0,2995
10	1	0,8989	0,0161				
11	4	0,8636	0,0238	5,09E-11	2,47E-11	0,9881	0,3327
13	1	0,8811	0,0136				
14	4	0,7634	0,0221	2,38E-11	9,63E-12	0,4631	0,2943
15	2	0,6713	0,0122	7,46E-11	7,52E-12		
16	2	0,8197	0,0141	3,73E-11	1,35E-11		
18	4	0,8356	0,0194	3,27E-11	1,55E-11	1,1688	0,2587
19	4	0,8126	0,0223	2,52E-11	1,34E-11	0,614	0,2728
20	1	0,8683	0,0149				
21	2	0,8652	0,0133	7,04E-11	2,27E-11		
22	3	0,8653	0,0218			0,6839	0,2678
23	2	0,8371	0,0148	5,89E-11	1,85E-11		
24	2	0,8783	0,0165	7,25E-11	2,55E-11		
25	1	0,8675	0,0137				
26	1	0,8744	0,0144				
27	1	0,8814	0,0146				
28	1	0,9169	0,0159				
29	5	0,9032	0,0339	1,57E-09	1,46E-09		
30	1	0,8258	0,0145				
31	2	0,8122	0,0139	6,73E-11	1,41E-11		
32	1	0,9171	0,0145				
33	1	0,8634	0,0147				
34	2	0,8592	0,0167	3,95E-11	1,98E-11		
35	1	0,8938	0,0156				
36	1	0,8806	0,0143				
37	1	0,8585	0,0158				
38	2	0,892	0,0153	5,31E-11	1,09E-10		
40	2	0,7848	0,0136	7,31E-11	1,22E-11		
41	5	0,7018	0,031	7,03E-10	1,02E-10		
42	5	0,7377	0,0287	8,16E-10	1,19E-10		
43	2	0,7177	0,0131	9,14E-11	8,60E-12		
44	5	0,711	0,0313	8,08E-10	1,08E-10		
45	4	0,7019	0,017	8,71E-11	9,98E-12	0,95	0,2311
46	4	0,8044	0,0212	2,56E-11	1,10E-11	0,5	0,2558
47	2	0,8697	0,0164	7,23E-11	2,81E-11		
48	3	0,9124	0,022			0,896	0,2876
49	5	0,9081	0,0376	1,50E-09	1,26E-09		
50	1	0,8803	0,0178				
51	1	0,8691	0,0157				
52	1	0,8787	0,0161				
53	2	0,8617	0,0161	6,81E-11	2,07E-11		

55	2	0,7618	0,0125	6,97E-11	1,03E-11		
56	5	0,6476	0,0303	6,36E-10	8,57E-11		
57	prolina						
58	prolina						
59	4	0,5125	0,0119	9,31E-11	5,58E-12	1,3486	0,1992
60	5	0,659	0,0287	6,84E-10	8,78E-11		
61	5	0,2338	0,0193	9,14E-10	2,16E-11		
62	prolina						
63	5	0,2425	0,017	8,11E-10	2,15E-11		
64	prolina						
65	prolina						
66	4	0,4704	0,0104	1,36E-10	9,76E-12	0,793	0,1678
67	5	0,5451	0,0263	7,84E-10	5,51E-11		
68	5	0,4644	0,01442	7,10E-10	2,21E-11		
69	prolina						
70	prolina						
71	prolina						
72	5	0,2237	0,0197	7,15E-10	2,20E-11		
73	5	0,2821	0,0197	5,68E-10	2,83E-11		
74	2	0,4848	0,0083	1,05E-10	4,77E-12		
76	5	0,3431	0,0199	5,25E-10	2,97E-11		
77	prolina						
78	5	0,1444	0,0151	7,06E-10	1,83E-11		
79	prolina						
80	prolina						
81	5	0,2958	0,0196	6,04E-10	2,78E-11		
82	5	0,2428	0,0184	6,70E-10	2,49E-11		
85	5	0,1816	0,0157	7,23E-10	2,09E-11		
86	prolina						
87	prolina						
88	prolina						
89	prolina						
90	5	0,2272	0,0192	7,10E-10	2,21E-11		
91	5	0,2444	0,0144	6,10E-10	2,44E-11		
94							
95	prolina						
96	prolina						
97							
98	5	0,1768	0,0139	7,59E-10	1,57E-11		
99	5	0,4094	0,0099	1,19E-10	6,65E-12		
101	5	0,265	0,0215	6,89E-10	2,87E-11		
102	prolina						
103	prolina						
104	prolina						
105	prolina						
106	5	0,34	0,02	5,61E-10	2,90E-11		
107	5	0,1924	0,0125	3,93E-10	2,31E-11		
108	5	0,1434	0,0125	3,44E-10	2,80E-11		

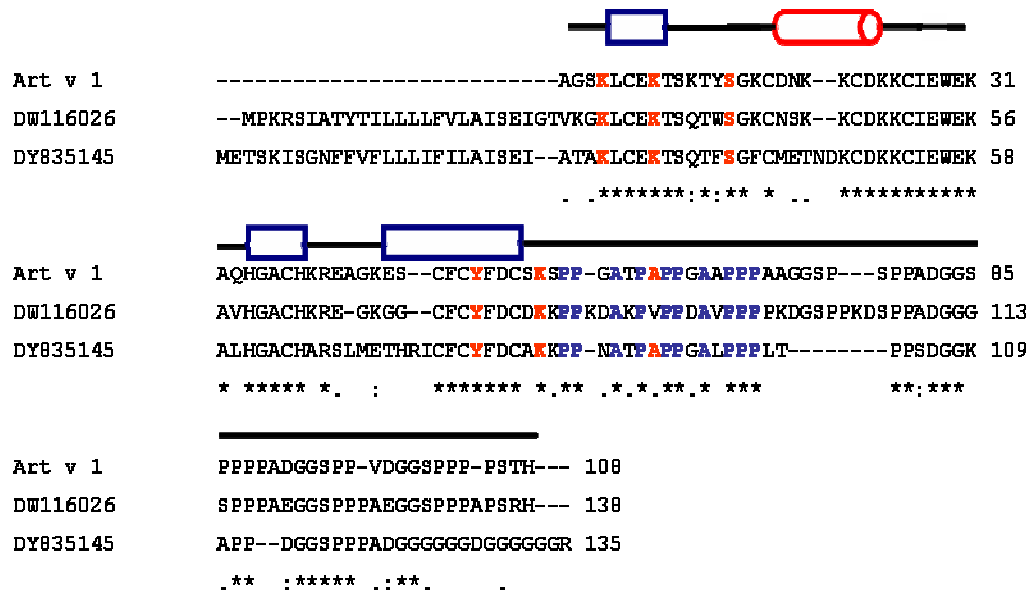


Figura S 1. Alinhamento de sequência primária do Art v 1 com EST (*Expressed sequence tags*) semelhantes a Art v 1. As ESTs selecionadas correspondem a proteínas que possuem o domínio rico em prolínas. As sequências DW116026 e DY835145 correspondem a sequências das espécies *Lactuca serriola* e *Taraxacum officinale* respectivamente. Resíduos em vermelho representam grupos conservados pertencentes ao epítipo de ligação à IgE mapeado para Art v 1. Em azul, prolínas conservadas pertencentes a região estruturada do domínio rico em prolínas.

Parte II

Neste trabalho caracterizamos novas defensinas encontradas no genoma de cana-de-açúcar. Existem, ainda, poucas caracterizações estruturais de defensinas de plantas na literatura, principalmente caracterizações da dinâmica molecular que são pouco reportadas para peptídeos antimicrobianos. A busca por novas defensinas em bancos de dados de EST é uma boa maneira de elucidar as características estruturais importantes para a função das defensinas. O projeto SUCEST (FAPESP) gerou um banco de dados de EST de cana-de-açúcar e, através de uma busca por proteínas similares a defensinas de plantas, seis seqüências foram identificadas. Subclonamos e caracterizamos quatro proteínas. Algumas destas defensinas apresentaram atividade contra fungos, mostrando-se defensinas ativas do genoma de cana-de-açúcar. Através de análise filogenética sugerimos um modo de anotar seqüências de defensinas em genomas agrupando as seqüências com base em relações evolutivas. As defensinas caracterizadas foram agrupadas com defensinas da família Poaceae na tribo Andropogoneae. Estas novas proteínas identificadas serão importantes alvos para futuros estudos estruturais que já estão em andamento no Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear da UFRJ.

Parte III

O genoma de *Herbaspirillum seropedicae*, uma bactéria fixadora de nitrogênio de grande importância econômica no Brasil, foi recentemente sequenciado através do projeto GENOPAR (genoma do paraná). Hemoglobinas bacterianas, pertencentes a uma nova família, foram encontradas neste genoma, mostrando características distintas nos resíduos de coordenação do heme. A função destas hemoglobinas em bactérias é bem pouco conhecida. No entanto, tem-se sugerido funções como sensores de oxigênio, proteção a estresse nitrosativo e oxidativo. Ainda não foi reportado nenhum envolvimento entre uma hemoglobina bacteriana e o mecanismo de fixação de nitrogênio. Características desta família de hemoglobinas (hemoglobinas truncadas) indicam que essas proteínas, vidas por oxigênio, podem atuar como peroxidases. Em hemoglobinas de *Micobacterium tuberculosis* podem atuar no interior de hospedeiros, após infecção, como moléculas importantes na adaptação a este novo ambiente. Neste artigo, caracterizamos uma hemoglobina truncada de *H.seropedicae* que apresentou características de uma hemoglobina com alta exposição do grupamento heme e com grande capacidade de degradar peróxido de hidrogênio de forma semelhante ao heme livre. Análises por RMN e espectrofotometria mostraram que a proteína apresenta uma transição da forma *aquamet* no estado férrico para forma hexacoordenada *low-spin* no estado ferroso. Isto indica que no estado férrico o grupamento que ocupa a sexta valência do ferro não está fortemente ligado como ocorre em outras hemoglobinas hexacoordenadas. Atrves de modelagem molecular conseguimos relacionar os grupamentos prováveis de ligação ao heme e propor um modelo de ligação do heme no estado férrico e ferroso. A função destas hemoglobinas hexacoordenadas ainda não está clara, mas acreditamos que este trabalho é um começo para futuros estudos estruturais e funcionais.

DISCUSSÃO GERAL E PERSPECTIVAS

Neste tópico do trabalho serão discutidos temas importantes na área de biologia estrutural para os modelos biológicos estudados nesta tese. Alguns dados, ainda bastante preliminares, serão também apresentados para ilustrar discussões e apontar futuros projetos.

1. Enovelamentos protéicos conservados com baixa similaridade de seqüência

O dogma central da biologia estrutural diz que é necessário uma proteína enovelada para exercer uma função biológica. Esta idéia tem sido discutida nos últimos anos, pois encontrou-se muitas estruturas sem um enovelamento definido capazes de desempenhar diversas funções biológicas (Wright e Dyson, 1999; Tompa, 2000; Henzler-Wildman e Kern, 2007). O enovelamento protéico muitas vezes é conservado entre diferentes famílias de proteínas. Além disso, proteínas com enovelamento protéico conservado muitas vezes apresentam funções bastante diversificadas, pois as superfícies de interação, ou seja, os aminoácidos expostos assumem diversas posições na estrutura. Portanto, mesmo um enovelamento bem definido pode assumir diversas funções (Almeida et al., 2002). Estas estruturas que possuem um enovelamento conservado muitas vezes apresentam baixa homologia de seqüência primária, como o caso clássico das hemoglobinas, também observado para as defensinas (ref).

1.1 O enovelamento de Defensinas de plantas

O enovelamento de defensinas de plantas é chamado de α/β . Este enovelamento é composto por uma α -hélice e três fitas beta antiparalelas num arranjo $\beta\alpha\beta\beta$ e apresenta um motivo estrutural chamado CSH (*cysteine-stabilized α -helix*) composto por um par de resíduos de cisteínas separados por uma seqüência tripeptídica (Cis-X-X-X-Cis) (Thomma et al., 2002). Os autores Yount e Yeaman (2004) sugerem que há uma região nos domínios defensina capaz de distinguir se uma proteína é ou não antimicrobiana. Esta assinatura estrutural, que possui somente duas cisteínas e uma glicina conservadas, foi chamada de γ -core (Figura 11).



Figura 12. Estrutura da Art v 1 sobreposta a defensina antifúngica Rs-Amp1 em verde (PDB:1AYJ). A região da assinatura γ -core está representada em vermelho na estrutura da Art v 1.

No entanto, é importante lembrar que as defensinas de plantas agem em ao menos dois tipos de receptores, na membrana e dentro da célula (Thevissen et al.2000; 2003; Aerts et al. 2006; Lobo et al. 2007). Por isso, é provável que, apesar da assinatura γ -core indicar uma semelhança estrutural, as defensinas possam apresentar diferentes superfícies de interação com seus respectivos receptores, envolvendo mecanismos de ação distintos.

Nesta mesma perspectiva, uma atividade de defesa para a região das caudas encontradas em algumas defensinas tem sido proposta. Na discussão apresentada no artigo 2 (Razzera et al., 2009b), sobre a Art v1, sugerimos que, devido a atividade antimicrobiana apresentada por algumas proteínas com regiões poli-prolinas como as mucinas (T-T-A-A-P-P-T-P-S-A-T-T-P-A-P-P-S-S-S-A-PP –Mucina 2) (Krane S, 2008; Antonyraj K et al., 1998), por exemplo, seria plausível que a Art v 1 apresentasse uma atividade semelhante (Krane S, 2008; Antonyraj K et al., 1998). É interessante notar que as defensinas que apresentam uma cauda além do domínio bem ordenando $\alpha\beta$ são proteínas florais, como o caso da SF18, Art v 1, NaD1, SD2 e Dm-AMP1. Qual seria a função destas caudas? Ainda é difícil responder, pois poucos trabalhos foram relatados (Zelicurt et al. 2007, Tavares et al. 2008). A primeira estrutura de um domínio defensina com uma cauda está sendo reportada nesta tese. Alguns autores sugerem que estas caudas poderiam ser responsáveis pelo direcionamento da proteína aos vacúolos celulares. Foi sugerido também que algumas regiões do domínio defensina ficassem

protegidas devido à presença da cauda, tornando a proteína menos reativa aos tecidos da planta (Lay et al., 2003). Se essa última hipótese estiver correta, a estrutura da Art v 1 pode revelar quais são os resíduos menos acessíveis ao solvente. Na figura 13, mostramos os resíduos protegidos com base na estrutura reportada da Art v 1. Foi interessante verificar que, dos 8 resíduos da cauda de prolina que encobrem o domínio defensina (L5, C6, K8, N19, H34, A36 e Y50), 5 foram mapeados quando analisamos as diferenças entre a forma nativa e recombinante (C6, E7, K8, Y50 e H34). Isto sugere que a superfície de contato da cauda sobre o domínio defensina, parece ser a mesma na proteína nativa e na recombinante.

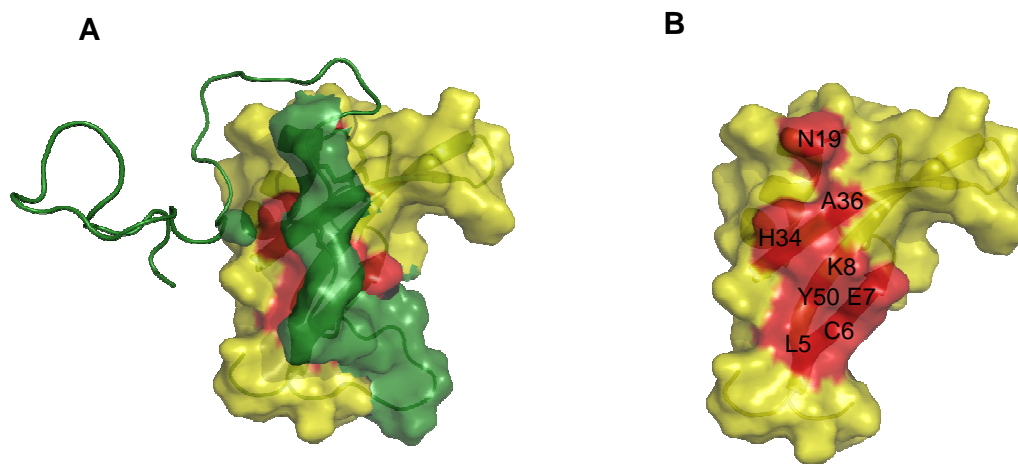


Figura 13. Superfície de contato entre o domínio de prolina da Art v 1 e o domínio defensina. Em A, os dois domínios estão normalmente sobrepostos, sendo o de prolina colorido em verde. Em vermelho, estão identificados os aminoácidos onde o domínio de prolina toca a superfície defensina. Em B, estes aminoácidos identificados são melhor visualizados, agora sem o domínio de prolina sobreposto.

Com a clonagem e o re-enovelamento de quatro defensinas de cana-de-açúcar, abriu-se muitas possibilidades de estudos estruturais. A determinação da estrutura e dinâmica destas moléculas pode ajudar a entender melhor quais resíduos estão participando das interações com membranas biológicas. Estes trabalhos estão em andamento no laboratório BioNMR do Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear, CNRMN – UFRJ. Outros trabalhos podem ser sugeridos, como o estudo dos domínios isolados da Art v 1 (já subclonados por Dedic et al. (2009) – colaboradores do CNRMN). Tanto estudos estruturais do domínio de prolina (57-108) quanto estudos antimicrobianos seriam necessários para compreender os mecanismos de defesa nas defensinas florais. Além disso, a proteína nativa purificada da planta (glicosilada) pode

participar dos processos de reconhecimento aos receptores de membrana dos diferentes patógenos e deve ser investigada.

1.2. O enovelamento de Globinas

As hemoglobinas representam o enovelamento protéico mais antigo que deu início a biologia estrutural de proteínas. A estrutura cristalográfica da mioglobina e da hemoglobina foram as primeiras a serem determinadas por Kendrew et al. (1960) e Perutz et al. (1968), respectivamente. O enovelamento básico de uma globina consiste normalmente de seis a oito α -hélices (A-H) encapsulando um grupo prostético heme (Royer et al. 2001). Este enovelamento, no entanto, já foi encontrado em diversos organismos formando diferentes famílias protéicas como: flavohemoglobinas, formadas por um domínio globina e outro que desempenha a função de ligação a FAD (flavina-adenina-dinucleotídeo); hemoglobinas não-simbióticas de plantas, ainda pouco estudadas; as hemoglobinas simbióticas, chamadas de leghemoglobinas, presentes em altas concentrações (mM) nos rizomas de leguminosas e envolvidas na fixação de nitrogênio; as hemoglobinas aceptoras finais de elétrons de vias de oxi-redução; ou, ainda, hemoglobinas de alguns invertebrados de regiões extremas sulfurosas, capazes de ligar a sulfetos (Wajcman e Kinger 2002). Novamente, assim como as defensinas, as hemoglobinas apresentam diferentes seqüências primárias de aminoácidos com um enovelamento conservado, assumindo diversas funções.

Apesar de muitas estruturas terem sido resolvidas, a dinâmica molecular destas novas famílias de hemoglobinas tem sido pouco explorada. A hemoglobina Hs-trHb1 caracterizada no artigo 4 desta tese, apresentou características de uma proteína com grande exposição do grupo heme e reatividade a peróxido de hidrogênio semelhante ao heme livre. Muitos genes de hemoglobinas truncadas putativas foram encontrados. O enovelamento destas hemoglobinas apresenta um arranjo chamado *2 on 2*, normalmente com 20-40 aminoácidos a menos se comparado com as clássicas Hbs de vertebrados (Wittenberg et al., 2002). Através da modelagem destas estruturas podemos inferir que o *loop* CD1 é bastante longo se comparado com outras hemoglobinas truncadas (Razzera et al. 2008). Estudos futuros da dinâmica deste *loop*, provavelmente envolvido na regulação da ligação a oxigênio, serão importantes para o entendimento da função destas hemoglobinas em bactérias.

Infelizmente, devido a baixa estabilidade da Hs-trHb1 quando ligada a monóxido de carbono (condição diamagnética importante para resolver a estrutura) não foi possível realizar estudos estruturais e de dinâmica desta molécula durante o desenvolvimento desta tese. No entanto, outra hemoglobina de *H.seropedicae* foi subclonada, com seqüência primária bastante similar a trHb1 para os resíduos de coordenação do heme, com dois aminoácidos distintos na posição E7 (S → A) e E11 (T → L). Estudos de estabilidade (trabalho desenvolvido atualmente pela aluna de mestrado Débora Baruh) mostraram que a proteína se mantém ligada a CO por vários dias. De acordo com estudos de modelagem molecular, o *loop* CD1 é ainda mais desordenado (Figura 14). Com isso a trHb2 passou a ser nosso alvo para estudos de RMN.

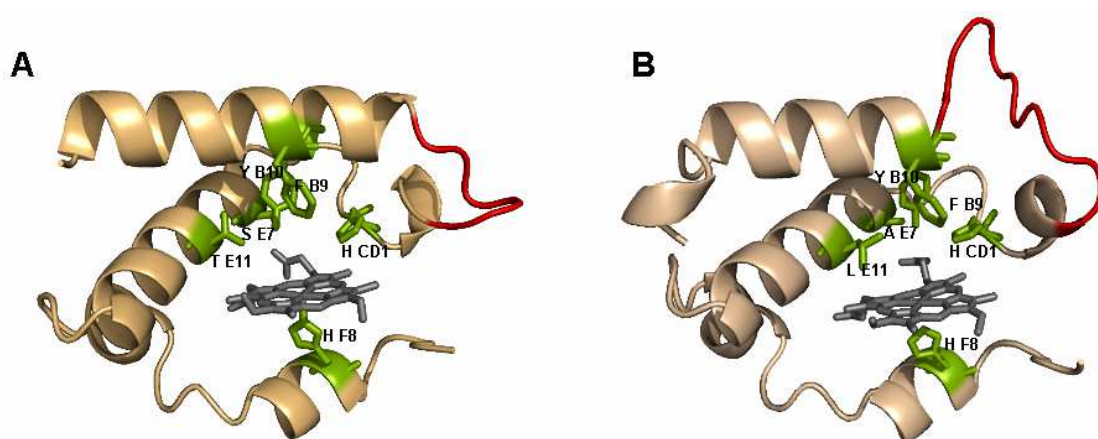


Figura 14. Representação do sítio de ligação a heme feita através de modelagem molecular para as estruturas Hs-trHb1 e 2 de *H.seropedicae*, mostrando em vermelho os *loops* CD1 que se diferenciam das outras hemoglobinas truncadas. Em A, trHb1 e em B, trHb2 mostrando um *loop* CD1 mais extenso.

É importante salientar que, associado aos dados estruturais, estudos funcionais de ligação a oxigênio e outros ligantes como CO, NO e CN^- , devem ser realizados.

2. A função de hemoglobinas bacterianas

A análise filogenética das hemoglobinas truncadas (trHbs) sugere que este grupo seja formado por uma família distinta separando-se de outras hemoglobinas bacterianas, como flavohemoglobinas, *Vitreoscilla* Hb e outras hemoglobinas de plantas simbióticas

e não simbióticas (Vuletich e Lecomte 2006). Frequentemente elas coexistem na mesma bactéria. Isto sugere que a função das hemoglobinas truncadas seja também distinta (Wittenberg et al. 2002). Tem-se proposto que as hemoglobinas truncadas possam atuar em processos de transporte e varredura de oxigênio ou na detoxificação de NO (Fabozzi et al. 2006; Lama et al. 2006; Garrocho-Villegas et al. 2007). Alguns trabalhos têm mostrado que as trHbs podem funcionar como peroxidases (Féis et al., 2008; Hoy et al. 2008, Ouellet et al. 2007; Kvist et al. 2007). Nossos dados sugerem, também, que a função de peroxidase é bastante provável para Hs-trHb1. Faltam, no entanto, evidências *in vivo* que reforcem essa hipótese.

As hemoglobinas truncadas possuem como característica comum a alta afinidade por oxigênio. A proteína Bs-trHbO de *B.subtilis* é extremamente ávida por oxigênio apresentando uma constante de equilíbrio para a ligação de oxigênio (K_{O_2}) de $6700 \mu M^{-1}$ enquanto outras globinas apresentam constantes em torno de 0,2, como a GLB3 de *A.thaliana* (Giangiacomo et al. 2005). Há evidências que sugerem que as hemoglobinas truncadas HBO e HBN de *M.tuberculosis* possam desempenhar um papel importante no metabolismo celular durante situações de estresse e hipóxia no processo de infecção da bactéria. A presença destas globinas é capaz de promover o crescimento celular em ambientes de estresse (Pawaria et al. 2008). Sabemos que situação semelhante ocorre quando a *H.seropedicae*, ao infectar a planta hospedeira em um ambiente anóxico, realiza o processo de fixação de nitrogênio. De fato os fatores de estresse a que estas bactérias são submetidas é muito semelhante, ambas devem possuir de mecanismos moleculares de adaptação a este novo ambiente. Neste sentido, realizamos alguns experimentos iniciais com a proteínas trHB1 de *H.seropedicae*, para testar a capacidade destas hemoglobinas de aumentar o crescimento celular em bactérias *E.coli*. Na figura 15 mostramos o efeito simples de crescimento bacteriano em células que contém a hemoglobinas truncada trHb1.

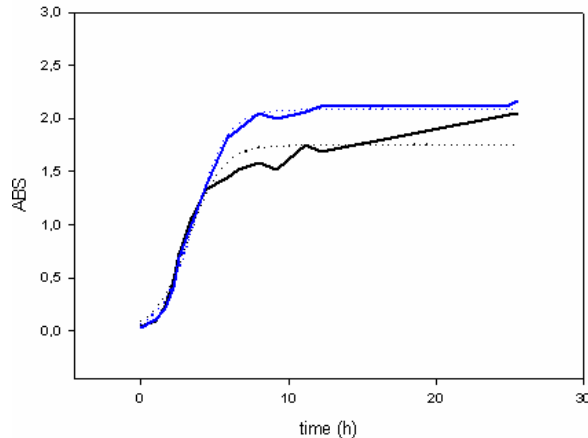


Figura 15. Crescimento celular de células *E.coli* (BI21De3) expressando a hemoglobina truncada Hs-trHb1 de *H.seropedicae* (em azul) comparado com o controle expressando o plasmídeo pET14b (em preto). A trHb1 mostra um maior crescimento atingindo 2.0 D.O em aproximadamente 8h comparado com o contole que atinge somente 24h depois. A indução da expressão com 0.5mM IPTG foi feita em 1.0 D.O.

Estes dados, ainda preliminares, sugerem que as hemoglobinas truncadas de *H.seropedicae* podem desempenhar um papel semelhante às trHbs de *M.tuberculosis* e importante para o processo de fixação de nitrogênio. Até o momento, nenhum trabalho mostrou que uma hemoglobina bacteriana esteja relacionada a um processo simbiótico de fixação de nitrogênio. Acreditamos que estudos de mutação ou deleção destes genes devem apontar a importância dessas hemoglobinas em *H.seropedicae*. Além disso, são grandes as aplicações biotecnológicas de hemoglobinas bacterianas. Sabe-se que hemoglobinas e flavohemoglobinas têm sido usadas para aumentar o crescimento celular em processos industriais (Koskenkorva et al. 2005). Portanto, as globinas de *H.seropedicae* eventualmente podem ser usadas para o desenvolvimento de bactérias e fungos com alta capacidade de crescimento.

3. Dinâmica molecular associada à função biológica

Muitos processos biológicos, como reações enzimáticas, por exemplo, ocorrem na escala de tempo de micro a milissegundos. Alguns trabalhos têm sugerido que a dinâmica conformacional de uma enzima nesta escala de tempo pode ser associada a sua ação catalítica, como mostrado para a enzima ciclofilina A (CypA) (Eisenmesser et al. 2002) e adenilato cinase (Wolf-Watz et al. 2004). A dinâmica de proteínas a partir destes trabalhos passa assumir uma nova perspectiva nos processos bioquímicos. Há

evidências de que os processos de ligação entre moléculas, como a interação proteína-proteína, possam ser relacionados aos movimentos lentos de troca conformacional e, portanto, seria possível identificar essas regiões de troca mesmo na ausência do ligante (Henzler-Wildman e Kern 2007). No entanto, algumas questões sobre a plasticidade conformacional ainda precisam ser respondidas, principalmente como e por que a transição conformacional ocorre. A figura 16 ilustra as escalas de tempo mencionadas nos processos de transição conformacional de uma proteína.

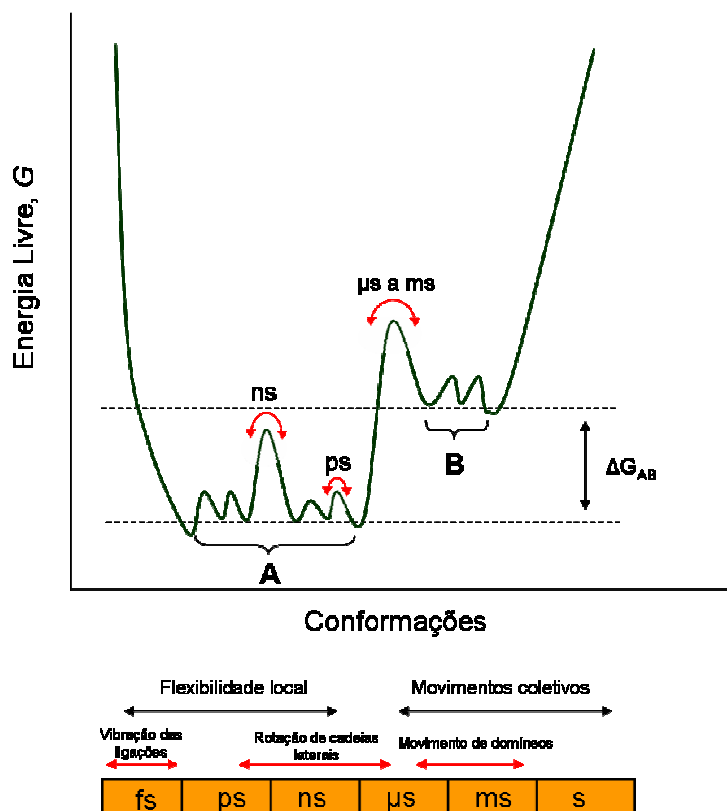


Figura 16. Diagrama de energia definindo a amplitude e escala de tempo dos movimentos de uma proteína. O diagrama mostra as barreiras energéticas para cada tipo de movimento. A troca conformacional é definida como a transição entre estados de A a B na escala de μs a ms (figura adaptada de Henzler-Wildman e Kern, 2007).

Algumas técnicas têm sido usadas para medir esses movimentos como fluorescência (FRET – *fluorescence resonance energy transfer* e *stopped flow*) e microscopia de força atômica. Enquanto esses métodos mostram os movimentos globais da molécula, ou a dinâmica de locais específicos, a RMN de proteínas em solução permite a investigação de múltiplos locais na proteína de forma simultânea na escala de tempo de picosegundos a horas ou mesmo dias (Palmer, 2001; Palmer et al. 2001).

O ajuste dos dados de dinâmica obtidos nesta tese (Artigo 2) através da análise por *model free* nos permitiu avaliar os processos dinâmicos da Art v 1. É interessante que os dados reportados mostraram que em ao menos dois resíduos pertencentes ao chamado γ -core de peptídeos antimicrobianos, E45 e S46 apresentam indicativos de troca conformacional, ou seja, apresentam movimentos lentos na faixa de micro a milissegundos. Esta foi a primeira análise da dinâmica molecular feita por RMN reportada para o enovelamento de defensinas de planta. Sendo assim, a dinâmica de outras estruturas deve ser analisada para que se possam associar os movimentos lentos do γ -core a uma função antimicrobiana. Além disso, outras regiões apresentaram troca conformacional, como o primeiro *loop* da Art v 1, que podem também estar associadas a funções biológicas.

4. Estruturas desordenadas e os métodos semi-automatizados de cálculo em RMN

Os NOEs detectados nos espectros de NOESY (Nuclear *Overhauser Enhancement Spectroscopy*) são o resultado da relaxação-cruzada devido a interações dipolo-dipolo entre pares vizinhos de *spins* nucleares (Wüthrich, 1986). Através da identificação destes NOEs obtemos as restrições de distância utilizadas nos cálculos em RMN. No sentido de aumentar a velocidade dos cálculos de RMN processos semi-automatizados foram desenvolvidos (Hermann, T et al., 2002 a,b).

A resolução de estrutura do alergeno Art v 1 por RMN, permitiu com que entrássemos em contato com estas técnicas semi-automáticas no laboratório BioNMR do CNRMN. De acordo com a nossa experiência, os programas semi-automáticos ATNOS/CANDID, funcionando junto ao CYANA 2.1, são realmente eficientes. No entanto, inicialmente estruturas pouco prováveis foram geradas, mantendo o enovelamento esperado, porém, apresentando problemas quanto a geometria e ao pareamento de fitas beta no enovelamento α/β de defensina. Foram necessários, portanto, adicionar durante o cálculo algumas pontes de hidrogênio e ângulos de torção Φ e ψ gerados pelo programa TALOS (Cornilescu et al. 1999). De acordo com a literatura, é comum a utilização destes recursos para o cálculo de estruturas por RMN (Naik M et al., 2008). Quando o enovelamento foge ao tradicional, porém, algumas

precauções devem ser tomadas, principalmente no caso de estruturas não globulares e flexíveis.

Os autores Saccenti e Rosato (2008) comentam que mesmo quando diferentes laboratórios estão usando as mesmas medidas, frequentemente os dados são computados de forma distinta ou são acessados usando critérios subjetivos e não-reprodutivos. Portanto, é bem possível que quando submetidos diferentes métodos estatísticos os dados sejam assinalados com diferentes níveis de qualidade. Além disso, violações de resíduos e RMSD (*root mean square deviation*) têm-se mostrado métodos inadequados para avaliação de qualidade estrutural (Spronk et al. 2003).

Para evitar os problemas reportados, recorreremos a uma avaliação manual dos NOEs adicionados pelo programa ATNOS/CANDID, tentando ser conservadores ao caracterizar a região flexível da estrutura da Art v 1. Reforçamos a necessidade desta avaliação, mesmo que envolva um maior tempo de análise, evitando que erros sejam cometidos. Saccenti e Rosato (2008), através de uma detalhada análise dos métodos disponíveis para avaliar a qualidade de estruturas, sugerem que a análise "simples" de distribuição do *plot* de Ramachandran é uma das melhores maneiras de se fazer a avaliação da qualidade dos dados.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta tese possibilitou a abertura de novas frentes de trabalho no campo da biologia estrutural: novas proteínas de cana-de-açúcar foram caracterizadas; a determinação da estrutura 3D do alergeno Art v 1 proporcionou novas possibilidades de estudo da relação entre dinâmica e epitopos de células imunogênicas; e a perspectiva de estudar a função antimicrobiana da Art v 1 parece ser muito interessante pelo fato de ser uma *defensin-like* com dois domínios. Além disso, uma nova linha de pesquisa de hemoproteínas foi desenvolvida no CNRMN. A caracterização destas proteínas paramagnéticas foi bastante árdua, necessitando muitas vezes a ajuda de especialistas na área como prof. Alejandro Vila (Universidad de Rosario), Dr. Flávio Lara (Fiocruz) e o prof. Marcus de Oliveira (IBQM – UFRJ). As sugestões e comentários destes pesquisadores foram muito importantes para a realização dos experimentos do Artigo 4 desta tese. Atualmente os trabalhos com as defensinas de cana-de-açúcar e com as hemoglobinas de *Herbaspirillum seropedicae* envolvem um aluno de Doutorado, um de Mestrado e um aluno de Iniciação Científica. A estrutura da defensina SD5 já foi resolvida e a hemoglobina mais estável de *H. seropedicae* (Hs-trHb2) está sendo caracterizada por RMN sendo que os experimentos de marcação isotópica já estão sendo realizados para a determinação estrutural.

Referências bibliográficas:

Aerts, A.M, François, I.E., Cammue, B.P., Thevissen K. (2008). The mode of antifungal action of plant, insect and human defensins. *Cell Mol Life Sci.* 65(13):2069-2079.

Aerts, A.M., François, I.E., Bammens, L., Cammue, B.P., Smets, B., Winderickx, J. (2006). Level of M(IP)2C sphingolipid affects plant defensin sensitivity, oxidative stress resistance and chronological life-span in yeast. *FEBS Lett* 580(7):1903–1907.

Aerts, A.M., François, I.E., Meert, E.M., Li, Q.T., Cammue, B.P., Thevissen, K. (2007). The antifungal activity of RsAFP2, a plant defensin from *Raphanus sativus*, involves the induction of reactive oxygen species in *Candida albicans*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 13(4):243–247.

Akdis, C. (2006). Allergy and hypersensitivity mechanism of allergic disease. *Curr Opin Immunol* 18: 718-726.

Akke M., Skelton, N.J., Kördel, J., Palmer, A.G. 3rd., Chazin, W.J. (1993). Effects of ion binding on the backbone dynamics of calbindin D9k determined by ¹⁵N NMR relaxation. *Biochemistry* 32(37):9832-9844.

Almeida, M.S., Cabral, K.M., Zingali, R.B., Kurtenbach, E. (2000). Characterization of two novel defense peptides from pea (*Pisum sativum*) seeds. *Arch Biochem Biophys* 378(2):278–286.

Almeida, M.S., Cabral, K.M.S., de Medeiros, L.N., Valente, A.P., Almeida, F.C., Kurtenbach, E. (2001). cDNA cloning and heterologous expression of functional cysteine-rich antifungal protein Psd1 in the yeast *Pichia pastoris*. *Arch Biochem Biophys* 395:199–207.

Almeida, M.S., Cabral, K.M.S., Kurtenbach, E., Almeida, F.C.L., Valente, A.P. (2002). Solution structure of plant defensin 1 from *Pisum sativum*: plant defensins, identical backbone with different mechanism. *J Mol Biol* 315:749–757.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403–410.

Arnesano, F., Banci, L., Piccioli, M. NMR structures of paramagnetic metalloproteins. (2005). *Q Rev Biophys.* 38(2):167-219.

Antonyraj, K.J., Karunakaran, T., Raj, P.A. (1998). Bactericidal activity and poly-L-proline II conformation of the tandem repeat sequence of human salivary mucin glycoprotein (MG2). *Arch Biochem Biophys.* 356(2):197-206.

Balandín, M., Royo, J., Gómez, E., Muniz, L.M., Molina, A., Hueros, G. (2005). A protective role for the embryo surrounding region of the maize endosperm, as evidenced by the characterisation of ZmESR-6, a defensin gene specifically expressed in this region. *Plant Mol Biol* 58(2):269–282.

Baldani, J.I., Pot, B., Kirchhof, G., Falsen, E., Baldani, V.L., Olivares, F.L., Hoste, B., Kersters, K., Hartmann, A., Gillis, M., Dobereiner, J. (1996). Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a milk plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. *Int J Syst Bacteriol* 46:802–810

Bauer, L., Ebner, C., Hirschwehr, R., Wuthrich, R., Pichler, C., Fritsch, R., Scheiner, O., Kraft, D. (1996). IgE cross-reactivity between birch pollen, mugwort pollen and celery is due to at least three distinct cross-reacting allergens: immunoblot investigation of the bichmugwort- celery syndrome. *Clin Exp Allergy* 26: 1161-1170.

Bertolucci, C., Ming, L.J., Gonzalez, G., Gilles-Gonzalez, M.A. (1996). Assignment of the hyperfine-shifted ¹H-NMR signals of the heme in the oxygen sensor FixL from *Rhizobium meliloti*. *Chem Biol* 3:561–566

Billeter, M., Wagner, G., Wüthrich, K. (2008) Solution NMR structure determination of proteins revisited. *J Biomol NMR*. 42(3):155-158.

Bloch, C. Jr., Richardson, M. (1991). A new family of small (5 kDa) protein inhibitors of insect alpha-amylases from seeds of sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench) have sequence homologies with wheat gamma-purothionins. *FEBS Lett* 279:101–104.

Boehr, D.D., Dyson, H.J., and Wright, P.E. (2006). An NMR perspective on enzyme dynamics. *Chem Rev*. 2006 Aug;106(8):3055-79.

Bonamore, A., Ilari, A., Giangiacomo, L., Bellelli, A., Morea, V., Boffi, A. (2005). A novel thermostable hemoglobin from the actinobacterium *Thermobifida fusca*. *FEBS J* 272:4189–4201

Bradford, M.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

Brahmachary, M., Krishnan, S.P., Koh, J.L., Khan, A.M., Seah, S.H., Tan, T.W., Brusica, V., Bajic, V.B. (2004). A database of antimicrobial sequences. *Nucleic Acids Res*. Jan 1;32 (Database issue):D586-9.

Bracken, C., Carr, P.A., Cavanagh, J., Palmer, A.G. 3rd. (1999). Temperature dependence of intramolecular dynamics of the basic leucine zipper of GCN4: implications for the entropy of association with DNA. *J Mol Biol*. Feb 5;285(5):2133-46.

Bruce, T.J., Pickett, J.A. (2007). Plant defence signalling induced by biotic attacks. *Curr Opin Plant Biol* 10:387–392.

Bulet, P., Stöcklin, R., Menin, L. (2004). Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol Rev* 198:169–184.

Cabral, K.M.S., Almeida, M.S., Valente, A.P., Almeida, F.C.L., Kurtenbach, E. (2003). Production of the active antifungal *Pisum sativum* defensin 1 (Psd1) in *Pichia pastoris*: overcoming the inefficiency of the STE13 protease. *Protein Expr Purif* 31:115–122.

Caillet-Saguay C, Delepierre M, Lecroisey A, Bertini I, Piccioli M, Turano P (2005) Direct-detected ¹³C NMR to investigate the iron(III) hemophore HasA. *J Am Chem Soc* 128:150–158

Case, D.A. (2002). Molecular dynamics and NMR spin relaxation in proteins. *Acc Chem Res.* 2002 Jun;35(6):325-31.

Chapman, M.D., Pomés, A., Breiteneder, H., Ferreira, F. (2007). Nomenclature and structural biology of allergens. *J Allergy Clin Immunol.* 2007 Feb;119(2):414-20.

Clore, G.M., Szabo, A., Bax, A., Kay, L.E., Driscoll, P.C., and M., G.A. (1990). Deviations from the simple two-parameter model-free approach to the interpretation of Compton LA, Johnson WC Jr (1986) *Anal Biochem* 155:155–167.

Cornilescu, G., Delaglio, F., and Bax, A. (1999). Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology. *J Biomol NMR* 13, 289-302.

Couture, M., Yeh, S.R., Wittenberg, B.A., Wittenberg, J.B., Ouellet, Y., Rousseau, D.L., Guertin, M. (1999). A cooperative oxygen-binding hemoglobin from *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:11223–11228.

Das, T.K., Couture, M., Lee, H.C., Peisach, J., Rousseau, D.L., Wittenberg, B.A., Wittenberg, J.B., Guertin, M. (1999). Identification of the ligands to the ferric heme of *Chlamydomonas chloroplast* hemoglobin: evidence for ligation of tyrosine-63 (B10) to the heme. *Biochemistry* 38:15360–15368.

Dayie, K.T., Wagner, G., Lefèvre, J.F. (1996). Theory and practice of nuclear spin relaxation in proteins. *Annu Rev Phys Chem.* 47:243-82.

D'Amato G, Cecchi L, Bonini S, Nunes C, Annesi-Maesano I, Behrendt H, Liccardi G, Popov T, van Cauwenberge P. (2007). Allergenic pollen and pollen allergy in Europe. *Allergy.* Sep;62(9):976-90

De-Paula, V.S., Razzera, G., Medeiros, L., Miyamoto, C.A., Almeida, M.S., Kurtenbach, E., Almeida, F.C., Valente, A.P. (2008). Evolutionary relationship between defensins in the Poaceae family strengthened by the characterization of new sugarcane defensins. *Plant Mol Biol* 68:321-335.

Dedic A., Gadermaier, G., Vogel, L., Ebner, C., Vieths, S., Ferreira, F., Egger, M. (2009). Immune recognition of novel isoforms and domains of the mugwort pollen major allergen Art v 1. *Mol Immunol.* 46(3):416-421.

de Groot, H., Brand, P.L., Fokkens, W.F., Berger, M.Y. (2007). Allergic rhinoconjunctivitis in children. *BMJ.* Nov 10;335(7627):985-8.

Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G.W., Zhu, G., Pfeifer, J., Bax, A. (1995). NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J Biomol NMR* 6:277–293.

Dethlefsen, L., McFall-Ngai, M., Relman, D.A. (2007). An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. *Nature.* Oct 18;449(7164):811-8.

Dillon, S.L., Lawrence, P.K., Henry, R.J. (2001). The use of ribosomal ITS to determine phylogenetic relationships within *Sorghum*. *Plant Syst Evol* 230:97–110.

Dosset, P., Hus, J.C., Blackledge, M., Marion, D. (2000). Efficient analysis of macromolecular rotational diffusion from heteronuclear relaxation data. *J Biomol NMR.* 16(1):23-8.

Dunker, A.K. (2007). Another window into disordered protein function. *Structure.* Sep;15(9):1026-8.

Dunker, A. K., Oldfield, C. J., Meng, J., Romero, P., Yang, J. Y., Chen, J. W., Vacic, V., Obradovic, Z. and Uversky, V. N. (2008). The unfoldomics decade: an update on intrinsically disordered proteins. *BMC Genomics* 2008, 9(2).

Duvignaud, J.B, Savard, C., Fromentin, R., Majeau, N., Leclerc, D., Gagné, S.M. (2009). Structure and dynamics of the N-terminal half of hepatitis C virus core protein: an intrinsically unstructured protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 378(1):27-31.

Dygert, S., Li, L.H., Don Florida, R., Thoma, J.A. (1965). Determination of reducing sugar with improved precision. *Anal Chem* 13:367–374.

Egorov, T.A., Odintsova, T.I., Pukhalsky, V.A., Grishim, E.V. (2005). Diversity of wheat anti-microbial peptides. *Peptides* 26:2064–2073.

Eisenmesser EZ, Bosco DA, Akke M, Kern D. (2002). Enzyme dynamics during catalysis. *Science.* Feb 22;295(5559):1520-3.

Fabozzi, G., Ascenzi, P., Renzi, S.D., Visca, P. (2006). Truncated hemoglobin G1bO from *Mycobacterium leprae* alleviates nitric oxide toxicity. *Microb Pathog* 40:211–220.

Fant, F., Vranken, W., Broekaert, W., Borremans, F. (1998). Determination of the three-dimensional solution structure of *Raphanus sativus* antifungal protein 1 by ¹H NMR. *J Mol Biol.* 279(1):257-70.

Farrow, N.A., Ranjith, M., Singer, A.U., Pascal, S.M., Kay, C., Gish, M., Shoelson, S.E., Pawson, T., Forman-Kay, J.D., Kay, L.E. (1994). Backbone dynamics of a free and phosphopeptidecomplexed Src homology 2 domain studied by ¹⁵N NMR relaxation. *Biochemistry* 33, 5984-6003.

Feis, A., Lapini, A., Catacchio, B., Brogioni, S., Foggi, P., Chiancone, E., Boffi, A., Smulevich, G. (2008). Unusually strong H-bonding to the heme ligand and fast geminate recombination dynamics of the carbon monoxide complex of *Bacillus subtilis* truncated hemoglobin. *Biochemistry* 47:902–910

Mittag, T., Forman-Kay, J.D. (2007). Atomic-level characterization of disordered protein ensembles. *Curr Opin Struct Biol.* Feb;17(1):3-14.

Freitas, T.A., Hou, S., Dioum, E.M., Saito, J.A., Newhouse, J., Gonzalez, G., Gilles-Gonzalez, M.A., Alam, M. (2004). Ancestral hemoglobins in Archaea. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:6675–6680.

Freitas, T.A., Saito, J.A., Hou, S., Alam, M. (2005). Globin-coupled sensors, protoglobins, and the last universal common ancestor. *J Inorg Biochem* 99:23–33.

Gajhede M, Osmark P, Poulsen FM, Ipsen H, Larsen JN, Joost van Neerven RJ, Schou C, Løwenstein H, Spangfort MD. (1996). X-ray and NMR structure of Bet v 1, the origin of birch pollen allergy. *Nat Struct Biol.* Dec;3(12):1040-5.

Gale, M., Moore, G., Devos, K. (2001). Rice—the pivotal genome in cereal comparative genetics. *Novartis Found Symp* 236:46–53.

Galli, S.J., Tsai, M., Piliponsky, A.M. (2008). The development of allergic inflammation. *Nature.* Jul 24;454(7203):445-54.

Gardiner, J., Schroeder, S., Polacco, M.L., Sanchez-Villeda, H., Fang, Z., Morgante, M. (2004). Anchoring 9,371 maize expressed sequence tagged unigenes to the bacterial artificial chromosome contig map by two-dimensional overgo hybridization. *Plant Physiol* 134:1317–1326.

Garrocho-Villegas, V., Gopalasubramaniam, S.K., Arredondo-Peter, R. (2007). Plant hemoglobins: what we know six decades after their discovery. *Gene* 398:78–85.

Gehlhar, K., Rajashankar, K.R., Hofmann, E., Betzel, C., Weber, W., Werner, S., Bufe, A. (2006). Lysine as a critical amino acid for IgE binding in Phl p 5b C terminus. *Int Arch Allergy Immunol.* 140(4):285-94. Epub 2006 May 21.

Giangiaco, I., Ilari, A., Bofia, A., Morea, V., Chiancone, E. (2005). The truncated oxygen-avid hemoglobin from *Bacillus subtilis*: X-ray structure and ligand binding properties. *J Biol Chem* 280:9192–9202.

Grabowski, M., Joachimiak, A., Otwinowski, Z., Minor, W. (2007). Structural genomics: keeping up with expanding knowledge of the protein universe. *Curr Opin Struct Biol* 17:347–353.

Grinverg, L.N., O'brien, P.J., Hrkal, Z. (1999). The effects of heme-binding proteins on the peroxidative and catalatic activities of hemin. *Free Radic Biol Med* 27:214–219.

Grzesiek e Bax. (1992). Correlating backbone amide and side-chain resonances in larger proteins by multiple relayed triple resonance NMR. *J. Am. Chem. Soc.*114: 6291-6293.

Güntert P. (2004). Automated NMR structure calculation with CYANA. *Methods Mol Biol.* 278:353-78.

Guntert, P., Mumenthaler, C., and Wuthrich, K. (1997). Torsion angle dynamics for NMR structure calculation with the new program DYANA. *J Mol Biol* 273, 283-298.

de Halleux, S., Stura, E., VanderElst, L., Carlier, V., Jacquemin, M., Saint-Remy, J.M. (2006). Three-dimensional structure and IgE-binding properties of mature fully active Der p 1, a clinically relevant major allergen. *J Allergy Clin Immunol.* Mar;117(3):571-6. Epub 2006 Jan 30.

Hammami, R., Ben Hamida, J., Vergoten, G., Fliss, I. PhytAMP: a database dedicated to antimicrobial plant peptides. (2009). *Nucleic Acids Res.* Jan;37 (Database issue):D963-8.

Hancock RE. (2001). Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infect Dis.* Oct;1(3):156-64.

Hardison, R. (1999). The effects of heme-binding proteins on the peroxidative and catalatic activities of hemin. *Am Sci* 87:126–137.

Hardison, R.C. (1996). A brief history of hemoglobins: plant, animal, protist, and bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:5675–5679.

Henzler-Wildman, K., Kern, D. (2007). Dynamic personalities of proteins. *Nature* 13;450(7172):964-72.

Herrmann, T., Güntert, P. and Wüthrich, K. (2002a). Protein NMR structure determination with automated NOE-identification in the NOESY spectra using the new software ATNOS. *Journal of Biomolecular NMR*, 24: 171–189.

Herrmann, T., Güntert, P. and Wüthrich, K. (2002b). Protein NMR Structure Determination with Automated NOE Assignment Using the New Software CANDID and the Torsion Angle Dynamics Algorithm DYANA. *J. Mol. Biol.* 319, 209–227.

Hill, D.R., Belbin, T.J., Thorsteinsson, M.V., Bassam, D., Brass, S., Ernst, A., Böger, P., Paerl, H., Mulligan, M.E., Potts, M. (1996). GlnN (cyanoglobin) is a peripheral membrane protein that is restricted to certain *Nostoc* spp. *J Bacteriol* 178:6587–6598.

Himly, M., Jahn-Schmid, B., Dedic, A., Kelemen, P., Wopfner, N., Altmann, F., van Ree, R., Briza, P., Richter, K., Ebner, C., Ferreira, F. (2003). Art v 1, the major allergen of mugwort pollen, is a modular glycoprotein with a defensin-like and a hydroxyproline-rich domain. *FASEB J* 17:106-8.

Holm, L., Kääriäinen, S., Rosenström, P., Schenkel, A. (2008). Searching protein structure databases with DaliLite v.3. *Bioinformatics*. 24(23):2780-1.

Hornig, J.C., Raines, R.T. (2006). Stereoelectronic effects on polyproline conformation. *Protein Sci.* 15(1):74-83.

Hoy, J.A., Hargrove, M.S. (2008). The structure and function of plant hemoglobins. *Plant Physiol Biochem* 46:371–379.

Ilari, A., Kjølgaard, P., von Wachenfeldt, C., Catacchio, B., Chiancone, E., Boffi, A. (2007). Crystal structure and ligand binding properties of the truncated hemoglobin from *Geobacillus stearothermophilus*. *Arch Biochem Biophys* 457:85–94.

Jahn-Schmid, B., Fischer, G.F., Bohle, B., Faé, I., Gadermaier, G., Dedic, A., Ferreira, F., Ebner, C. (2005). Antigen presentation of the immunodominant T-cell epitope of the major mugwort pollen allergen, Art v 1, is associated with the expression of HLA-DRB1 *01. *J Allergy Clin Immunol.* 115(2):399-404.

Jahn-Schmid, B., Kelemen, P., Himly, M., Bohle, B., Fischer, G., Ferreira, F., Ebner, C. (2002). The T cell response to Art v 1, the major mugwort pollen allergen, is dominated by one epitope. *J. Immunol.* 169(10):6005-11.

James, E.K., Gyaneshwar, P., Mathan, N., Barraquio, W.L., Reddy, P.M., Iannetta, P.P., Olivares, F.L., Ladha, J.K. (2002). Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. *Mol Plant Microbe Interact* 15:894–906.

Jannoo, N., Grivet, L., Chantret, N., Garsmeur, O., Glaszmann, J.C., Arruda, P. (2007). Orthologous comparison in a gene-rich region among grasses reveals stability in the sugarcane polyploid genome. *Plant J* 50:574–585.

Jayasekera, N.P., Toma, T.P., Williams, A., Rajakulasingam, K. (2007). Mechanisms of immunotherapy in allergic rhinitis. *Biomed Pharmacother.* Jan;61(1):29-33. Epub 2006 Dec 5.

Jelinek, R., Kolusheva, S. (2005). Membrane interactions of host-defense peptides studied in model systems. *Curr Protein Pept Sci* 6:103–114.

Jia, J., Fu, J., Zheng, J., Zhou, X., Huai, J., Wang, J. (2006). Annotation and expression profile analysis of 2073 full-length cDNAs from stress-induced maize (*Zea mays* L.) seedlings. *Plant J* 48:710–727.

Juszczak, L., Dantsker, D., Samuni, U., Ouellet, Y.H., Savard, P.Y., Wittenberg, J.B., Wittenberg, B.A., Friedman, J.M., Guertin, M. (2003). Reactions of *Mycobacterium*

tuberculosis truncated hemoglobin O with ligands reveal a novel ligand-inclusive hydrogen bond network. *Biochemistry* 42:5764–5774.

Kaiser, L., Grönlund, H., Sandalova, T., Ljunggren, H.G., van Hage-Hamsten, M., Achour, A., Schneider, G. (2003). The crystal structure of the major cat allergen Fel d 1, a member of the secretoglobin family. *J Biol Chem. Sep 26;278(39):37730-5*.

Kandu, S., Trent, J.T.III, Hargrove, M.S. (2003). Plants, humans and hemoglobins. *Trends Plant Sci* 8:387–393.

Kanelis, V., Donaldson, L., Muhandiram, D.R., Rotin, D., Forman-Kay, J.D., Kay, L.E. (2000). Sequential assignment of proline-rich regions in proteins: application to modular binding domain complexes. *J Biomol NMR* 16:253-9.

Kay, L. E., Torchia, D. A., Bax, A. (1989) Backbone dynamics of proteins studied by ¹⁵N inverse detected heteronuclear NMR spectroscopy: application to staphylococcal nuclease. *Biochemistry* 28: 8972-8979.

Keller, R. (2004). *The Computer Aided Resonance Assignment Tutorial* first edition. ISBN 3-85600-112-3, CANTINA Verlag.

Kendrew, J. C., Dickerson, R. E., Strandberg, B.E., Hart, R.G., Davies, D.R., Phillips, D.C., Shore, V.C. (1960). Structure Of Myoglobin: A Three-Dimensional Fourier Synthesis At 2 Å Resolution. *Nature. Feb 13;185:422-7*.

Kolarich, D., Léonard, R., Hemmer, W., Altmann, F. (2005). The N-glycans of yellow jacket venom hyaluronidases and the protein sequence of its major isoform in *Vespa vulgaris*. *FEBS J. Oct;272(20):5182-90*.

Koshikawa, K., Yamamoto, Y., Kamimura, S., Matsuoka, A., Shikama, K. (1998). ¹H NMR study of dynamics and thermodynamics of acid-alkaline transition in ferric hemoglobin of a midge larva (*Tokunagayusurika akamusi*). *Biochem Biophys Acta* 1385:89–100.

Koskenkorva T, Frey AD, Kallio PT. (2006). Characterization of heterologous hemoglobin and flavohemoglobin promoter regulation in *Escherichia coli*. *J Biotechnol. Mar 23;122(2):161-75*.

Krane, S.M. (2008). The importance of proline residues in the structure, stability and susceptibility to proteolytic degradation of collagens. *Amino Acids. 35(4):703-10*.

Kumaki, Y., Kawano, K., Hikichi, K., Matsumoto, T., Matsushima, N. (2008). A circular loop of the 16-residue repeating unit in ice nucleation protein. *Biochem Biophys Res Commun. Jun 20;371(1):5-9*.

Kushmerick, C., de Souza Castro, M., Santos Cruz, J., Bloch, C. Jr., Beirão, P.S. (1998). Functional and structural features of gamma-zethionins, a new class of sodium channel blockers. *FEBS Lett* 440:302–306.

Kvist, M., Ryabova, E.S., Nordlander, E., Biilow, L. (2007). An investigation of the peroxidase activity of *Vitreoscilla* hemoglobin. *J Biol Inorg Chem* 12:324–334.

Leher, R.I., Rosenman, M., Fragel-Madeira, L., Medeiros, L.N., Cabral, L.M., Faria, J. et al. (1991) Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial poly-peptides. *J Immunol Methods* 137:167-173.

Lama, A., Pawaria, S., Dikshit, K.L. (2006). Oxygen binding and NO scavenging properties of truncated hemoglobin, HbN, of *Mycobacterium smegmatis*. *FEBS Lett* 580:4031–4041.

Larché, M., Akdis, C.A., and Valenta, R. (2006). Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy, *Nat Rev Immunol* 6, pp. 761–771.

Larché, M., Wraith, D.C. (2005). Peptide-based therapeutic vaccines for allergic and autoimmune diseases. *Nat Med.* 11(4):69-76.

Laskowski, R.A., Rullmann, J.A., MacArthur, M.W., Kaptein, R., Thornton, J.M. (1996) AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J Biomol NMR.* 8(4):477-86.

Lay, F.T., Schirra, H.J., Scanlon, M.J., Anderson, M.A., Craik, D.J. (2003). The three-dimensional solution structure of NaD1, a new floral defensin from *Nicotiana glauca* and its application to a homology model of the crop defense protein alfAFP. *J Mol Biol* 325:175–188.

Lecomte, J.T., Scott, N.L., Vu, B.C., Falzone, C.J. (2001). Binding of ferric heme by the recombinant globin from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochemistry.* May 29;40(21):6541-52.

Lecomte, J.T., Vuletich, D.A., Lesk, A.M. (2005). Structural divergence and distant relationships in proteins: evolution of the globins. *Curr Opin Struct Biol* 15:290–301.

Lehrer, R.I., Rosenman, M., Harwig, S.S.S.L., Jackson, R., Eisenhauer, P. (1991) Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides. *J Immunol Methods* 137:167–173.

Leonard, R., Petersen, B.O., Himly, M., Kaar, W., Wopfner, N., Kolarich, D., van Ree, R., Ebner, C., Duus, J.Ø., Ferreira, F., Altmann, F. (2005). Two novel types of O-glycans on the mugwort pollen allergen Art v 1 and their role in antibody binding. *J Biol Chem.* 4;280(9):7932-40.

Linge JP, Habeck M, Rieping W, Nilges M. (2003). ARIA: automated NOE assignment and NMR structure calculation. *Bioinformatics.* 2003 Jan 22;19(2):315-6.

Lipari, G., and Szabo, A. (1982a). Model-free approach to the interpretation of nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. 1. Theory and range of validity. *J Am Chem Soc* 104, 4546-4559.

Lipari, G., and Szabo, A. (1982b). Model-free approach to the interpretation of nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. 2. Analysis of experimental results. *J Am Chem Soc* 104, 4559-4570.

Lobo, D.S., Pereira, I.B., Fragel-Madeira, L., Medeiros, L.N., Cabral, L.M., Faria, J. (2007). Antifungal *Pisum sativum* defensin 1 interacts with *Neurospora crassa* cyclin F related to the cell cycle. *Biochemistry* 46:987–996.

Lu, C., Egawa, T., Wainwright, L.M., Poole, R.K., Yeh, S.R. (2007). Structural and functional properties of a truncated hemoglobin from a food-borne pathogen *Campylobacter jejuni*. *J Biol Chem* 282:13627–13636.

Luz, Z., Meiboom, S. (1963) Nuclear magnetic resonance study of protolysis of trimethylammonium ion in aqueous solution – order of reaction with respect to solvent. *J. Chem. Phys.* 39: 366-370.

Matsushima, N., Yoshida, H., Kumaki, Y., Kamiya, M., Tanaka, T., Izumi, Y., Kretsinger, R.H. (2008). Flexible structures and ligand interactions of tandem repeats consisting of proline, glycine, asparagine, serine, and/or threonine rich oligopeptides in proteins. *Curr Protein Pept Sci.* 9(6):591-610.

Milani, M., Pesce, A., Bolognesi, M., Ascenzi, P. (2001). *Biochem Mol Biol Educ* 29:123–125.

Milani, M., Pesce, A., Ouellet, Y., Ascenzi, P., Guertin, M., Bolognesi, M. (2001). *Mycobacterium tuberculosis* hemoglobin N displays a protein tunnel suited for O₂ diffusion to the heme. *EMBO J* 20:3902–3909.

Milani, M., Savard, P.Y., Ouellet, H., Ascenzi, P., Guertin, M., Bolognesi, M. (2003). A TyrCD1/TrpG8 hydrogen bond network and a TyrB10TyrCD1 covalent link shape the heme distal site of *Mycobacterium tuberculosis* hemoglobin O. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:5766–5771.

Mirza, O., Henriksen, A., Ipsen, H., Larsen, J.N., Wissenbach, M., Spangfort, M.D., and Gajhede, M. (2000). Dominant epitopes and allergic cross-reactivity: complex formation between a Fab fragment of a monoclonal murine IgG antibody and the major allergen from birch pollen Bet v 1. *J. Immunol.* 165, 331–338.

Moreau, V., Fleury, C., Piquer, D., Nguyen, C., Novali, N., Villard, S., Laune, D., Granier, C., Molina, F. (2008). PEPOP: computational design of immunogenic peptides. *BMC Bioinformatics.* 9:71.

Mun, J.H., Mun, J.H., Kim, D.J., Choi, H.K., Gish, J., Debellé, F., Mudge, J., Denny, R., Endré, G., Saurat, O., Duzde, A.M., Kiss, G.B., Roe, B., Young, N.D., Cook, D.R. (2006). Distribution of microsatellites in the genome of *Medicago truncatula*: a resource of genetic markers that integrate genetic and physical maps. *Genetics* 172(4):2541–2555.

Naik, M. T., Chang, C., Kuo, I., Camy, Kung, C.-H., Yi, F.-C., Chua, K.-Y., and Huang, T.H. (2008). Roles of Structure and Structural Dynamics in the Antibody Recognition

of the Allergen Proteins: An NMR Study on *Blomia tropicalis* Major Allergen. *Structure* 16, 125–136.

Nascimento, C.J., Bloch Jr, C. (2001). Ressonância Magnética Nuclear: gradus primus. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*. 21: 52-61.

Neudecker, P., Nerkamp, J., Eisenmann, A., Nourse, A., Lauber, T., Schweimer, K., Lehmann, K., Schwarzinger, S., Ferreira, F., Rösch, P. (2004). Solution structure, dynamics, and hydrodynamics of the calcium-bound cross-reactive birch pollen allergen Bet v 4 reveal a canonical monomeric two EF-hand assembly with a regulatory function. *J Mol Biol*. 5;336(5):1141-57.

Niederberger, V., Valenta, R. (2006). Molecular approaches for new vaccines against allergy. *Expert Rev Vaccines*. Feb;5(1):103-10.

Nimrod, G., Schushan, M., Steinberg, D.M., Ben-Tal, N. (2008). Detection of functionally important regions in "hypothetical proteins" of known structure. *Structure*. Dec 10;16(12):1755-63.

Nitti, G., Orru, S., Bloch, C. Jr., Morhy, L., Marino, G., Pucci, P. (1995). Amino acid sequence and disulphide-bridge pattern of three gamma-thionins from *Sorghum bicolor*. *Eur J Biochem* 228:250–256.

Notredame, C., Higgins, D., Heringa, J. (2000). T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol* 302:205–217.

Oezguen, N., Zhou, B., Negi, S.S., Ivanciuc, O., Schein, C.H., Labesse, G., Braun, W. (2008). Comprehensive 3D-modeling of allergenic proteins and amino acid composition of potential conformational IgE epitopes. *Mol Immunol*. 45(14):3740-7.

Ouellet, H., Ranguelova, K., Labarre, M., Wittenberg, J.B., Wittenberg, B.A., Magliozzo, R.S., Guertin, M. (2007). Reaction of *Mycobacterium tuberculosis* truncated hemoglobin O with hydrogen peroxide: evidence for peroxidatic activity and formation of protein-based radicals. *J Biol Chem* 282:7491–7503.

Padavattan, S., Schirmer, T., Schmidt, M., Akdis, C., Valenta, R., Mittermann, I., Soldatova, L., Slater, J., Mueller, U., Markovic-Housley, Z. (2007). Identification of a B-cell epitope of hyaluronidase, a major bee venom allergen, from its crystal structure in complex with a specific Fab. *J Mol Biol*. 4;368(3):742-52.

Palmer, A. G. (2001). NMR probes of molecular dynamics: Overview and comparison with other techniques. *Annu. Rev. Biophys. Biomolec. Struct.* 30, 129-155.

Pan, Y.B., Burner, D.M., Legendre, B.L. (2000). An assessment of the phylogenetic relationship among sugarcane and related taxa based on the nucleotide sequence of 5S rRNA intergenic spacers. *Genetica* 108:285–295.

Pattaramanon, N., Sangha, N., Gafni, A. (2007). The carboxy-terminal domain of heat-shock factor 1 is largely unfolded but can be induced to collapse into a compact, partially structured state. *Biochemistry*. Mar 20;46(11):3405-15.

Pauli, G., Purohit, A., Oster, J.P., De Blay, F., Vrtala, S., Niederberger, V., Kraft, D., Valenta, R. (2000). Comparison of genetically engineered hypoallergenic rBet v 1 derivatives with rBet v 1 wild-type by skin prick and intradermal testing: results obtained in a French population. *Clin Exp Allergy*. Aug;30(8):1076-84.

Pawaria, S., Lama, A., Raje, M., Dikshit, K.L. (2008). Responses of *Mycobacterium tuberculosis* hemoglobin promoters to in vitro and in vivo growth conditions. *Appl Environ Microbiol*. Jun;74(11):3512-22.

Pelegri, P.B., Franco, O.L. (2005). Plant c-thionins: novel insights on the mechanism of action of a multi-functional class of defense proteins. *Int J Biochem Cell Biol* 37:2239–2253.

Peng, Z., Naclerio, R.M., Norman, P.S., Adkinson, Jr N.F. (1992). Quantitative IgE and IgG subclass responses during and after long-term ragweed immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 9:519-529.

Perutz MF, Muirhead H, Cox JM, Goaman LC, Mathews FS, McGandy EL, Webb LE. (1968). Three-dimensional Fourier synthesis of horse oxyhaemoglobin at 2.8 Å resolution: (1) x-ray analysis. *Nature*. Jul 6;219(5149):29-32.

Perutz, M.F., Muirhead, H., Cox, J.M., Goaman, L.C. (1968). Three-dimensional Fourier synthesis of horse oxyhaemoglobin at 2.8 Å resolution: the atomic model. *Nature*. Jul 13;219(5150):131-9.

Perutz, M.F., Paoli, M., Lesk, A.M. (1999). Fix L, a haemoglobin that acts as an oxygen sensor: signalling mechanism and structural basis of its homology with PAS domains. *Chem Biol* 6:291–297.

Pesce, A., Couture, M., Dewilde, S., Guertin, M., Yamauchi, K., Ascenzi, P., Moens, L., Bolognesi, M. (2000). A novel two-over-two alpha-helical sandwich fold is characteristic of the truncated hemoglobin family. *EMBO J* 19:2424–2434.

Peschel, A. (2002). How do bacteria resist human antimicrobial peptides? *Trends Microbiol* 10:179–186.

Peschel, A., Sahl, H.G. (2006). The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nat Rev Microbiol* 4:529–536.

Piotto, M., Saudek, V., Sklenar, V. (1992). Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *J Biomol NMR* 2:661–665.

Potts, M., Angeloni, S.V., Ebel, R.E., Bassam, D. (1992). Myoglobin in a cyanobacterium. *Science* 256:1690–1691.

Razzera, G., Vernal, J., Baruh, D., Serpa, V.I., Tavares, C., Lara, F., Souza, E.M., Pedrosa, F.O., Almeida, F.C., Terenzi, H., Valente, A.P. (2008) Spectroscopic

characterization of a truncated hemoglobin from the nitrogen-fixing bacterium *Herbaspirillum seropedicae*. *J Biol Inorg Chem*. Sep;13(7):1085-96.

Reddy, K.V., Yedery, R.D., Aranha, C. (2004). Antimicrobial peptides: premises and promises. *Int J Antimicrob Agents*. Dec;24(6):536-47.

Rivera, M., Caignan, G.A. (2004). Recent developments in the ¹³C NMR spectroscopic analysis of paramagnetic hemes and heme proteins. *Anal Bioanal Chem*. Mar;378(6):1464-83.

Rondeau, P., Rouch, C., Besnard, G. (2005). NADP-malate dehydrogenase gene evolution in *Andropogoneae* (Poaceae): gene duplication followed by sub-functionalization. *Ann Bot (Lond)* 96:1307–1314.

Rouvinen, J., Rautiainen, J., Virtanen, T., Zeiler, T., Kauppinen, J., Taivainen, A., Mäntyjärvi, R. (1999). Probing the molecular basis of allergy. three-dimensional structure of the bovine lipocalin allergen Bos d 2. *J Biol Chem*. Jan 22;274(4):2337-43.

Royer, W.E. Jr., Knapp, J.E., Strand, K., Heaslet, H.A. (2001). Cooperative hemoglobins: conserved fold, diverse quaternary assemblies and allosteric mechanisms. *Trends Biochem Sci*. May;26(5):297-304.

Saccetti, E. & Rosato, A. (2008). The war of tools: how can NMR spectroscopists detect errors in their structures? *J Biomol NMR*.40 (4):251-261.

Sanders, J.K.M., Hunter, B.K. (1993) *em Modern NMR spectroscopy – a guide for chemists*. Oxford University Press, New York.

Sattler, M., Schleucher, J., Griesinger, C. (1999) Heteronuclear multidimensional NMR experiments for the determination of proteins in solution employing pulsed field gradients. *Prog NMR Spectrosc*. 34: 95-158.

Schimoler-O'Rourke, R., Richardson, M., Selitrenniko, C.P. (2001). Zeamatin inhibits trypsin and α -amylase activities. *Appl Environ Microbiol* 67:2365–2366.

Schmid-Grendelmeier, P., Holzmann, D., Himly, M., Weichel, M., Tresch, S., Rückert, B., Menz, G., Ferreira, F., Blaser, K., Wüthrich, B., Cramer, R. (2003). Native Art v 1 and recombinant Art v 1 are able to induce humoral and T cell-mediated in vitro and in vivo responses in mugwort allergy. *J Allergy Clin Immunol* 111:1328-36.

Schweers, O., Schönbrunn-Hanebeck, E., Marx, A., Mandelkow, E. (1994). Structural studies of tau protein and Alzheimer paired helical filaments show no evidence for beta-structure. *J Biol Chem*. 269(39):24290-24297.

Scott, N.L., Lecomte, J.T. (2000). Cloning, expression, purification, and preliminary characterization of a putative hemoglobin from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Protein Sci* 9:587–597.

Seki, M., Narusaka, M., Kamiya, A., Ishida, J., Satou, M., Sakurai, T. (2002). Functional annotation of a full-length *Arabidopsis* cDNA collection. *Science* 296:141–145.

Sen, M., Kopper R., Pons, L., Abraham, E.C., Burks, A.W., Bannon, G.A. (2002). Protein structure plays a critical role in peanut allergen stability and may determine immunodominant IgE-binding epitopes. *J Immunol.* 169(2):882-887.

Shägger, H., von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166:368–379.

Shai, Y. (2002). Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers* 66:236–248.

Sharopova, N. McMullen, M.D., Schultz, L., Schroeder, S., Sanchez-Villeda, H., Gardiner, J., Bergstrom, D., Houchins, K., Melia-Hancock, S., Musket, T., Duru, N., Polacco, M., Edwards, K., Ruff, T., Register, J.C., Brouwer, C., Thompson, R., Velasco, R., Chin, E., Lee, M., Woodman-Cliekeman, W., Long, M.J., Liscum, E., Cone, K., Davis, G., Coe, E.H. Jr. (2002). Development and mapping of SSR markers for maize. *Plant Mol Biol* 48(5–6):463–481.

Sheffield, P., Garrard, S., Derewenda, Z. (1999). Overcoming expression and purification problems of RhoGDI using a family of "parallel" expression vectors. *Protein Expr Purif* 15:34-9.

Shokhireva, T.K., Shokhirev, N.V., Walker, F.A. (2003). Assignment of the ferriheme resonances of the high-spin forms of nitrophorins 1 and 4 by ¹H NMR spectroscopy: comparison to structural data obtained from X-ray crystallography. *Biochemistry* 42:679–693.

Shokhireva, T.K.H., Weichsel, A., Smith, K.M., Berry, R.E., Shokhirev, N.V., Balfour, C.A., Zhang, H., Montfort, W.R., Walker, F.A. (2008). Assignment of the ferriheme resonances of high- and low-spin forms of the symmetrical heme-reconstituted nitrophorins 1-4 by ¹H and ¹³C NMR spectroscopy: the dynamics of heme ruffling deformations *Inorg Chem* 46:2041–2056

Sickmeier, M., Hamilton, J.A., LeGall, T., Vacic, V., Cortese, M.S., Tantos, A., Szabo, B., Tompa, P., Chen, J., Uversky, V.N., Obradovic, Z., Dunker, A.K. (2006). DisProt: the Database of Disordered Proteins. *Nucleic Acids Res.* 2007 Jan;35(Database issue):D786-93.

Silverstein, R. M., Bassler, G. C. E Morril, T. C. (1979) em Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. Koogan S.A.

Silverstein, K.A., Moskal, W.A. Jr., Wu, H.C., Underwood, B.A., Graham, M.A., Town, C.D., VandenBosch, K.A. (2007). Small cysteine-rich peptides resembling antimicrobial peptides have been under-predicted in plants. *Plant J* 51:262–280.

Spronk, C.A., Nabuurs, S.B., Bonvin, A.M., Krieger, E., Vuister, G.W., Vriend, G. (2003). The precision of NMR structure ensembles revisited. *J Biomol NMR* 25:225–234.

Stewart, E.J., A° slund, F., Beckwith, J. (1998). Disulfide bond formation in the *Escherichia coli* cytoplasm: an in vivo role reversal for the thioredoxins. *EMBO J* 17:5543–5550.

Stivers, J.T., Abeygunawardana, C., Mildvan, A.S. (1996) ¹⁵N NMR relaxation studies of free and inhibitor-bound 4-oxalocrotonate tautomerase: backbone dynamics and entropy changes of an enzyme upon inhibitor binding. *Biochemistry* 35: 16036-16047.

Takahashi, S., Furukawa, T., Asano, T., Terajima, Y., Shimada, H., Sugimoto, A. (2005). Very close relationship of the chloroplast genomes among *Saccharum* species. *Theor Appl Genet* 110:1523–1529.

Tanabe, S. (2007). Epitope peptides and immunotherapy. *Curr Protein Pept Sci*. Feb;8(1):109-18.

Tavares, L.S., Santos, M. de O., Viccini, L.F., Moreira, J.S., Miller, R.N., Franco, O.L. (2008). Biotechnological potential of antimicrobial peptides from flowers. *Peptides*. Oct;29(10):1842-51.

Terras, F.R., Schoofs, H.M., De Bolle, M.F., Van Leuven, F., Rees, S.B., Vanderleyden, J. (1992) Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *J Biol Chem* 267:15301–15309.

Thevissen, K., Cammue, B.P., Lemaire, K., Winderickx, J., Dickson, R.C., Lester, R.L., Ferket, K.K., Van Even, F., Parret, A.H., Broekaert, W.F. (2000). A gene encoding a sphingolipid biosynthesis enzyme determines the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to an antifungal plant defensin from dahlia (*Dahlia merckii*). *Proc Natl Acad Sci USA* 15;97(17):9531–9536.

Thevissen, K., Ferket, K.K., François, I.E., Cammue, B.P. (2003). Interactions of antifungal plant defensins with fungal membrane components. *Peptides* 24:1705–1712.

Thevissen, K., Warnecke, D.C., François, E.J.A., Leipelt, M., Heinz, E., Ott, C. (2004). Defensins from insects plants interact with fungal glucosylceramides. *J Biol Chem* 279:3900–3905.

Thomma, B.P.H.J., Cammue, B.P.A., and Thevissen, K. (2002). Plant Defensins. *Planta* 216: 193-202.

Thorsteinsson, M.V., Bevan, D.R., Ebel, R.E., Weber, R.E., Potts, M. (1996). Spectroscopical and functional characterization of the hemoglobin of *Nostoc commune* (UTEX 584 (Cyanobacterial)). *Biochim Biophys Acta* 1292:133–139.

Till, S.J., Francis, J.N., Nouri-Aria, K., Durham, S.R. (2004) Mechanisms of immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol.* Jun;113(6):1025-34.

Tompa, (2002). Intrinsically unstructured proteins. *Trends Biochem Sci.* Oct;27(10):527-33.

Traidl-Hoffmann, C., Jakob, T., Behrendt, H. (2009). Determinants of allergenicity. *J Allergy Clin Immunol.* Jan 17. (in press).

Treviño, M.A., García-Mayoral, M.F., Barral, P., Villalba, M., Santoro, J., Rico, M., Rodríguez, R., Bruix, M. (2004). NMR solution structure of Ole e 6, a major allergen from olive tree pollen. *J Biol Chem.* 279(37):39035-41.

Trompette, A., Divanovic, S., Visintin, A., Blanchard, C., Hegde, R.S., Madan, R., Thorne, P.S., Wills-Karp, M., Gioannini, T.L., Weiss, J.P., Karp, C.L. (2009). Allergenicity resulting from functional mimicry of a Toll-like receptor complex protein. *Nature.* Jan 29;457(7229):585-8.

Tuskan, G.A., Difazio, S., Jansson, S., Bohlmann, J., Grigoriev, I., Hellsten, U., Putnam, N., Ralph, S., Rombauts, S., Salamov, A., Schein, J., Sterck, L., Aerts, A., Bhalerao, R.R., Bhalerao, R.P., Blaudez, D., Boerjan, W., Brun, A., Brunner, A., Busov, V., Campbell, M., Carlson, J., Chalot, M., Chapman, J., Chen, G.L., Cooper, D., Coutinho, P.M., Couturier, J., Covert, S., Cronk, Q., Cunningham, R., Davis, J., Degroeve, S., Déjardin, A., Depamphilis, C., Detter, J., Dirks, B., Dubchak, I., Duplessis, S., Ehrling, J., Ellis, B., Gendler, K., Goodstein, D., Gribskov, M., Grimwood, J., Groover, A., Gunter, L., Hamberger, B., Heinze, B., Helariutta, Y., Henrissat, B., Holligan, D., Holt, R., Huang, W., Islam-Faridi, N., Jones, S., Jones-Rhoades, M., Jorgensen, R., Joshi, C., Kangasjärvi, J., Karlsson, J., Kelleher, C., Kirkpatrick, R., Kirst, M., Kohler, A., Kalluri, U., Larimer, F., Leebens-Mack, J., Leplé, J.C., Locascio, P., Lou, Y., Lucas, S., Martin, F., Montanini, B., Napoli, C., Nelson, D.R., Nelson, C., Nieminen, K., Nilsson, O., Pereda, V., Peter, G., Philippe, R., Pilate, G., Poliakov, A., Razumovskaya, J., Richardson, P., Rinaldi, C., Ritland, K., Rouzé, P., Ryaboy, D., Schmutz, J., Schrader, J., Segerman, B., Shin, H., Siddiqui, A., Sterky, F., Terry, A., Tsai, C.J., Uberbacher, E., Unneberg, P., Vahala, J., Wall, K., Wessler, S., Yang, G., Yin, T., Douglas, C., Marra, M., Sandberg, G., Van de Peer, Y., Rokhsar, D. (2006). The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* 15;313(5793):1596–1604.

Uzan, J., Dewilde, S., Burmester, T., Hankeln, T., Moens, L., Hamdane, D., Marden, M.C., Kiger, L. (2004). Neuroglobin and other hexacoordinated hemoglobins show a weak temperature dependence of oxygen binding. *Biophys J* 87:1196–1204.

Valenta, R., and Niederberger, V. (2007). Recombinant allergens for immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol.* 119(4):826-30.

Valenta, R., Kraft, D. (2002). From allergen structure to new forms of allergen-specific immunotherapy. *Curr Opin Immunol.* 14(6):718-27.

Valente, A.P., Miyamoto, C.A., Almeida, F.C. (2006). Implications of protein conformational diversity for binding and development of new biological active compounds. *Curr Med Chem.* 13(30):3697-703.

Veldkamp, C.T., Peterson, F.C., Hayes, P.L., Mattmiller, J.E., Haugner, J.C., de la Cruz, N. (2007). On-column refolding of recombinant chemokines for NMR studies and biological assays. *Protein Expr Purif* 52:202–209.

Venarske, D. & deShazo, R.D. (2003). Molecular mechanisms of allergic disease. *South Med J.* 2003 Nov;96 (11):1049-54.

Vettore, A.L., da Silva, F.R., Kemper, E.L., Souza, G.M., da Silva, A.M., Ferro, M.I., Henrique-Silva, F., Giglioti, E.A., Lemos, M.V., Coutinho, L.L., Nobrega, M.P., Carrer, H., França, S.C., Bacci-Júnior, M., Goldman, M.H., Gomes, S.L., Nunes, L.R., Camargo, L.E., Siqueira, W.J., Van Sluys, M.A., Thiemann, O.H., Kuramae, E.E., Santelli, R.V., Marino, C.L., Targon, M.L., Ferro, J.A., Silveira, H.C., Marini, D.C., Lemos, E.G., Monteiro-Vitorello, C.B., Tambor, J.H., Carraro, D.M., Roberto, P.G., Martins, V.G., Goldman, G.H., de Oliveira, R.C., Truffi, D., Colombo, C.A., Rossi, M., de Araujo, P.G., Sculaccio, S.A., Angella, A., Lima, M.M., de Rosa Júnior, V.E., Siviero, F., Coscrato, V.E., Machado, M.A., Grivet, L., Di Mauro, S.M., Nobrega, F.G., Menck, C.F., Braga, M.D., Telles, G.P., Cara, F.A., Pedrosa, G., Meidanis, J., Arruda, P. (2003). Analysis and functional annotation of an expressed sequence tag collection for tropical crop sugarcane. *Genome Res* 13(12):2725–2735.

Vinogradov, S.N., Hoogewijs, D., Bailly, X., Arredondo-Peter, R., Gough, J., Dewilde, S., Moens, L., Vanfleteren, J.R. (2006). A phylogenomic profile of globins. *BMC Evol Biol* 6:31.

Vrtala, S., Hirtenlehner, K., Vangelista, L., Pastore, A., Eichler, H.G., Sperr, W.R., Valent, P., Ebner, C., Kraft, D., Valenta, R. (1997). Division of the major birch pollen allergen, Bet v 1, into two non-anaphylactic fragments. *Int Arch Allergy Immunol.* May-Jul;113(1-3):246-8.

Vrtala, S., Hirtenlehner, K., Susani, M., Akdis, M., Kussebi, F., Akdis, C.A., Blaser, K., Hufnagl, P., Binder, B.R., Politou, A., Pastore, A., Vangelista, L., Sperr, W.R., Semper, H., Valent, P., Ebner, C., Kraft, D., Valenta, R. (2001). Genetic engineering of a hypoallergenic trimer of the major birch pollen allergen Bet v 1. *FASEB J.* Sep;15(11):2045-7.

Vrtala, S., Focke-Tejkl, M., Swoboda, I., Kraft, D., Valenta, R. (2004). Strategies for converting allergens into hypoallergenic vaccine candidates. *Methods.* Mar 32(3):313-20.

Vuletich, D.A., Lecomte, J.T. (2006). A phylogenetic and structural analysis of truncated hemoglobins. *J Mol Evol* 62:196–210.

Wainwright, L.M., Wang, Y., Park, S.F., Yeh, S.R., Poole, R.K. (2006). Purification and spectroscopic characterization of Ctb, a group III truncated hemoglobin implicated in oxygen metabolism in the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni*. *Biochemistry* 45:6003–6011.

Wajcman, H., Kiger, L. (2002) Hemoglobin, from microorganisms to man: a single structural motif, multiple functions. *C R Biol. Dec*;325(12):1159-74.

Walgraffe, D., Mattéotti, C., El Bakkoury, M., Garcia, L., Marchand, C., Bullens, D., Vandenbranden, M., Jacquet, A. (2009). A hypoallergenic variant of Der p 1 as a candidate for mite allergy vaccines. *J Allergy Clin Immunol*. Jan 17.

Wallner, M., Stöcklinger, A., Thalhamer, T., Bohle, B., Vogel, L., Briza, P., Breiteneder, H., Vieths, S., Hartl, A., Mari, A., Ebner, C., Lackner, P., Hammerl, P., Thalhamer, J., Ferreira, F. (2007). Allergy multivaccines created by DNA shuffling of tree pollen allergens. *J Allergy Clin Immunol* 120:374-80.

Wang Z, Wang G. APD: the Antimicrobial Peptide Database. *Nucleic Acids Res*. 2004 Jan 1;32(Database issue):D590-2.

Watts, R.A., Hunt, P.W., Hvitved, A.N., Hargrove, M.S., Peacock, W.J., Dennis, E.S. (2001). A hemoglobin from plants homologous to truncated hemoglobins of microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:10119–10124.

Weber, R.E., Fago, A. (2004). Functional adaptation and its molecular basis in vertebrate hemoglobins, neuroglobins and cytoglobins. *Respir Physiol Neurobiol* 144:141–159.

Wild, C., Wallner, M., Hufnagl, K., Fuchs, H., Hoffmann-Sommergruber, K., Breiteneder, H., Scheiner, O., Ferreira, F., Wiedermann, U. (2007). A recombinant allergen chimer as novel mucosal vaccine candidate for prevention of multi-sensitivities. *Allergy* 62:33-41.

Wishart, D.S., Bigam, C.G., Yao, J., Abildgaard, F., Dyson, H.J., Oldfield, E., Markley, J.L., Sykes, B.D. (1995). ^1H , ^{13}C and ^{15}N chemical shift referencing in biomolecular NMR. *J Biomol NMR* 6:135-40.

Wishart, D.S., Sykes, B.D. (1994). The ^{13}C chemical-shift index: a simple method for the identification of protein secondary structure using ^{13}C chemical-shift data. *J Biomol NMR* 4:171-80.

Wittenberg, J.B., Bolognesi, M., Wittenberg, B.A., Guertin, M. (2002). Truncated hemoglobins: a new family of hemoglobins widely distributed in bacteria, unicellular eukaryotes, and plants. *J Biol Chem* 277:871–874.

Wolf-Watz, M., Thai, V., Henzler-Wildman, K., Hadjipavlou, G., Eisenmesser, E.Z., Kern, D. (2004). Linkage between dynamics and catalysis in a thermophilic-mesophilic enzyme pair. *Nat Struct Mol Biol.* Oct;11(10):945-9.

Wright, P.E., Dyson, H.J. (1999). Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm. *J Mol Biol.* Oct 22;293(2):321-31.

Wu, G., Wainwright, L.M., Poole, R.K. (2003). Microbial globins. *Adv Microb Physiol* 47:255–310.

Wultrich, K. (1986) *em NMR of proteins and Nucleic Acids.* Jon Wiley and Sons, New York.

Xu, Y., Wu, J., Gorenstein, D., Braun, W. (1999). Automated 2D NOESY assignment and structure calculation of Crambin(S22/I25) with the self-correcting distance geometry based NOAH/DIAMOD programs. *J Magn Reson.* Jan;136(1):76-85.

Yang, D., Kay, L.E. (1996). Contributions to conformational entropy arising from bond vector fluctuations measured from NMR-derived order parameters: application to protein folding. *J Mol Biol.* Oct 25;263(2):369-82.

Yeh, D.C., Thorsteinsson, M.V., Bevan, D.R., Potts, M., La Mar, G.N. (2000). Solution ¹H NMR study of the heme cavity and folding topology of the abbreviated chain 118-residue globin from the cyanobacterium *Nostoc commune*. *Biochemistry* 39:1389–1399.

Yount, N.Y., Yeaman, M.R. (2004). Multidimensional signatures in antimicrobial peptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:7363–7368.

Yount, N.Y., Yeaman, M.R. (2006). Structural congruence among membrane-active host defense polypeptides of diverse phylogeny. *Biochim Biophys Acta* 1758:1373–1386.

Yu, J., Wang, J., Lin, W., Li, S., Li, H., Zhou, J., Ni, P., Dong, W., Hu, S., Zeng, C., Zhang, J., Zhang, Y., Li, R., Xu, Z., Li, S., Li, X., Zheng, H., Cong, L., Lin, L., Yin, J., Geng, J., Li, G., Shi, J., Liu, J., Lv, H., Li, J., Wang, J., Deng, Y., Ran, L., Shi, X., Wang, X., Wu, Q., Li, C., Ren, X., Wang, J., Wang, X., Li, D., Liu, D., Zhang, X., Ji, Z., Zhao, W., Sun, Y., Zhang, Z., Bao, J., Han, Y., Dong, L., Ji, J., Chen, P., Wu, S., Liu, J., Xiao, Y., Bu, D., Tan, J., Yang, L., Ye, C., Zhang, J., Xu, J., Zhou, Y., Yu, Y., Zhang, B., Zhuang, S., Wei, H., Liu, B., Lei, M., Yu, H., Li, Y., Xu, H., Wei, S., He, X., Fang, L., Zhang, Z., Zhang, Y., Huang, X., Su, Z., Tong, W., Li, J., Tong, Z., Li, S., Ye, J., Wang, L., Fang, L., Lei, T., Chen, C., Chen, H., Xu, Z., Li, H., Huang, H., Zhang, F., Xu, H., Li, N., Zhao, C., Li, S., Dong, L., Huang, Y., Li, L., Xi, Y., Qi, Q., Li, W., Zhang, B., Hu, W., Zhang, Y., Tian, X., Jiao, Y., Liang, X., Jin, J., Gao, L., Zheng, W., Hao, B., Liu, S., Wang, W., Yuan, L., Cao, M., McDermott, J., Samudrala, R., Wang, J., Wong, G.K., Yang, H. (2005). The genomes of *Oryza sativa*: a history of duplications. *PLoS Biol* 3:E38.

de Zélicourt, A., Letousey, P., Thoiron, S., Campion, C., Simoneau, P., Elmorjani, K., Marion, D., Simier, P., Delavault, P. (2007). Ha-DEF1, a sunflower defensin, induces cell death in Orobanche parasitic plants. *Planta*. Aug;226(3):591-600.

Zhang Y, Stec B, Godzik A. (2007). Between order and disorder in protein structures: analysis of "dual personality" fragments in proteins *Structure*. Sep;15(9):1026-8.

Zidek L, Novotny MV, Stone MJ. (1999). Increased protein backbone conformational entropy upon hydrophobic ligand binding. *Nat Struct Biol*. Dec;6(12):1118-21.

Zilber-Rosenberg I, Rosenberg E. (2008). Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiol Rev*. Aug;32(5):723-35.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)