

**Estudos estruturais e funcionais sobre duas lectinas: cadeia B
recombinante da Pulchellina & Camptosemina**

Leandro Seiji Goto

Tese apresentada ao Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências: Física Aplicada – Opção Física Biomolecular.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Ulian de Araújo

São Carlos

2007

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Goto, Leandro Seiji

“Estudos estruturais e funcionais sobre duas lectinas:cadeia B recombinante da Pulchellina & Camptosemina”

Leandro Seiji Goto – São Carlos, 2007

Tese (Doutorado) – Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2007
Página: 163

Área: Física Aplicada – Opção Física Biomolecular
Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Ulian de Araújo

1. Pulchellina; 2. Camptosemina; 3. Lectinas vegetais.

I. Título

*Em homenagem a Shigeco Goto,
Meu pai.*

Agradecimentos

Agradeço às pessoas e instituições que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

À minha orientadora, professora Ana Paula Ulian de Araújo, minha gratidão pelo apoio, paciência e confiança depositados.

À professora Leila Maria Beltramini, meu agradecimento pelo incentivo, boa conversa e pela orientação, sobretudo nos experimentos de CD e fluorescência.

À Derminda Isabel de Moraes, técnica do Grupo de Biofísica Molecular “Sérgio Mascarenhas”, pela colaboração nos experimentos de reenovelamento da rPBC e ajuda na purificação da camptosemina, além do apoio geral.

Aos professores Renato Azevedo Moreira da Universidade Federal do Ceará, o pioneiro no isolamento da pulchellina, que gentilmente cedeu as sementes de *Abrus pulchellus*, Otávio Henrique Thiemann e Heloísa Sobreiro Selistre-Araújo e seus alunos Susana Andréa Sculaccio e Márcia Regina Commineti pelo auxílio nas etapas de seqüenciamento e ensaios de adesão celular.

A André Luís Coelho da Silva pela colaboração nos experimentos de junção das cadeias A e B da pulchellina.

A Wânius José Garcia da Silva, o “conterrâneo de Itapeva”, pelos experimentos com a camptosemina e pelo bate-papo.

À Melissa Barbano Trindade, Alessandra Riposati Arantes, Marcel Nakahira, Daniela Iamassaki Staquicini, Gustavo C. Molina, Anemari Ramos Dinarte dos Santos e Daiane Hansen, pessoas com quem convivi e que seguiram seus caminhos.

Aos colegas de trabalho: Joci Neuby Alves Macedo, Débora Fernanda Vieira, Luis Fernando Reyes, Assuero Faria Garcia, José Luiz de Souza Lopes, Roberto Fukuhara, Ana Isabel Camargo, Daniel Ferreira Silva, Ernanni Damião Vieira, Marli Leite Moraes, Erick Piovesan, Fernando Alves de Melo, Ana Paula Citadini, Célia Caruso, Lia Munhoz Benati Napolitano, Fernando Alessandro, Ronny Rocha Ribeiro, José Fernando Lima, Sheila Gonçalves Carvalho e Júlio Carvalho. Desculpem-me por alguma coisa, obrigado por tudo.

Ao professor Otaciro Rangel Nascimento, pela “filosofia de cafezinho” e bom convívio.

A Júlio Cesar Pissuti Damálio, (o “pulch-man”, especialista honorário), um abraço.

À Susana Andréa Sculaccio e Elisandra Márcia Rodrigues, as “vizinhas do outro lado da rua” do laboratório, boa amizade.

À Fernanda Aparecia Heleno Batista pela boa conversa, incentivo e suporte nos experimentos referentes à camptosemina.

À Andressa Patrícia Alves Pinto, técnica do Grupo de Biofísica Molecular “Sérgio Mascarenhas”, pela disposição em auxiliar em qualquer etapa dos experimentos e agradável companhia.

À Priscila Vasques Castilho (“ow coisa”), doutoranda pelo PPGEv-UFSCar, pelo inestimável auxílio nos experimentos e pela confiança recíproca.

Agradeço à Sirlei Ricarte Bento, minha esposa, pelo apoio, dedicação, paciência (muita mesmo), e plena confiança em minhas capacidades tanto nos bons como maus momentos.

Aos amigos “virtuais” Gilmar Ferreira Gonçalves (Pipoqueiro), João Alves de Siqueira Netto (“7MILHEIRO”) e Kika (“Foguentinha”) pela diversão e conversas.

Aos grandes amigos Gengis Kami Ferro Kamimura e toda a família Kamimura, por terem me auxiliado diversas vezes, Adriano de Campos (“o chato”) pela boa amizade, Eduardo Fagian, Rosângela C. Souza, Isabel Ianelli (“Bel”). Um abraço a todos.

Ao meu pai, Shiguo Goto, grande patrocinador de meu desenvolvimento, referência de “onde isto tudo começou” e “para onde isto está indo” e sua esposa Ximena Carolina Goto, obrigado por tudo. Aos meus irmãos Marcos Yuji Goto e Cíntia Mayumi Goto, muito obrigado pelo carinho. Torço por vocês.

À minha mãe, Célia Goto, saudades.

A todos os meus professores meu muito obrigado.

Esta pesquisa foi financiada com recursos das agências CAPES e FAPESP.

Lista de Abreviaturas

BLAST: “*Basic Local Alignment Search Tool*”, programa para busca de identidades seqüenciais no banco de dados GenBank do NCBI.

BSA: “*Bovine Serum Albumin*”, albumina de soro bovino.

CBD: “*Celulose-Binding Domain*”, domínio ligante de celulose para purificação por afinidade em coluna de celulose.

CD: “*Circular Dichroism*”, dicroísmo circular.

cDNA: DNA complementar.

CDPro: Pacote de programas contendo os programas CONTINLL, CDSSTR, SELCON3 e CLUSTER para a análise de espectros de CD.

CMFDA: Cloro-Metil Fluoresceína Diacetato, fluoróforo marcador de células vivas de mamífero.

ConA: “*Canavalia ensiformis Agglutinin*”, concanavalina A, lectina de Feijão de Porco.

ConBr: aglutinina de *Canavalia brasiliensis* (feijão-bravo do Ceará).

D. L. 50: “Dosagem Letal 50%”, Concentração na qual morre 50% de indivíduos.

D.O. 280 nm: Densidade óptica em 280 nm.

D.O. 600 nm: Densidade óptica em 600 nm.

DBL: “*Dolichos biflorus Lectin*”, agglutinina de *Dolichos biflorus* (“*Horse gram*”).

dG: desoxiguanosina.

D-Gal: Açúcar D-Galactose.

DGL: aglutinina de *Dioclea grandiflora* (Mucuna).

DIAB: aglutinina de *Dolichos lablab* (Feijão indiano).

DMEM: “*Dubelco Modified Eagle Medium*”, meio de cultura para células de mamífero.

dNTP: desoxinucleotídeo trifosfato.

DTT: ditioneitol, um ditiol redutor.

ECorL: “*Erythrina corallodendron Lectin*”, lectina de flor-de-coral.

EDTA: ácido etilenodiamonoteracético.

ERAD: “*Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation*”

FBS: “Fetal Bovine Serum”, soro fetal bovino.

GalNAc: *N*-acetil galactosamina.

GenBank: banco de dados de seqüências de DNA e proteínas no NCBI.

GLLa: “*Galactia lindenii Agglutinin*”, aglutinina de *Galactia lindenii*.

IPTG: Isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo, um desrepressor do sistema de expressão baseado na T7 RNA polimerase.

JIP60: “*Jasmonate-Induced Protein*” de 60 kDa, uma RIP do tipo 3 de cevada.

kDa: kilo Daltons.

LB: meio de cultura Lúria-Bertani.

MAL: “*Maackia amurensis Lectin*”, aglutinina de *Maackia amurensis*.

mRNA: RNA mensageiro.

NCBI: “National Center for Biotechnology Information”.

P.I.: ponto isoelétrico.

PBS: “*Phosphate Buffer Saline*”.

PCR: “*Polymerase Chain Reaction*”, reação em cadeia da DNA polimerase.

PDB: “*Protein Data Bank*”, banco de dados de estruturas resolvidas de proteínas.

PHA: “*Phaseolus vulgaris Agglutinin*”, fitoemaglutinina A de feijão.

PHAL: “*Phaseolus vulgaris Leuco-Agglutinin*”, leuco-aglutinina de feijão.

PNA: “*Peanut Agglutinin*”, aglutinina de amendoim (*Arachis hypogea*).

pPBC: vetor de expressão bacteriano para a produção da rPBC livre de fusão.

RACE: “*Rapid Amplification of cDNA Ends*”, Técnica para a amplificação por PCR de extremidades de cDNAs.

RCA120: uma aglutinina, RIP do tipo 2 de *Ricinus*.

RIP: “*Ribosome-Inactivating Protein*”, proteína inativadora de ribossomos.

rPBC: “*Recombinant Pulchellin Binding Chain*”, Cadeia B recombinante da pulchellina.

RPM: rotações por minuto.

RT-PCR: “*Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*”, reação em cadeia da DNA polimerase acoplada à síntese de cDNA pela transcriptase reversa.

SBA: “*Soy Bean Agglutinin*”, aglutinina de grão de soja (*Glycine max*).

SDS-PAGE: “*Sodium Dodecylsulphate Polyacrilamide Gel Electrophoresis*”, eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de dodecilsulfato de sódio.

TAE: Tampão Tris-Ácido acético-EDTA.

Triton X-100: um detergente neutro.

TxLCI: superlectina isolada do bulbo de tulipas.

UEAII: “*Ulex europeus Agglutinin II*”, aglutinina de *Ulex europaeus* (Gorse).

WBA: “*Winged Bean agglutinin*”, aglutinina de *Psophocarpus tetragonolobus*.

WGA: “*Wheat Germ Agglutinin*”, aglutinina de germen de trigo.

Índice

CAPÍTULO I: “PROPRIEDADES BIOMOLECULARES DA CADEIA B RECOMBINANTE DA PULCHELLINA”	1
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 - <i>As Primeiras Lectinas Vegetais Descritas: Proteínas Inativadoras de Ribossomos do tipo 2</i>	2
1.2 - <i>O mecanismo de ação</i>	3
1.3 - <i>A subunidade catalítica</i>	3
1.4 - <i>A subunidade ligante a carboidratos</i>	6
1.5 - <i>Utilização terapêutica de RIPs</i>	8
1.6 - <i>RIPs do tipo 2 e sua ampla variância em toxicidade</i>	9
1.7 - <i>O mecanismo de endocitose das RIPs do tipo 2</i>	9
1.8 - <i>Pulchellina, uma RIP do tipo 2 das sementes de Abrus pulchellus</i>	12
1.9 - <i>A cadeia B da pulchellina: clonagem e produção recombinante</i>	13
2. OBJETIVOS	17
2.1 - <i>Objetivos gerais</i>	18
2.2 - <i>Objetivos específicos</i>	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1 - <i>Reenovelamento e Purificação da rPBC</i>	20
3.1.1 - <i>Purificação dos corpos de inclusão</i>	20
3.1.2 - <i>Desnaturação dos corpos de inclusão</i>	21
3.1.3 - <i>Purificação da rPBC reenovelada</i>	22
3.2 - <i>Influência de diferentes relações de par redox no rendimento do reenovelamento</i>	23
3.3 - <i>Expressão da rPBC no espaço periplasmático fusionada com “Celulose-Binding Domain”</i>	23
3.3.1 - <i>Subclonagem no vetor pET37b+</i>	23
3.3.2 - <i>Expressão da proteína de fusão na linhagem ER2566</i>	25
3.3.3 - <i>Purificação da fusão CBD-rPBC</i>	26
3.3.4 - <i>Clivagem da proteína de fusão</i>	26
3.4 - <i>Medidas Espectroscópicas</i>	26
3.4.1 - <i>Validação do procedimento de reenovelamento</i>	27
3.4.2 - <i>Estabilidade da rPBC em função do aumento de temperatura</i>	27
3.4.3 - <i>Estabilidade da rPBC em função do pH</i>	28
3.5 - <i>Atividade da rPBC em células de mamífero</i>	28
3.5.1 - <i>Cultivo das células</i>	29
3.5.2 - <i>Marcação com Cloro-Metil Fluoresceína Diacetato (CMFDA)</i>	30
3.5.3 - <i>“Coating”</i>	30
3.5.4 - <i>Ensaio de promoção de adesão</i>	31
3.5.6 - <i>Ensaio de inibição de interação de célula linhagem K-562α2β1 com o colágeno I</i>	31
3.5.7 - <i>Inibição da adesão por competição com açúcares</i>	32
3.5.8 - <i>Marcação e visualização “in situ” da interação da rPBC com células K-562</i>	33
3.5.9 - <i>Marcação e visualização “in situ” da interação da rPBC com células HeLa</i>	34
3.5.10 - <i>Localização intracelular da rPBC em células K-562</i>	35
3.5.11 - <i>Etapas de endocitose discriminativas entre rPBC e pulchellina nativa em células K-562 vivas</i>	36
3.6 - <i>Atividade “in vivo” da cadeia B recombinante</i>	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1 - <i>Reenovelamento e Purificação da rPBC</i>	39
4.1.1 - <i>Purificação dos corpos de inclusão</i>	39
4.1.2 - <i>Desnaturação dos corpos de inclusão</i>	39
4.1.3 - <i>Agregação Solúvel da rPBC X Purificação da rPBC reenovelada</i>	41
4.1.4 - <i>Purificação da rPBC reenovelada</i>	43
4.2 - <i>Influência de diferentes relações de par redox no rendimento do reenovelamento</i>	44
4.3 - <i>Expressão da rPBC no espaço periplasmático fusionada com “Celulose-Binding Domain” (CBD)</i>	46
4.3.1 - <i>Condições de indução da rPBC fusionada com “Celulose-Binding Domain” (CBD)</i>	46
4.3.2 - <i>Purificação da fusão CBD-rPBC</i>	48
4.3.4 - <i>Clivagem da proteína de fusão CBD-rPBC</i>	49
4.4 - <i>Medidas Espectroscópicas</i>	51

4.4.1 - Estabilidade da rPBC em função do pH.....	51
4.4.2 - Estabilidade da rPBC em função do aumento de temperatura.....	55
4.5 - <i>Ensaio com células de mamífero</i>	58
4.5.1 - Ensaio de promoção de adesão.....	58
4.5.2 - Ensaio de inibição de interação de células da linhagem K-562 α 2 β 1 com o colágeno I.....	61
4.5.3 - Inibição da adesão por competição com açúcares.....	62
4.5.4 - Visualização da interação da rPBC com células K-562.....	65
4.5.5 - Localização intracelular da rPBC em células K-562 por microscopia de fluorescência.....	67
4.5.6 - Localização intracelular da rPBC em células K-562 por microscopia confocal.....	70
4.5.7 - Etapas de endocitose discriminativas entre rPBC e pulchellina nativa em células K-562 vivas.....	73
4.6 - <i>Atividade “in vivo” da holotoxina recomposta a partir de cadeias A e B recombinantes produzidas isoladamente</i>	76
4.6.1 - Dinâmica da formação do heterodímero sob análise em SDS-PAGE.....	76
4.6.2 - Atividade biológica do heterodímero reconstituído.....	77
CAPÍTULO II: “ESTUDOS ESTRUTURAIS DA CAMPTOSEMINA, LECTINA DE CAMPTOSEMA ELLIPTICUM”.....	80
5. INTRODUÇÃO.....	80
5.1 - <i>Distribuição de lectinas nos vegetais</i>	81
5.2 - <i>Classificação das lectinas vegetais</i>	82
5.3 - <i>A família das lectinas de leguminosas</i>	84
5.4 - <i>Atividade biológica de lectinas de leguminosas</i>	89
5.5 - <i>O gênero Camptosema</i>	91
5.6 - <i>Camptosemina, uma lectina de leguminosa</i>	92
6. OBJETIVOS.....	94
6.1 - <i>Objetivos gerais</i>	95
6.2 - <i>Objetivos específicos</i>	95
7. MATERIAIS E MÉTODOS.....	96
7.1 - <i>Purificação da camptosemina</i>	97
7.1.1 - Cromatografia de exclusão molecular.....	97
7.1.2 - Cromatografia de troca iônica.....	98
7.1.3 - Atividade hemaglutinante.....	98
7.2 - <i>Isolamento do cDNA</i>	99
7.2.1 - Clonagem do cDNA.....	101
7.2.2 - RACE 5' (“ <i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i> ”).....	102
7.3 - <i>Espectroscopia</i>	105
7.3.1 - Estabilidade térmica.....	106
7.3.2 - Mudanças estruturais em função do pH.....	107
7.4 - <i>Promoção de adesão de células de câncer de mama</i>	107
8. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	108
8.1 - <i>Purificação da camptosemina</i>	109
8.2 - <i>Atividade biológica da camptosemina</i>	112
8.3 - <i>Isolamento do cDNA</i>	113
8.3.1 - Amplificação e clonagem do cDNA.....	114
8.3.2 - RACE 5'.....	117
8.3.3 - Análise do seqüenciamento.....	119
8.4 - <i>Estudos estruturais</i>	127
8.4.1 - Estabilidade térmica.....	127
8.4.2 - Mudanças estruturais em função do pH.....	137
9. CONCLUSÕES.....	150
9.1 - <i>Cadeia B da pulchellina recombinante</i>	151
9.2 - <i>Camptosemina</i>	151
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	152
11. ANEXOS.....	164

Resumo

Lectinas estão situadas dentro de um grupo estruturalmente diverso de proteínas que se ligam a carboidratos e glicoconjugados com grande especificidade. Encontradas em diversos organismos, elas são moléculas extremamente úteis na caracterização de sacarídeos, como agentes mediadores de endereçamento de fármacos ou até mesmo como marcadores de superfície celular. A pulchellina é uma glicoproteína heterodimérica ligante de D-Galactose oriunda de sementes de *Abrus pulchellus* e classificada como proteína inativadora de ribossomo do tipo 2 (“*type 2 ribosome-inactivating protein*” - type 2 RIP). A cadeia B recombinante da pulchellina (rPBC) foi previamente produzida em *E. coli* BL21(DE3). Neste presente trabalho, a rPBC é analisada quanto a sua atividade, interação com células de mamíferos “*in vitro*” e estabilidade estrutural. Os resultados indicam que a rPBC possui seletividade quanto a tipos celulares alvo e é endocitada ativamente, provavelmente compartilhando a via de endocitose descrita para outras RIPs. Além disto, a rPBC foi unida à cadeia catalítica e o heterodímero resultante demonstrou toxicidade similar à da holotoxina nativa, confirmando a atividade da rPBC e atribuindo-lhe papel essencial no mecanismo de intoxicação.

Uma segunda parte deste trabalho tratou de outra lectina, extraída de sementes de *Camptosema ellipticum*. Recentemente, experimentos com extratos aquosos obtidos a partir de sementes de *Camptosema ellipticum* demonstraram possuir atividade hemaglutinante frente a hemácias humanas. Tal atividade foi atribuída a um dado componente protéico que foi então purificado através de cromatografias de troca iônica e exclusão molecular. A proteína, então chamada camptosemina, demonstrou ocorrer na forma de um tetrâmero e cujo estado de oligomerização pode ser controlado pelo pH do meio. Informações sobre a seqüência primária na porção amino-terminal, obtidas por seqüenciamento de aminoácidos, permitiram o desenho de oligonucleotídeos degenerados para a amplificação e clonagem de seu cDNA. As seqüências dos clones obtidos foram submetidas a diversas rotinas de procura de dados do NCBI. Entre os resultados retornados encontraram-se a concanavalina e a aglutinina de amendoim, dois representantes da chamada família de lectinas de leguminosas. Representantes deste grupo compartilham com a camptosemina o tamanho de seus monômeros e a forma de controle de seus graus de oligomerização. O presente trabalho traz a caracterização preliminar da camptosemina quanto a sua seqüência primária e oligomerização através de técnicas de clonagem e de espectroscopia. Foi possível a clonagem de duas variantes para o cDNA da camptosemina cujas seqüências prevêm um peptídeo sinal *N*-terminal ausente na proteína madura. As seqüências primárias deduzidas são muito semelhantes entre si e em comparação com outros membros da família de lectinas de leguminosas. A camptosemina se demonstrou extremamente resistente a mudanças de temperatura, exibindo sua dissociação em monômeros somente sob pHs extremamente ácidos ou alcalinos.

Abstract

Lectins have been placed in a structurally diverse group of proteins that bind carbohydrates and glycoconjugates with high specificity. Found in several organisms, they are extremely useful molecules in the characterization of saccharides, as drug delivery mediators, and even as cellular surface markers. Pulchellin is a D-Galactose-binding heterodimeric glycoprotein from *Abrus pulchellus* seeds and classified as a type-2 ribosome-inactivating protein (type-2 RIP). The recombinant pulchellin B (rPBC) was previously produced in *E. coli* BL21 (DE3). In the present work, rPBC is analyzed with respect to its interaction with mammal cells “*in vitro*” and structural stability. Results show that rPBC has selectivity for targeted cell types and that it is actively endocytosed, probably by the same route described for other RIPs. Furthermore, rPBC was bonded to the catalytic chain and the resulting heterodimer has shown toxicity degree very similar to the native holotoxin, confirming rPBC activity and attributing it an essential role in the intoxication mechanism.

A second part of this work has dealt with another lectin extracted from the seeds of *Camptosema ellipticum*. Recently, experiments with water-soluble extracts obtained from the seed of *Camptosema ellipticum* have shown to have hemagglutinative properties when assayed with human erythrocytes. Such biological activity was attributed to a certain proteic component that was purified by ion-exchange and size-exclusion chromatographies. The protein, so called camptosemin, has shown to occur as a tetramer and which oligomerization's state could be driven by the environmental pH. Primary sequence information from the amino-terminal portion, obtained by aminoacid sequencing, allowed the design of degenerated oligonucleotides for the amplification and cloning of its cDNA. The obtained clones' sequences were submitted to several NCBI data bank search scripts. Among the retrieved results were found concanavalin and peanut agglutinin, two representatives of the called legume lectins family. Members of this group share with camptosemin their monomer sizes and the way their oligomerization state can be driven. This present work characterizes camptosemin with respect to its sequence and oligomerization using cloning and spectroscopy techniques. It was possible the cloning of two cDNA variants for camptosemin which sequences deduce an *N*-terminal signal peptide absent in the mature protein. Deduced primary sequences are very similar to each other and to other legume lectin members. Camptosemin has shown being extremely temperature resistant, only dissociating in monomeric subunits under extremely acid or alkaline pHs.

CAPÍTULO I: “Propriedades Biomoleculares da Cadeia
B Recombinante da Pulchellina”

Introdução

1 - Introdução

1.1 - As Primeiras Lectinas Vegetais Descritas: Proteínas Inativadoras de Ribossomos do tipo 2

A ocorrência na natureza de proteínas capazes de aglutinar eritrócitos é conhecida desde meados do fim do século 19. Tais proteínas foram então denominadas hemaglutininas, ou fitoaglutininas, devido ao fato de serem originalmente encontradas em extratos vegetais. O primeiro registro científico de tal proteína é creditado a Peter Hermann Stillmark, em sua tese de doutoramento apresentada à Universidade de Dorpat (atualmente Tartu, Estônia), uma das mais antigas universidades da Rússia czarista, em 1888 [1, 2]. Stillmark, trabalhando em sua tese de doutoramento no departamento de farmacologia de Dorpat sob orientação de Kobert [3], constatou que a toxina presente nas sementes de *Ricinus communis* era uma proteína e a denominou ricina. Por um breve tempo sua toxicidade foi atribuída diretamente à sua capacidade hemaglutinante. Posteriormente, Hellin, também trabalhando em conjunto com Kobert, fez descobertas similares com sementes de *Abrus precatorius* [4].

Paul Ehrlich com a sua máxima “*Corpora non agunt nisi fixata*” (substâncias não podem agir a não ser que estejam fixadas) contribuiu não só para o entendimento deste grupo de toxinas, mas também para o entendimento da especificidade imunológica antígeno-anticorpo [5, 6]. Levado pela convicção de que as toxinas teriam que se fixar nos tecidos para exercer sua ação, ele propôs que elas consistiam de duas partes: uma “*haptophore*” responsável por ligar-se ao tecido e uma “*toxophore*”, a porção tóxica. Ele concluiu que a porção “*haptophore*” ligava-se instantaneamente às células, mesmo sob baixas temperaturas, enquanto que a “*toxophore*” além de agir mais lentamente que a *haptophore*, seria inibida por baixas temperaturas.

1.2 - O mecanismo de ação

Dirheimer *et al.* (1968) reportaram que a incorporação de aminoácidos em uma suspensão de microsomas de ratos intoxicados por ricina era reduzida [7], o que corroborou com a observação de que células em cultura tinham sua síntese protéica inibida numa taxa maior que sua síntese de RNA e DNA [8, 9]. Tanto abrina quanto ricina inibem fortemente a síntese protéica em um sistema “*in vitro*” de reticulócitos de coelho, mantendo a estrutura de polirribossomos intacta, de forma que as toxinas agiriam obrigatoriamente sobre algum componente necessário para a elongação da cadeia polipeptídica nascente [10, 11]. Ambas as toxinas são compostas de duas cadeias peptídicas ligadas por uma ligação dissulfeto numa estrutura heterodimérica e em ambas, a subunidade tóxica era a que migrava mais rapidamente em eletroforese após tratamento redutor, a qual então foi designada de cadeia A [12, 13]. O fracionamento de lisados de reticulócitos permitiu demonstrar que a cadeia A das toxinas age sobre ribossomos [14, 15]. A cadeia A destas toxinas exerce sua atividade sobre a subunidade 60 S dos ribossomos [16] e o efeito destas interfere na interação entre fatores de elongação da cadeia polipeptídica com os ribossomos [15]. Uma única molécula da cadeia A é capaz de inativar irreversivelmente 2000 ribossomos por minuto e o K_m desta reação é 0.1-0.2 μM [17].

1.3 - A subunidade catalítica

A cadeia A foi demonstrada ser uma RNA *N*-glicosilase que remove um resíduo específico de adenina de um “*loop*” exposto da porção 28 S do RNA ribossomal

(A4324 do RNA 28 S de ratos) [18, 19]. Este “loop” (“loop” sarcina/ricina) (Figura 1.1) está envolvido na ligação de fatores de alongação de forma que ribossomos modificados pela cadeia enzimática são incapazes de continuar a síntese protéica. [20, 21].

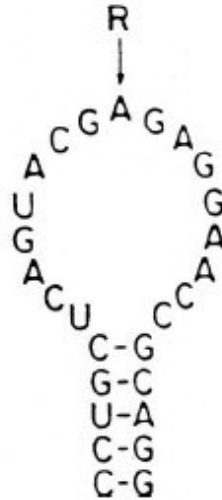


Figura 1.1 - Estrutura do “loop” sarcina/ricina da subunidade 28 S do RNA ribossomal (Endo et al., 1991). O resíduo de adenina removido pela ricina (R) está indicado.

A toxina não é capaz de quebrar a cadeia de RNA, mas o RNA depurinado é susceptível a hidrólise em pH alcalino e pH ácido na presença de anilina. A cadeia A da toxina é muito eficiente em sua catálise de forma que uma única molécula é capaz de inativar alguns milhares de ribossomos por minuto. A velocidade em que tal inativação ocorre é maior do que a taxa repositória de novos ribossomos, o que leva a um bloqueio da síntese protéica que culmina com a morte da célula intoxicada [17, 22].

Algumas plantas possuem proteínas relacionadas, estruturalmente semelhantes com a cadeia A das RIPs, sendo classificadas como RIPs do tipo 1. Exemplos destas são “*pokeweed anti-viral protein*”, gelonina, trichosantina e momordina, capazes de inativar ribossomos “*in vitro*” [23]. Geralmente, RIPs do tipo 1 são proteínas de cadeia peptídica única que possui atividade RNA *N*-glicosilase, mas além destas RIPs tipo 1

típicas, há poucos representantes compostos por duas cadeias polipeptídicas unidas por interações não covalentes (Figura 1.2) [24, 25].

Além das RIPs do tipo 1, existem as do tipo 2 que como a ricina e a abrina possuem a cadeia tóxica e a lectínica, além de relatos de RIPs do tipo 3 que são compostas de uma única cadeia peptídica relacionada com a cadeia tóxica, mas que necessitam de uma clivagem proteolítica para que exerçam sua atividade [26]. RIPs do tipo 3 são muito menos prevalentes que as dos tipos 1 e 2, e até o momento foram encontradas somente em milho e cevada, sendo que a RIP do tipo 3 de cevada (“*jasmonate-induced protein*” de 60 kDa – JIP60) possui um domínio *C*-terminal adicional de função desconhecida (Figura 1.2) [24, 27-30].

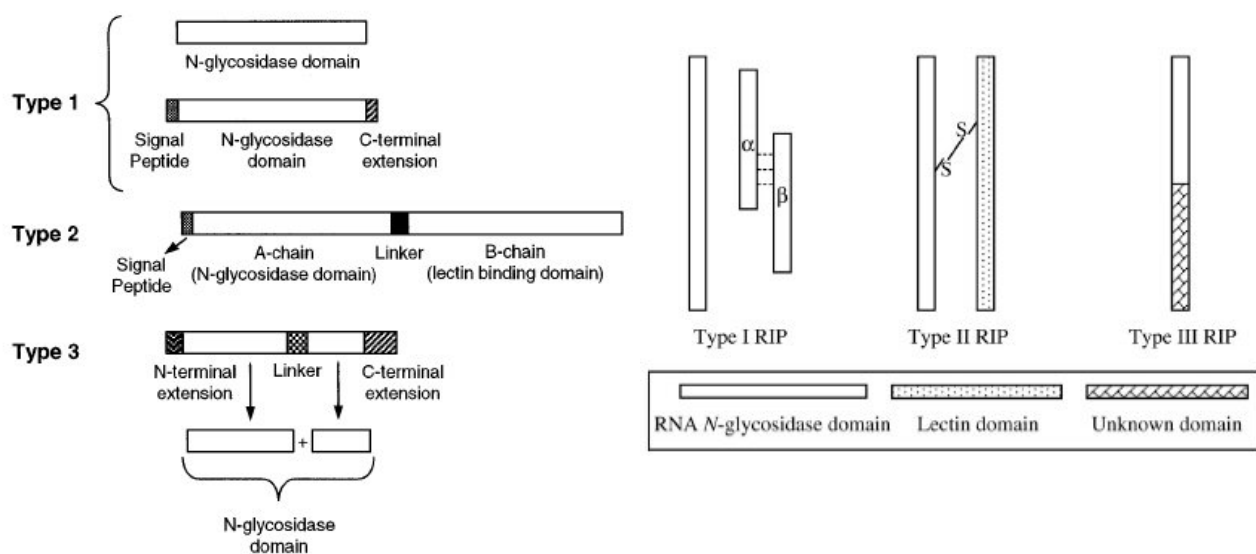


Figura 1.2 - Representações esquemáticas dos diferentes tipos de RIPs com base em suas composições estruturais. À esquerda, segundo Nielsen e Boston (2001) e à direita, retirado de Xu e Liu (2004). As figuras não foram modificadas para demonstrar certa discordância na nomenclatura e classificação das RIPs entre os dois autores.

RIPs do tipo 1 e 3 não são tóxicas devido à falta da cadeia B que é necessária para a ligação da toxina à célula alvo e direcionamento da proteína para o interior da célula. RIPs do tipo 2 como a ricina são sintetizadas como um precursor de cadeia única

que precisa ser clivado para dar origem as cadeias A e B. O precursor não clivado ainda é apto a se ligar a carboidratos (função lectina), entretanto é cataliticamente inerte, sendo incapaz de depurar o RNA 28 S [31].

1.4 - A subunidade ligante a carboidratos

A separação das duas cadeias da ricina e abrina por tratamento redutor permitiu que elas fossem também testadas quanto a sua capacidade de se ligar a carboidratos e aglutinar células. Esta propriedade foi então associada exclusivamente à cadeia B ligante a β -D-galactopiranosídeos. [12, 13].

O seqüenciamento de aminoácidos destas proteínas [32] e a clonagem dos seus genes [33, 34] somados a resolução de suas estruturas cristalográficas por difração de raios-X [35, 36] permitiram avaliar a extensa similaridade estrutural dentro deste grupo de proteínas.

A cadeia B é composta por dois domínios globulares semelhantes entre si, cada um destes possuindo um sítio de glicosilação e um sítio de ligação a carboidratos, razão de sua capacidade hemaglutinante (Figura 1.3). Cada um destes domínios é composto por três subdomínios, recrutados em cada domínio, sob uma pseudo-simetria tipo “*β-trefoil*” com predominância de estruturas secundárias do tipo folha-beta com poucas hélices e muitos elementos desordenados de estrutura secundária. É aceito que a cadeia B tenha evoluído a partir de uma série de duplicações gênicas em “*tandem*”, em que cada domínio parece ter sido composto por três peptídeos ancestrais ligantes a Galactose, respectivos aos subdomínios atuais denominados α , β e γ . Um novo evento de duplicação gênica teria originado o segundo domínio e mutações teriam desativado os subdomínios até que apenas dois destes, 1α e 2γ , permanecessem ativos [37-39].

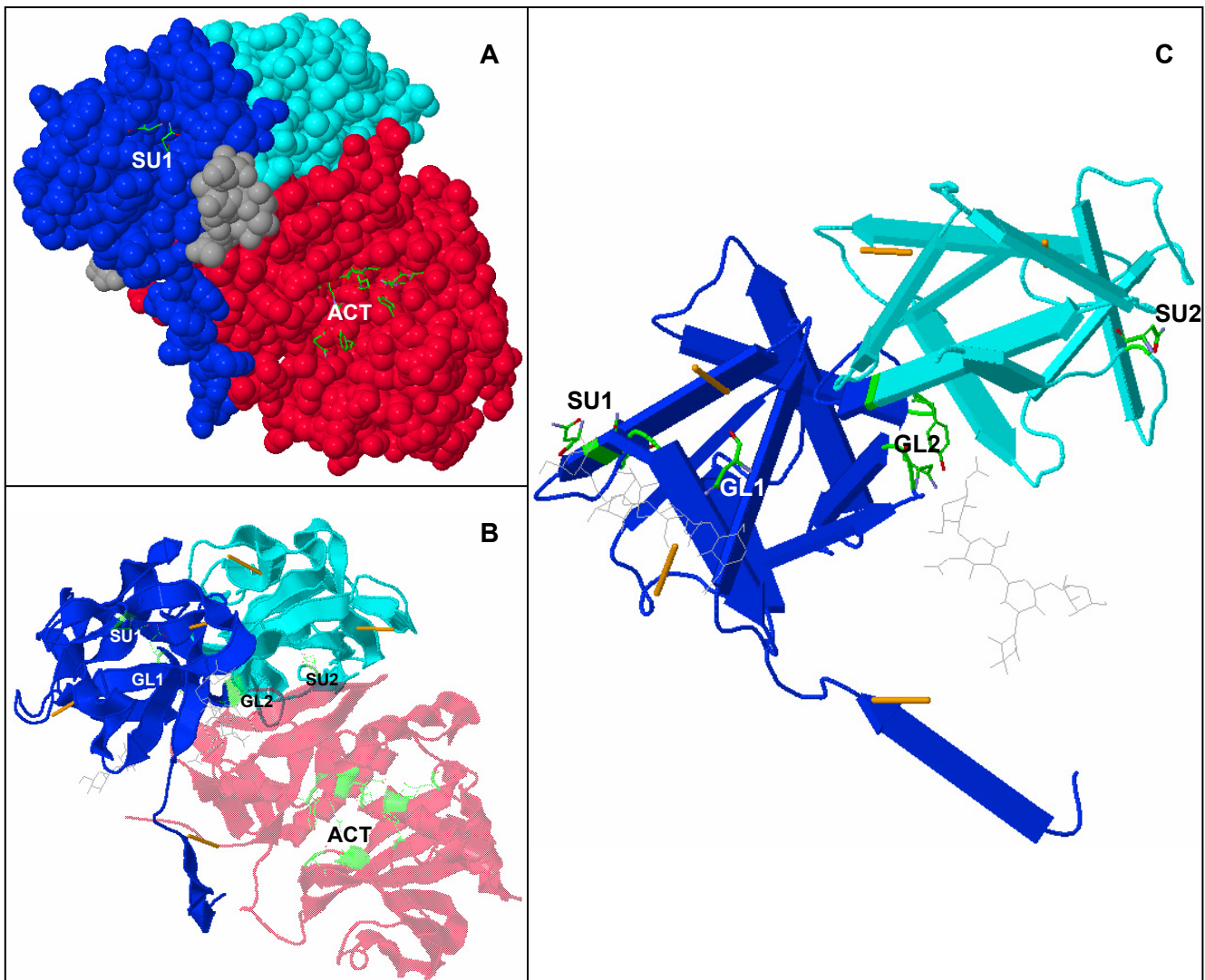


Figura 1.3 - Esquematização da estrutura tridimensional da abrina. A) Modelo para a estrutura tridimensional da abrina gerado por preenchimento do espaço ocupado por cada átomo da molécula. **B)** Modelo para a estrutura tridimensional da abrina gerado por representação das estruturas secundárias da molécula com a cadeia A semitransparente. **C)** Detalhamento da representação esquemática da cadeia B da abrina. Todos os esquemas obedecem ao mesmo esquema de cores. Em vermelho, cadeia A, em azul, cadeia B (tons diferentes delimitam cada domínio da cadeia B), em cinza, glicosilações da cadeia B (em **B** e **C** são apresentadas em modo “*wireframe*”) e ligações dissulfeto estão em laranja. Resíduos envolvidos nos sítios catalítico (ACT), de ligação a carboidratos (SU1 e 2) e de glicosilação (GL1 e 2) estão destacados em verde. Em **A** e **B** as representações estão na mesma posição. As Imagens foram geradas com o “*script*” JMol no site da *Jena Library of Biological Macromolecules* a partir do código do PDB 1ABR (http://www.fli-leibniz.de/cgi-bin/3d_mapping.pl?CODE=1abr).

1.5 - Utilização terapêutica de RIPs

Os primeiros relatos das propriedades anticancerígenas da ricina e abrina datam de antes mesmo de se conhecer seu mecanismo de ação. Mosinger (1951) demonstra o efeito da ricina sobre sarcomas em ratos [40], e Reddy e Sirsi (1969) descobriram que o extrato protéico de *Abrus precatorius* inibia o crescimento de sarcomas de Yoshida [41]. Tumores artificialmente criados pela injeção intraperitoneal de “*Ehrlich ascites*” em ratos puderam ser eliminados pela administração de ricina e abrina até cinco dias após sua detecção [8, 9]. Os resultados foram suficientemente promissores ao ponto de se iniciar estudos clínicos fase I, nos quais alguns efeitos colaterais (dor muscular, febre, náusea e sintomas semelhantes a uma gripe) não detectados em estudos com animais puderam ser observados em alguns pacientes, interrompendo os testes clínicos [42].

Assim que o mecanismo de ação das cadeias isoladas foi compreendido, a simples idéia de que a cadeia lectínica pudesse ser substituída por outro componente de ação mais direcionada, tal como anticorpos ou anticorpos direcionados contra antígenos associados com células cancerígenas foi obviamente levantada [43-47]. Ligação da cadeia tóxica com outros tipos de moléculas como hormônios e fatores de crescimento também têm sido usados a fim de dirigir a toxina para células de interesse. Conjugados com a desejada especificidade quando testados “*in vivo*” foram realmente obtidos em muitos casos, entretanto, imunotoxinas baseadas na cadeia A se mostraram muito menos ativas que a holotoxina, demonstrando apenas uma desapontante baixa eficiência antitumoral. [48, 49]. O mais provável é que alguma propriedade funcional seja perdida com a eliminação da cadeia B [50].

1.6 - RIPs do tipo 2 e sua ampla variância em toxicidade

Todas as RIPs do tipo 2 foram supostamente consideradas tóxicas, muito embora uma aglutinina de *Ricinus* (RCA120) fosse conhecida de longa data, sendo um tetrâmero consistindo de duas cadeias A e duas cadeias B que individualmente possuem as mesmas propriedades das cadeias das demais RIPs, entretanto sendo muito menos tóxicas [23]. Recentemente, outras lectinas foram encontradas em *Cinnamomum*, *Eranthis*, *Iris*, *Momordica*, *Polygonatum* e *Sambucus* [51], todas sendo RIPs do tipo 2, com estruturas semelhantes, e possuindo as mesmas propriedades enzimáticas e lectínicas compartilhadas entre ricina, abrina e toxinas relacionadas. Entretanto, as supracitadas quando comparadas com outras RIPs do tipo 2, possuem uma toxicidade até 1000 vezes menor, sendo similar à toxicidade das RIPs do tipo 1 [52]. As razões para diferentes graus de toxicidade exibidas pelas RIPs do tipo 2 consideradas tóxicas e atóxicas, bem como as diferenças nas potências tóxicas exibidas dentre as RIPs do tipo 2 tóxicas são obscuras [51, 53]. Entretanto, estas diferenças não podem ser explicadas pela diversidade estrutural e catalítica das cadeias A, as quais eficientemente inibem a síntese protéica “*in vitro*”. Por outro lado, estas variações poderiam ser atribuídas a diferenças entre suas cadeias B, as quais intermedeiam a interação com células, em particular os processos de ligação à membrana celular, endocitose, tráfego intracelular, taxa de degradação e exocitose das toxinas pela célula [54] (Figura 1.4).

1.7 - O mecanismo de endocitose das RIPs do tipo 2

Os modos de entrada e direcionamento intracelular da ricina têm sido extensivamente estudados. Esta RIP liga-se a resíduos terminais de Galactose ou *N*-

acetilgalactosamina de glicanos, expostos por glicoproteínas e/ou glicolipídios de membrana [13]. Após sua ligação aos glicoreceptores de membrana, a ricina é internalizada por duas vias distintas operando uma mesma célula, uma via de endocitose dependente de clatrina e outra clatrina independente [55]. Além destes mecanismos, uma forma alternativa de endocitose foi descrita, a qual envolve o reconhecimento de carboidratos presentes nos sítios de glicosilação da toxina por parte dos receptores de manose presentes em macrófagos e células sinusoidais de fígado de rato [56-58]. Independente da via de acesso explorada pela proteína, esta acaba dentro de endossomos, os quais podem voltar a se fundir com a membrana, reciclando a toxina para o meio extracelular [59, 60], ou seguir sua via de entrada. Endossomos contendo a proteína são na sua maioria direcionados para lisossomos, onde a toxina é degradada, enquanto apenas uma pequena parte (somente 5-10% no caso da ricina) atinge a rede *trans*-Golgi [61]. Pequenas variações na eficiência do transporte de endossomos para o complexo de Golgi são dependentes da toxina, tipo celular ou mesmo das condições de cultivo celular [62]. Não se conhece ao certo qual o receptor de superfície celular responsável por dirigir a ricina para a rede *trans*-Golgi. A ricina se liga a uma mistura de glicoproteínas [63] e glicolipídios [64], e não se sabe qual ou quais destes ligantes representa o receptor funcional. Uma vez no lúmen do complexo de Golgi, a toxina sofre um transporte retrógrado para o retículo endoplasmático. Outras toxinas protéicas que também trafegam do Golgi para o retículo endoplasmático, como a toxina da cólera, possuem em sua extremidade C-terminal uma seqüência KDEL a qual é responsável pela translocação do Golgi para o retículo endoplasmático. De outra forma, RIPs que são desprovidas de tal seqüência poderiam explorar o mesmo mecanismo, possivelmente ligando-se a proteínas endógenas que possuam uma seqüência KDEL. Neste contexto, um bom candidato a preencher esta lacuna seria a calreticulina, uma

glicoproteína que transita entre o complexo de Golgi e o retículo endoplasmático. A calreticulina possui resíduos de galactose disponíveis, aos quais a cadeia B poderia se ligar, e há indícios de que a ricina possa ser co-transportada com a calreticulina para o retículo endoplasmático [65]. Há evidências que corroboram esta hipótese, no sentido de demonstrarem que a capacidade de ligação à galactose não é somente necessária para a ligação a glicoreceptores de membrana, mas também é um pré-requisito para sua ação tóxica, ligando-se a algum receptor intracelular. Ricina modificada para possuir manose-6-fosfato (endocitada pelos receptores de manose-6-fosfato) perde sua toxicidade ao se inativar os sítios de ligação à galactose [66]. Além disto, a cadeia A da ricina que é normalmente desprovida de ação citotóxica, quando modificada de forma a conter uma seqüência KDEL em sua porção C-terminal, torna-se tóxica [67-69]. Trabalhos recentes relatam que ambos os transportes de toxinas em endossomos para o complexo de Golgi e do Golgi para o retículo endoplasmático podem envolver diversas rotas [62, 70]. Para que a cadeia catalítica possa agir, ela deve liberar-se de um bloqueio estérico que compromete o sítio ativo [71, 72]. Dentro do retículo endoplasmático, a holotoxina é então possivelmente submetida a uma redução catalisada pela proteína dissulfeto-isomerase [75] que rompe a ligação dissulfeto intercadeias, separando as duas subunidades (cadeia A e cadeia B). A cadeia A é então translocada do retículo endoplasmático para o citosol (Figura 1.4) explorando a rota de degradação de proteínas mal-enoveladas do retículo endoplasmático, “*Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation*” - ERAD. [69, 74-76]. De acordo com o modelo aceito atualmente, a via ERAD pode ser dividida em quatro estágios: 1- Reconhecimento de substrato (proteína mal enovelada) e acionamento da maquinaria de retro-translocação; 2- Transporte através da membrana do retículo endoplasmático; 3- Liberação do substrato complexado na membrana; 4- degradação do substrato no citosol [77].

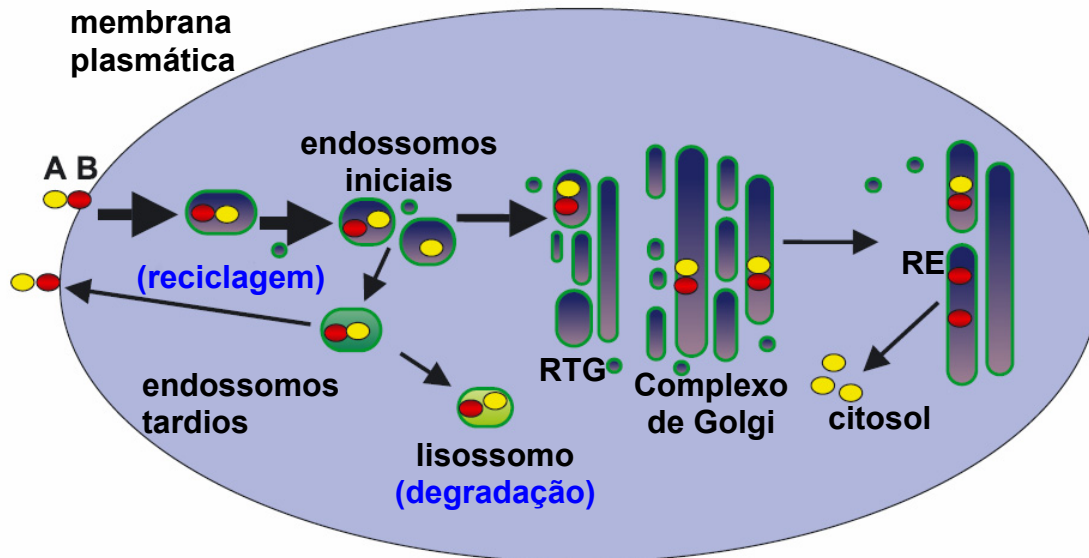


Figura 1.4. - Representação esquemática do tráfego intracelular proposto para a endocitose da ricina modificada a partir de Hartley e Lord (2004). A e B denotam as cadeias A (em amarelo) e B (em vermelho) da holotoxina, RTG a rede do trans-Golgi e RE o retículo endoplasmático.

1.8 - Pulchellina, uma RIP do tipo 2 das sementes de *Abrus pulchellus*

Abrus pulchellus tenuiflorus (Leguminosae, Papilionoideae) é uma espécie vegetal de hábito subarbuscivo nativa do Brasil, encontrada nos estados do Ceará (região Nordeste) e Pará (região Norte) (Figura 1.5). Colaboradores [78] relataram a presença de toxinas RIPs do tipo 2 nos extratos das sementes desta espécie.



Figura 1.5 - Detalhe de um fruto de *A. pulchellus* onde se encontram suas sementes.

A toxina de *A. pulchellus* (chamada então de pulchellina) mostrou-se ser altamente tóxica, matando microcrustáceos e camundongos a baixas dosagens. Da mesma forma que outras RIPs isoladas de sementes, pulchellina ocorre naturalmente como uma mistura de isoformas. Sementes de *A. pulchellus* contêm isoformas de lectinas que podem ser separadas na forma de extratos que já foram isolados e preliminarmente caracterizados quanto a suas propriedades químicas e biológicas. Diferentes isoformas da pulchellina demonstram uma grande variabilidade de graus de toxicidade ao serem isoladamente ministradas intraperitonealmente em camundongos. Nos dois extremos, um isolado demonstrou-se desprovido de atividade tóxica enquanto que outro exibiu toxicidade $D. L. 50 = 25\text{ng/g}$ de animal, comparável à toxicidade da abrina [79, 80].

1.9 - A cadeia B da pulchellina: clonagem e produção recombinante

Assim como outras RIPs do tipo 2, a pulchellina nativa possui atividade hemaglutinante sendo esta desempenhada pela cadeia B desta toxina ligante de D-Galactose e glicoconjugados que possuem D-Gal em sua estrutura [81].

A pulchellina teve seu gene parcialmente amplificado com o uso de oligonucleotídeos degenerados de construção baseada nas identidades entre os genes para ricina e abrina, proteínas relacionadas de famílias vegetais relativamente distantes. Os produtos de amplificação genômica foram clonados [82] e com base no seqüenciamento destes, identidades com regiões conservadas em abrina e ricina e informações sobre a estrutura primária da porção *N*-terminal da cadeia B da pulchellina nativa, novos conjuntos de oligonucleotídeos foram desenhados. Estes

oligonucleotídeos foram usados para permitir a amplificação do fragmento gênico codificante da cadeia B completa da pulchellina.

A escolha de uma das isoformas da cadeia B da pulchellina a ser amplificada foi feita com base na seqüência *N*-terminal previamente descrita para a pulchellina [79], conjuntamente com seqüências parciais de clones previamente obtidos utilizando-se oligonucleotídeos degenerados [82]. Para o desenho do oligonucleotídeo reverso, foi utilizada a informação dos clones previamente obtidos, que demonstraram identidade com a região 3' do gene codificante para a abrina.

Visando obter a cadeia B da pulchellina para futuros estudos e aplicações, este produto de amplificação a partir do DNA genômico de folhas da planta foi clonado em um vetor de expressão bacteriano para a produção recombinante da cadeia B da pulchellina. O seqüenciamento do produto de PCR clonado revelou alta identidade às seqüências de isoformas da abrina (81% de identidade com abrina-A) quando submetida à busca no banco de dados GenBank do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) através do BLAST [83]. A seqüência da cadeia B da pulchellina foi depositada no GenBank, número de acesso AY093704 (Figura 1.6).

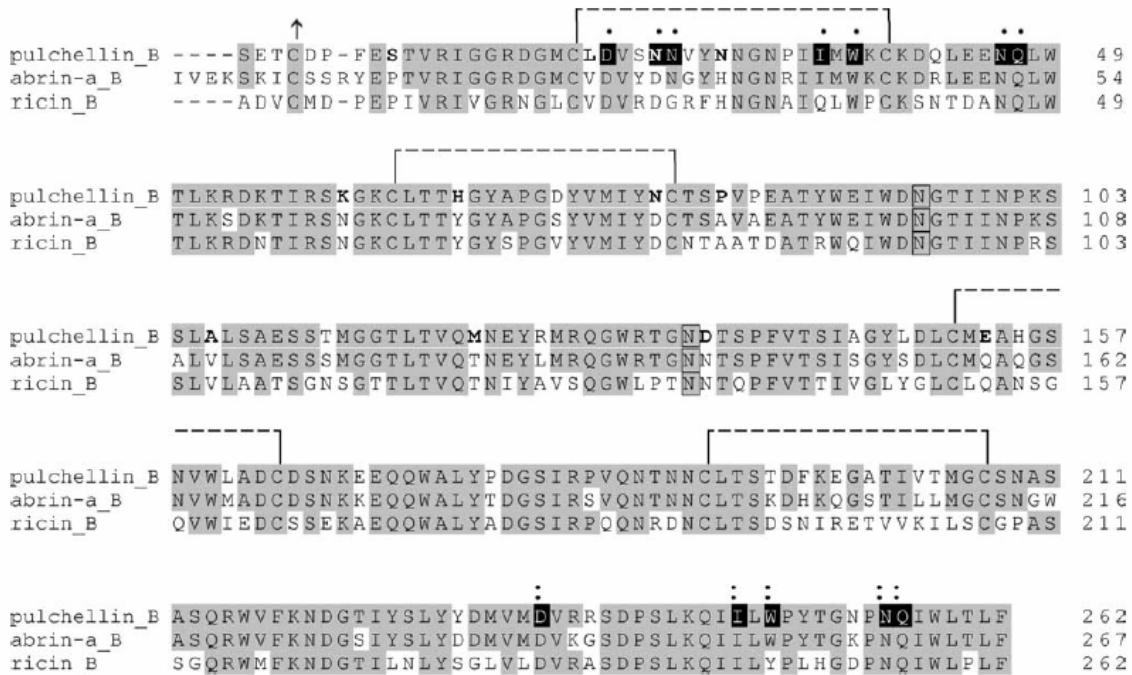


Figura 1.6 – Alinhamento da seqüência primária deduzida para a cadeia B da pulchellina recombinante com cadeias B da abrina-A (81% de identidade) e ricina (51% de identidade). Resíduos conservados em fundo cinza, resíduos não conservados em negrito. Ligações dissulfeto intra-cadeia representadas por linhas descontínuas. Dois sítios de glicosilação são deduzidos (resíduos dentro de quadros). Resíduos que participam dos sítios de ligação a carboidratos estão em fundo negro, sendo identificados por • para o primeiro sítio e •• para o segundo. O primeiro resíduo de cisteína na região N-terminal, identificado por ↑, está envolvido na ligação dissulfeto inter-cadeia com o resíduo de cisteína na região C-terminal da cadeia A. Fonte: Goto *et al* (2003).

A cadeia B da pulchellina recombinante foi produzida como corpos de inclusão em *E. coli*, insolúveis e desprovidos de atividade. Um protocolo de desnaturação e reenovelamento dos corpos de inclusão foi desenvolvido com sucesso, tendo como resultado a obtenção da cadeia B da pulchellina recombinante (rPBC) biologicamente ativa [84].

Tendo disponível um sistema para a obtenção desta molécula, estudos definindo suas propriedades tornam-se imprescindíveis, tendo em vista possíveis aplicações práticas como molécula carreadora de outras substâncias para o interior de células alvo, por exemplo. Neste capítulo, algumas das propriedades da rPBC são analisadas salientando-se a interação da proteína com células animais. Embora a pulchellina seja original de uma leguminosa, esta é classificada como uma RIP do tipo 2 e não como

uma lectina de leguminosa, como a camptosemina, que será assunto do segundo capítulo deste trabalho.

Objetivos

2 - Objetivos

2.1 - Objetivos gerais

O presente trabalho teve como objetivo geral estudar a atividade e propriedades estruturais da cadeia B recombinante da pulchellina (rPBC).

2.2 - Objetivos específicos

Os seguintes objetivos específicos foram delineados:

- **Aumentar e otimizar o rendimento da produção da proteína recombinante;**
- **Estudar a estabilidade estrutural da rPBC através de técnicas espectroscópicas;**
- **Estudar a interação da rPBC com diferentes células de mamífero;**
- **Investigar a capacidade de endocitose e o tráfego intracelular da rPBC em células de mamífero;**
- **Avaliar a atividade “*in vivo*” da rPBC.**

Materiais e Métodos

3 - Materiais e Métodos

3.1 - Renovelamento e Purificação da rPBC

A produção da rPBC foi realizada como previamente descrito [84]. Resumidamente, células de *E. coli* BL21(DE3) previamente transformadas com o plasmídeo pPBC foram inoculadas em 500 ml de meio LB adicionado de canamicina e incubadas a 37° C sob agitação orbital de 250 RPM até que a cultura atingisse D.O. $_{600\text{ nm}} \approx 0,5$. Em seguida foi adicionado à cultura 0,4 mM de IPTG. A cultura foi mantida por 4h a 37° C, 250 RPM e a seguir suas células coletadas por centrifugação a 10000 g. As células coletadas foram ressuspensas em PBS para a posterior recuperação de corpos de inclusão.

Um protocolo de renovelamento da rPBC foi previamente determinado [84] e utilizado para a obtenção de rPBC utilizada nos experimentos subsequentes. Entretanto, com o aumento de escala necessário para a realização dos experimentos, novos problemas foram levantados e com isto, pequenas mudanças foram adotadas levando a um conjunto de melhorias determinadas para o protocolo anterior, as quais serão apresentadas a seguir.

3.1.1 - Purificação dos corpos de inclusão

As células recuperadas por centrifugação foram ressuspensas em 100 ml de PBS e sonicadas por 8 pulsos de 30 segundos intercalados por 1 min. de repouso sob banho de gelo para lise das células. Em seguida o lisado foi centrifugado 20000 g por 10 min. e sua fração solúvel descartada. O particulado insolúvel foi então ressuspenso com o auxílio de uma pipeta Pasteur e um bastão de vidro até a obtenção de uma suspensão

homogênea em 50 ml de PBS contendo 1% Triton X-100. Esta suspensão foi então sonicada por 5 pulsos de 30 segundos intercalados por repouso por 1 min. sob banho de gelo, novamente centrifugada a 20000 g, 10 min. e a fração solúvel novamente descartada. O ciclo de ressuspensão, sonicação, centrifugação e descarte do sobrenadante foi realizado até que o particulado insolúvel passasse de uma massa viscosa amarelada para uma consistência arenosa e branca. Ao se atingir este estado, o particulado insolúvel foi ressuspensão em 50 ml de tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,5 e sedimentado por centrifugação 20000 g 10 minutos. A fração solúvel foi novamente descartada e o processo repetido por 3 vezes para a eliminação do Triton X-100. O precipitado obtido contendo os corpos de inclusão foi então ressuspensão em 50 ml de tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,5. A suspensão foi congelada, descongelada e novamente centrifugada, descartando-se a fração solúvel contendo contaminantes que, antes do congelamento, decantavam junto com a rPBC e que então se solubilizaram. Por fim o precipitado resultante contendo corpos de inclusão ricos em rPBC foi armazenado a -20° C para utilização posterior.

3.1.2 - Desnaturação dos corpos de inclusão

Os corpos de inclusão purificados contendo a rPBC foram desnaturados em 50 ml de tampão de desnaturação Tris-HCl 50 mM pH 8,5, contendo 8M de uréia. Outros contaminantes ainda presentes nos corpos de inclusão desnaturados puderam ser removidos como sedimentos insolúveis após centrifugação 20000 g, por 10 minutos. A concentração inicial da rPBC foi monitorada por absorvância a 280 nm de forma que sua concentração não excedesse $D.O._{280\text{ nm}} = 0,8$, ou seja, cerca de 0,3 mg/ml de rPBC.

As etapas posteriores do processo de reenovelamento foram mantidas como descrito anteriormente [84] até a etapa de purificação por cromatografia de exclusão molecular.

3.1.3 - Purificação da rPBC reenovelada

Todo o volume resultante do reenovelamento (cerca de 200 ml de proteína reenovelada em uma solução a não mais que 0,08 mg/ml) foi submetido a uma ultrafiltração em um Centriprep 50. O filtrado foi coletado até que a proteína monomérica não pudesse mais ser detectada sob SDS-PAGE no volume retido pelo Centriprep. Após este procedimento, a proteína monomérica foi concentrada em um Centriprep 10 e submetida à cromatografia de exclusão molecular em uma coluna Superdex 75 HiLoad 16/60 (GE Healthcare Life Sciences) pré-equilibrada em 10 mM de Tris-HCl pH 8,5. A cromatografia de exclusão molecular foi realizada injetando-se 5 ml da proteína reenovelada por corrida e mantida sob fluxo 1 ml/min. de Tris-HCl 10 mM pH 8,5. O fluxo foi mantido por uma bomba peristáltica e o eluato coletado em frações de 2,5 ml. A cromatografia foi registrada por absorvância do eluato a 280 nm. As frações contendo rPBC pura e monomérica foram reunidas e reservadas a -20° C até o final da etapa de purificação. Finalmente, as frações reservadas foram concentradas por ultrafiltração em um aparelho Amicon equipado com uma membrana de corte de exclusão em 10 kDa, até que a solução retida no aparelho tivesse uma D.O. $_{280\text{nm}} = 0,24$ (cerca de 0,1 mg de rPBC/ml). Esta solução foi então armazenada a -20° C para ser utilizada nos experimentos. Antes da realização de todos os experimentos, o lote de rPBC a ser utilizado foi testado quanto a sua capacidade hemaglutinante e perfil espectroscópico por dicroísmo circular.

3.2 - Influência de diferentes relações de par redox no rendimento do reenovelamento

Corpos de inclusão recuperados como anteriormente descrito foram solubilizados em 50 ml Tris-HCl 50 mM pH 8,5 contendo 8M de uréia e diluídos com o mesmo volume em Tris-HCl 50 mM pH 8,5. Esta solução foi então dividida em 3 frações de 30 ml e a cada fração, adicionou-se o mesmo volume de tampão de oxidação contendo cisteína:cistina somando 6 mM sob 3 relações molares diferentes, 6:0, 1:1, 0:6. O procedimento restante do reenovelamento foi executado sobre os três sistemas isoladamente, tendo como única diferença as relações molares de cisteína:cistina que foram mantidas nas etapas iniciais de diálise. Amostras de cada uma das condições de reenovelamento foram centrifugadas 15000 g por 10 min. e os sobrenadantes submetidos à análise por SDS-PAGE ao final do processo de reenovelamento protéico.

3.3 - Expressão da rPBC no espaço periplasmático fusionada com “*Celulose-Binding Domain*”

3.3.1 - Subclonagem no vetor pET37b+

A construção da fusão rPBC com *Celulose-Binding Domain* (CBD) foi realizada através da excisão do fragmento codificante da rPBC do vetor de expressão pPBC pela dupla restrição com *Nco* I e *Not* I, seguida da subclonagem deste fragmento no vetor pET37b+ (Novagen). Para tanto, cerca de 2 µg dos vetores pPBC e pET37b+ foram submetidos à dupla restrição com as enzimas *Nco* I e *Not* I, conforme resumido na tabela a seguir:

Mistura de digestão - pPBC	Quantidade final
pPBC	2 µg
Tampão D* [10X]	[1X]
Endonuclease <i>Not</i> I*	10U
Endonuclease <i>Nco</i> I*	10U
Volume final da reação	25µl

Mistura de digestão - pET37b+	Quantidade final
pET37b+	2,5 µg
Tampão D* [10X]	[1X]
Água Milli-Q	1µl
Endonuclease <i>Not</i> I*	10U
Endonuclease <i>Nco</i> I*	10U
Volume final da reação	20µl

* Endonucleases *Nco* I, *Not* I e Tampão D da Promega.

Tabela 3.1 - Misturas de restrição dos vetores pPBC e pET37b+.

As digestões foram incubadas a 37° C por 24 horas. Em seguida, os volumes totais das reações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8%, TAE. A purificação do DNA a partir do gel (bandas equivalentes ao inserto do pPBC e o vetor pET37b+ linearizado) foi feita através do kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega). O DNA purificado foi estimado em gel para ser realizada uma reação de ligação numa razão molar inserto/vetor de 3:1 conforme a tabela:

Mistura de ligação PBC / pET37b+	Quantidade final
pET37b+	~100ng
Inserto do pPBC	~50ng
Tampão T4 DNA ligase * [10X]	[1X]
T4 DNA ligase*	1U
Água Milli-Q	3µl
Volume final da reação	20µl

* T4 DNA ligase e Tampão *T4 DNA ligase* da Promega.

Tabela 3.2 - Mistura de ligação para subclonagem do fragmento codificante para rPBC no vetor pET37b+.

Todo o volume de reação de ligação foi utilizado em uma transformação de células de *E. coli* DH5α, competentes por tratamento com CaCl₂ [85]. A seleção dos transformantes foi realizada por plaqueamento em ágar-LB adicionado de canamicina.

O DNA plasmidial dos transformantes foi extraído utilizando-se o kit *Wizard Plus Minipreps DNA Purification Systems* (Promega) e a confirmação dos clones foi feita por análise da restrição do DNA plasmidial com as endonucleases *Nco* I e *Not* I. O novo vetor foi denominado pET37PBC.

3.3.2 - Expressão da proteína de fusão na linhagem ER2566

Cerca de 100 ng do pET37PBC foram utilizados numa transformação de células de *E. coli* ER2566 competentes por CaCl_2 [85]. A seleção dos transformantes foi realizada através do plaqueamento em meio ágar-LB adicionado de 25 $\mu\text{g/ml}$ de canamicina. Uma colônia transformante foi inoculada em 200 ml de meio LB contendo o antibiótico de seleção e incubada a 37° C até atingir uma D.O. $_{600\text{nm}} = 0,4$. A cultura foi então dividida em dois frascos e adicionou-se IPTG a 0,1 mM e 0,4 mM. A seguir, as culturas foram incubadas “overnight” a 20° C sob agitação orbital de 250 RPM. Ao final de 16 horas de indução, as células foram coletadas por centrifugação a 10000 g, por 15 min. e ressuspensas em 10 ml de tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,5 gelado. As suspensões bacterianas foram lisadas com ultra-som, 5 pulsos de 30 segundos intercalados por 1 min. de repouso sob banho de gelo. As frações solúveis foram separadas dos precipitados por centrifugação 20000 g, por 20 min. a 4° C. Amostras das culturas antes da indução, após a indução, sobrenadantes e precipitados dos lisados celulares foram submetidas à análise em SDS-PAGE [86].

3.3.3 - Purificação da fusão CBD-rPBC

A fração solúvel resultante da expressão induzida com 0,4 mM de IPTG foi aplicada sob fluxo gravitacional sobre uma coluna de afinidade C-BinD 200 (Novagen) de 1 ml, pré-equilibrada com tampão 20 mM de Tris-HCl pH 7,5. O eluato foi reaplicado por 5 vezes e em seguida a coluna foi lavada com 20 ml de tampão 20 mM de Tris-HCl pH 7,5 contendo 800 mM de NaCl. A proteína de fusão foi eluída com etilenoglicol 100% sob fluxo auxiliado por uma seringa. Amostras foram reservadas para análise em SDS-PAGE [86].

3.3.4 - Clivagem da proteína de fusão

A fração do primeiro volume de eluição contendo a fusão CBD-rPBC foi dialisada contra tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 100 mM NaCl 1 mM CaCl₂ e dividida em duas frações. Em seguida, cada fração foi adicionada de protease fator Xa (GE Healthcare Life Sciences) a 2 e 10 unidades/mg de proteína de fusão. As frações foram incubadas por 24h à temperatura ambiente e amostras foram retiradas e congeladas para análise em SDS-PAGE.

3.4 - Medidas Espectroscópicas

As medidas de CD foram realizadas em um espectropolarímetro J-715 (JASCO). Medidas de fluorescência estática foram realizadas em um fluorímetro ISS-K2.

3.4.1 - Validação do procedimento de renovelamento

Soluções de rPBC reenovelada purificada a cerca de 0,1 mg/ml em Tris-HCl 10 mM pH 8,5 foram medidas em cubetas de quartzo, de 0,1 cm de caminho óptico. Os espectros foram registrados no intervalo de comprimento de onda 190-250 nm, como uma média de 16 varreduras. Todas as preparações da rPBC reenovelada utilizadas em outros experimentos deste trabalho foram avaliadas por CD e atividade hemaglutinante sobre uma suspensão de hemácias do tipo O⁺ em PBS.

3.4.2 - Estabilidade da rPBC em função do aumento de temperatura

Experimentos de desnaturação térmica da rPBC foram monitorados por CD no intervalo de 10° C a 100° C, sob divisões de 5° C. A proteína a cerca de 0,1 mg/ml em Tris-HCl 10 mM pH 8,5 foi incubada por dois minutos em cada temperatura sob o controle do programa de aquisição de dados do espectropolarímetro. Medidas foram feitas na presença e na ausência de D-Gal na solução protéica em cubetas de quartzo, de 0,1 cm de caminho óptico. Os espectros foram registrados no intervalo de comprimento de onda de 200-250nm, como uma média de 16 varreduras. O processo reverso também foi realizado, entretanto a desnaturação térmica foi irreversível pela rampa de resfriamento reversa. Os espectros obtidos foram analisados com o pacote de programas CDPro [87, 88] para a avaliação de seu conteúdo de estruturas secundárias (CONTINLL, SELCON e CDSSTR) [89] em sua versão mais recente utilizando-se do banco de dados de 56 proteínas distribuído com o pacote [90, 91].

3.4.3 - Estabilidade da rPBC em função do pH

Amostras da rPBC a cerca de 0,1 mg/ml foram incubadas por 2 horas em tampão 20 mM de acetato-borato-fosfato ajustado para diferentes pHs de 2-12 sob banho de gelo. Após a incubação, as soluções protéicas foram centrifugadas 10000 g, por 5 min. e o sobrenadante reservado para medidas de CD. Medidas foram feitas utilizando-se cubetas de quartzo, de 0,1 cm de caminho óptico. Os espectros foram registrados no intervalo de comprimento de onda de 190-250 nm, como uma média de 16 varreduras. Os espectros obtidos foram analisados com o pacote de programas CDPro quanto a sua predição de conteúdos em estrutura secundária (CONTINLL, SELCON e CDSSTR) [87, 88, 89] e terciária (CLUSTER) [92] utilizando-se do maior banco de dados (56 proteínas) distribuído com o pacote [90, 91].

Medidas de fluorescência estática foram realizadas na mesma faixa de valores de pH. Amostras da proteína a 0,04 mg/ml em tampão 20 mM de acetato-borato-fosfato ajustado para diferentes pHs de 2-12 foram incubadas por 2 horas e excitadas a 295 nm. Espectros de emissão foram obtidos na faixa de 310-450 nm. As medidas foram feitas a temperatura ambiente usando cubetas de 1 cm de caminho óptico em um fluorímetro ISS-K2.

3.5 - Atividade da rPBC em células de mamífero

As linhagens de células de mamífero utilizadas foram provenientes da *American Type Culture Collection* (ATCC - www.atcc.org), brevemente descritas na tabela a seguir:

Linhagem	Organismo de origem	Tecido de origem	Patologia	Morfologia	Nº. ATCC
K-562	<i>Homo sapiens</i>	Medula óssea	Leucemia mielóide crônica	Suspensão de linfoblastos	CCL-243
HeLa	<i>Homo sapiens</i>	Colo do útero	adenocarcinoma	Epitélio aderido	CCL-2
TK	<i>Mus musculus</i>	Conjuntivo subcutâneo	-	Fibroblasto aderido	CCL-1.3
MDA-MB-231	<i>Homo sapiens</i>	Glândula mamária	adenocarcinoma	Epitélio aderido	HTB-26

Tabela 3.3 - Descrição das linhagens de células de mamífero utilizadas no trabalho.

Além destas, a linhagem derivada da K-562 transfectada para a produção de integrinas $\alpha_2\beta_1$ foi fornecida por Dr. M. E. Hemler (Dana Farber, Boston, MA - clone AK-2, Pharmigen, USA).

3.5.1 - Cultivo das células

Células foram cultivadas em meio *Dubelco Modified Eagle Medium* (DMEM - Cultilab) enriquecido com FBS 10% (*Fetal Bovine Serum* - Cultilab) e adicionado de penicilina a 100 unidades/ml e estreptomicina 100 μ g/ml (Gibco - Invitrogen). O cultivo foi realizado em garrafas de 75 cm² em estufa a 37° C sob atmosfera de 5% de CO₂ até atingirem confluência. Meio de cultura foi trocado a cada 2-3 dias por meio novo de mesma composição. A cada manutenção das culturas, as células foram recuperadas por centrifugação 1000 g, por 5 min. e re-inoculadas em meio novo. Células de morfologia aderida foram “descoladas” por incubação por 5 min. em uma solução estéril a 0,25% de tripsina em PBS pH 7,4 EDTA 0,5 mM.

3.5.2 - Marcação com Cloro-Metil Fluorosceína Diacetato (CMFDA)

Após a confluência, as células foram coletadas por centrifugação 1000 g a temperatura ambiente e lavadas com PBS. 10 μ l da suspensão de células foram então adicionados de 10 μ l de *Trypan Blue* (Invitrogen) e utilizados na estimativa de células viáveis por contagem em câmara de Newbauer. O volume da suspensão celular foi então corrigido para 5×10^6 células viáveis/ml. Para cada 5 ml desta suspensão foram adicionados 6 μ l de CMTDA (Invitrogen) para uma concentração final de 12,5 μ M. A marcação foi incubada a 37° C por 30 minutos. Após a marcação, as células foram lavadas com tampão HEPES (HEPES 20 mM pH 7,35, NaCl 150 mM, KCl 5 mM, MnCl₂ 1 mM, MgSO₄ 1 mM) e ressuspensas a 1×10^6 células/ml em tampão HEPES.

3.5.3 - “Coating”

Diluições seriadas da proteína em tampão HEPES foram realizadas em triplicata sobre microplacas de 96 poços. Como controles positivos foram utilizados 1 μ g de colágeno I ou fibronectina, de acordo com a linhagem utilizada, em tampão HEPES. Para os controles negativos foram utilizados 100 μ l de BSA 1% em tampão HEPES. As placas foram incubadas “overnight” a 4° C. Após o “coating” o conteúdo dos poços foi descartado e os poços bloqueados com 200 μ l da solução de BSA 1%. O bloqueio foi mantido por 2 horas a temperatura ambiente.

3.5.4 - Ensaio de promoção de adesão

Após o bloqueio, os poços foram lavados com tampão HEPES para a retirada de proteínas não ligadas. 100 µl da suspensão de células marcadas foram então dispensados sobre os poços. As placas foram então incubadas por 30 min., a 37° C, sob banho térmico. Após a incubação, o conteúdo dos poços foi descartado e os poços lavados com tampão HEPES para a retirada de células marcadas não aderidas. Foram adicionados 100 µl de Triton X-100 0,5% em água Milli-Q, para a lise das células marcadas. Após 20 min. de lise, a fluorescência de emissão a 538 nm (filtro a 530 nm) foi estimada em um leitor de placa sob excitação em 485 nm. A média dos valores de fluorescência de cada triplicata foi plotada em função da concentração da proteína. Os valores foram normalizados em função de porcentagem de adesão dos controles positivos.

3.5.6 - Ensaio de inibição de interação de célula linhagem K-562 $\alpha_2\beta_1$ com o colágeno I

Para a inibição da adesão de células K-562 $\alpha_2\beta_1$ promovida pelo colágeno, uma diluição seriada da proteína (concentrações de 2,30 µM, 1,15 µM, e 0,58 µM de rPBC) foi adicionada a 50 µl de uma suspensão a 1×10^6 células marcadas/ml em tampão HEPES e incubada a 37° C por 30 minutos. Os poços da microplaca foram previamente preenchidos com 100 µl de uma solução contendo 1 µg de colágeno I em tampão HEPES e incubados overnight a 4° C. Posteriormente os poços foram bloqueados com BSA 1% em HEPES por 30 min. a temperatura ambiente. Após o bloqueio os poços foram lavados com tampão HEPES por 3 vezes e adicionados das suspensões celulares. A placa foi incubada a 37° C por 30 min., lavada com Tampão HEPES e adicionada de

100 μ l de Triton X-100 0,5% para a lise das células. Após 20 min. de incubação a fluorescência dos poços foi analisada.

3.5.7 - Inibição da adesão por competição com açúcares

Amostras de proteína sem açúcar e com 100 mM de D-Gal ou 100 mM de Lactose foram adicionadas aos poços da placa nas concentrações de 5 a 0,31 μ g/poço. O “*coating*” foi mantido “*overnight*” a 4° C. Após a incubação, os poços foram lavados e BSA 1% foi adicionada para o bloqueio. O bloqueio foi mantido por 2 h a temperatura ambiente. Em seguida, a BSA foi descartada e as células previamente marcadas com CMFDA (1×10^5 células/poço) foram adicionadas e mantidas a 37° C por 30 minutos. Em seguida, os poços foram lavados 3X com tampão HEPES e as células que permaneceram aderidas foram lisadas com Triton X-100 0,5%. A fluorescência do CMFDA incorporado foi analisada.

Todos os experimentos envolvendo adesão celular acima descritos foram realizados em triplicatas e representados por suas médias. Os valores arbitrários de fluorescência obtidos foram confirmados possuírem relevância experimental ao exame estatístico de análise de variância simples (ANOVA), nível de significância 0,05. Os resultados foram normalizados e representados como porcentagens dos valores dos seus respectivos controles positivos.

Os ensaios envolvendo adesão de células de mamífero presentes neste trabalho foram realizados com a colaboração da Dr^a. Márcia Regina Cominetti sob supervisão da Prof^a. Dr^a. Heloísa Sobreiro Selistre-Araújo do Laboratório de Bioquímica do Depto. de Fisiologia da UFSCar.

3.5.8 - Marcação e visualização “*in situ*” da interação da rPBC com células K-562

Uma vez observada a promoção de adesão desencadeada pela rPBC às células da linhagem K-562, foi realizada a marcação da proteína para observação “*in situ*” desta interação através de microscopia de fluorescência. Para tanto, 100 µg da proteína foram marcados com Alexa Fluor 488, segundo as instruções do fabricante para o kit de marcação (Molecular Probes - Invitrogen) para se obter uma “alta dose” de marcação. Após o procedimento de marcação, a rPBC ainda mantinha sua capacidade de aglutinar eritrócitos O⁺ e a adição de D-Gal inibia esta atividade. Assim, 20 µg da proteína marcada em 200 µl de tampão PBS foram adicionados a 900 µl de uma suspensão de células linhagem K-562 a 1×10^5 células/ml em PBS. Como controle negativo, 20 µg da proteína marcada foram aquecidos a 100° C por 30 minutos. Após 15 min. de incubação da proteína com as células à temperatura ambiente, amostras de 50 µl foram retiradas e dispensadas sobre lâminas de microscopia óptica. A fixação das células se deu pela adição de 10 µl de formaldeído seguida de incubação por 30 min. a temperatura ambiente. Em seguida as lâminas foram exaustivamente lavadas com PBS para a remoção de moléculas de proteína não ligada, cobertas com lamínulas e levadas para observação. Para verificar a inibição da interação por competição dos sítios de ligação a carboidratos, experimentos com a adição de D-Galactose a 100 mM tanto à solução protéica quanto à suspensão celular e outro em que D-Gal foi adicionada somente à solução protéica, foram conduzidos. A visualização foi realizada em um microscópio de fluorescência Nikon eclipse E400 sob 500 nm de comprimento de onda e por transmitância convencional. A proteína marcada pôde ser observada tanto na superfície celular quanto em pequenos grânulos no interior das células. Como um parâmetro

comparativo, observações sobre a interação com K-562 utilizando a holoproteína nativa foram também realizados.

3.5.9 - Marcação e visualização “*in situ*” da interação da rPBC com células HeLa

Para o exame de microscopia de fluorescência da hibridização “*in situ*” da rPBC com células HeLa, o conteúdo de células em uma garrafa de cultura de 75 cm² contendo células HeLa em confluência foi desaderido por tratamento com tampão de desadesão contendo tripsina 0,25 % em fosfato de sódio 50 mM pH 7,4 EDTA 0,5 mM NaCl 150 mM por 5 min. a temperatura ambiente. As células desaderidas foram recuperadas por centrifugação 1000 g, por 5 min. e lavadas com PBS estéril para a retirada do tampão de desadesão. As células foram então ressuspensas em 20 ml de meio de cultura e vertidas sobre lamínulas para microscopia óptica, espalhadas dentro de uma placa da petri previamente autoclavadas. As placas foram incubadas em estufa a 37° C sob atmosfera de 5% de CO₂ por 24 h. Após este período, o meio de cultura foi descartado e as lamínulas com células HeLa aderidas sobre sua superfície foram exaustivamente lavadas com PBS. 20 µg da proteína marcada em 200 µl de tampão PBS foram adicionados a 900 µl de PBS. Como controle negativo, usou-se 20 µg da proteína marcada aquecida a 100° C por 30 minutos. Amostras de 50 µl foram aplicadas sobre as lamínulas de microscopia óptica. Após 15 min. de incubação da proteína com as células a temperatura ambiente, as células foram fixadas pela adição de 10 µl de formaldeído seguida de incubação por 30 min. a temperatura ambiente. Em seguida as lamínulas foram exaustivamente lavadas com PBS para a remoção de moléculas de proteína não

ligada, montadas sobre lâminas de microscopia óptica e levadas para observação. O mesmo procedimento foi aplicado para amostras da pulchellina nativa.

3.5.10 - Localização intracelular da rPBC em células K-562

Pulchellina nativa e rPBC foram marcadas com Alexa Fluor 350 (Molecular Probes - Invitrogen) passando a exibir fluorescência na cor azul quando excitadas por luz ultravioleta na faixa dos 350 nm. Células K-562 foram cultivadas como anteriormente descrito, coletadas por centrifugação 1000 g, 5 min., lavadas com PBS estéril e ressuspensas a 1×10^5 células K-562/ml em PBS. 900 μ l desta suspensão foram adicionados separadamente a 20 μ g de rPBC e 40 μ g de pulchellina nativa marcadas, e incubadas a 37° C, por 15 min.. Após a incubação, amostras de 50 μ l foram colocadas sobre lâminas de microscopia óptica. As células foram fixadas adicionando-se 10 μ l de formaldeído e incubando-se por 30 minutos. Após a fixação, as células foram lavadas com PBS e submetidas ao protocolo de imuno-coloração fluorescente do complexo de Golgi com um kit que utiliza anticorpos primários monoclonais anti-golgina e secundários marcados com Alexa Fluor 488 (Molecular Probes - Invitrogen). As células com dupla coloração foram analisadas por microscopia de fluorescência sob os comprimentos de excitação de 350 e 500 nm. Lâminas com coloração simples para a localização de somente a rPBC, pulchellina nativa e complexo de Golgi também foram feitas, e todas demonstraram perfeito funcionamento. Inesperadamente, a rPBC marcada não foi detectada após a dupla coloração, diferente da pulchellina nativa, que demonstrou boa co-localização com a imuno-coloração anti-golgina. Assim, quantidades equimolares de rPBC marcada com Alexa Fluor 350 e pulchellina nativa marcada com Alexa Fluor 488 foram reunidas e adicionadas a uma suspensão de K-562,

incubadas por 15 min., a 37° C, lavadas com PBS, fixadas com formaldeído e usadas para a montagem de lâminas para microscopia de fluorescência.

Com o objetivo de aumentar a resolução do experimento, os procedimentos para a montagem de lâminas para a co-localização da pulchellina nativa com a imunolocalização do complexo de Golgi e da pulchellina nativa com a rPBC foram repetidos para exame sob microscopia óptica confocal por varredura de laser (*confocal laser-scanning microscopy*), num microscópio Carl Zeiss LSM 510. Imagens foram registradas sob o controle do programa de aquisição do aparelho sob iluminação de lazer aos 488 nm e luz UV aos 350 nm.

3.5.11 - Etapas de endocitose discriminativas entre rPBC e pulchellina nativa em células K-562 vivas

Quantidades equimolares de rPBC marcada com Alexa Fluor 350 e pulchellina nativa marcada com Alexa Fluor 488 foram reunidas e adicionadas a uma suspensão de 1×10^5 células K-562/ml em PBS estéril, incubadas por 5 min. a 37° C, lavadas com PBS e assim usadas para a montagem de lâminas para microscopia de fluorescência.

Os ensaios de localização da rPBC acima descritos foram realizados com a colaboração de Priscila Vasques Castilho, aluna de doutorado pelo PPGGEv - UFSCar desenvolvendo seu trabalho sobre a pulchellina nativa.

3.6 - Atividade “*in vivo*” da cadeia B recombinante

A reconstituição da holoproteína foi realizada a partir das cadeias recombinantes isoladamente produzidas em *E. coli*. Para tanto, quantidades equimolares das cadeias purificadas (500 mg de cada) foram incubadas em tampão Tris-HCl pH 8,0 NaCl 100

mM, cisteína 5 mM, cistina 1 mM a 4° C por 48 horas. Amostras foram retiradas ao longo do período de incubação e armazenadas a -20° C para análise em SDS-PAGE sob condições não redutoras. Ao final do processo a holotoxina foi separada das cadeias isoladas remanescentes através de ultrafiltração em um Centriprep 30. A toxina foi submetida a medidas de CD e seu espectro comparado com os de cada cadeia e da pulchellina nativa (dados não mostrados). A atividade biológica da proteína reconstituída foi medida por ensaios de D.L. ₅₀ através da administração de diferentes doses de proteína, seguindo relações de µg de toxina/kg de animal, por injeção intraperitoneal em camundongos. A mortandade foi estimada 48 horas após a administração. As cadeias isoladas, bem como seus tampões foram utilizados como controles. Como controles positivos, doses da pulchellina nativa foram administradas. Estes ensaios foram realizados em seis repetições (6 animais por grupo de dosagem) e representados como porcentagem de morte por dose de proteína.

Os ensaios envolvendo a reconstituição do heterodímero a partir de cadeias recombinantes de origens distintas foram realizados em colaboração com o Dr. André Luis Coelho da Silva e encontram-se publicados [82].

Resultados e Discussão

4 - Resultados e Discussão

4.1 - Renovelamento e Purificação da rPBC

4.1.1 - Purificação dos corpos de inclusão

Ao recuperar proteínas a partir de corpos de inclusão insolúveis é importante que se alcance uma lise total das células, diferente de proteínas recuperadas da fração solúvel, na qual uma lise incompleta levaria somente a diminuição do rendimento inicial. Em se tratando de proteínas insolúveis, uma lise parcial leva a co-purificação de células inteiras na fração resgatada por centrifugação, o que leva a um aumento na relação proteína de interesse/contaminantes. Além disto, após a lise, proteínas contaminantes podem sob altas concentrações precipitar e serem também co-purificadas na forma de agregados insolúveis. Utilizando-se o protocolo descrito, foi possível resgatar uma fração rica (Figura 4.1) em rPBC com um alto grau de pureza o que é interessante visto que impurezas podem afetar o procedimento de renovelamento de forma adversa, tanto favorecendo o mal-enovelamento, a precipitação e/ou a agregação da rPBC [93-96].

4.1.2 - Desnaturação dos corpos de inclusão

Ao início do protocolo de renovelamento, é importante a total solubilização e desnaturação da rPBC. Além disto, renovelamento realizado sob altas concentrações protéicas pode levar a uma alta taxa de formação de moléculas mal-enoveladas que, por sua vez, competem com a taxa de enovelamento da rPBC e também podem levar a agregação protéica por interações intermoleculares inespecíficas [96]. Para tanto, os

corpos de inclusão contendo a rPBC foram desnaturados em 50 ml de tampão de desnaturação Tris-HCl 50 mM pH 8,5 contendo 8M de uréia. A concentração inicial da rPBC foi monitorada por absorvância a 280 nm de forma que sua concentração não excedesse $D.O._{280nm} = 0,8$, ou seja, cerca de 0,3 mg/ml. Este valor foi determinado visto que ao longo de experimentos pilotos de reenovelamento da rPBC, uma $D.O._{280nm} = 0,2$ foi a maior concentração obtida ao se concentrar a proteína reenovelada para se proceder à cromatografia de exclusão molecular, sem que ocorresse precipitação da proteína. Além disto, sob 8M de uréia, toda a rPBC pôde ser solubilizada e outros contaminantes presentes na fração insolúvel em 8M de uréia foram retirados da solução de proteína desnaturada por centrifugação 20000 g por 10 min. (Figura 4.1). As etapas posteriores do processo de reenovelamento foram mantidos [84].

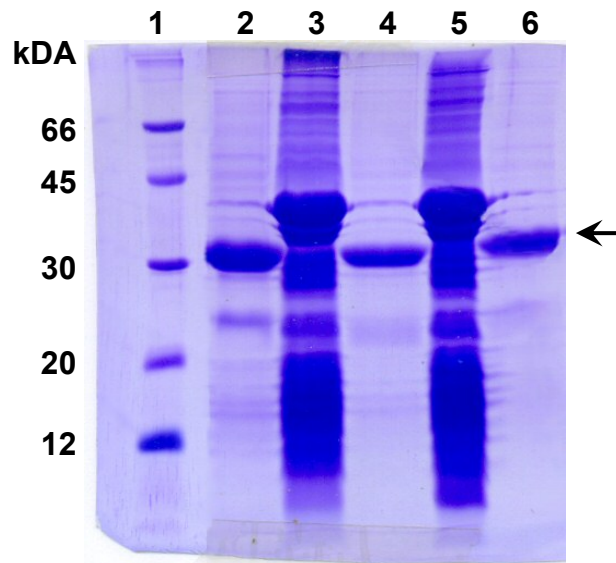


Figura 4.1 - Purificação e desnaturação de corpos de inclusão contendo rPBC. 1) Padrões de massa molecular; 2) Corpos de inclusão contendo rPBC; 3 e 5) Contaminantes insolúveis retirados por centrifugação da rPBC desnaturada, amostras reduzidas e não reduzidas respectivamente; 4 e 6) rPBC em tampão desnaturante após a retirada de contaminantes insolúveis, amostras reduzidas e não reduzidas respectivamente. Uma seta indica a banda da rPBC.

4.1.3 - Agregação Solúvel da rPBC X Purificação da rPBC renovelada

Um dos principais fatores limitantes no renovelamento de proteínas é o mal-renovelamento que pode levar a uma baixa produtividade devido à precipitação protéica, formação de molécula de conformação diferente da nativa envolvendo ou não mais de uma molécula no colapso estrutural [96]. No caso da rPBC, grandes quantidades de agregados protéicos solúveis e resistentes competem ao longo do renovelamento (mais precisamente na etapa de oxidação concomitante à retirada do desnaturante) com a formação de moléculas corretamente enoveladas. Isto pode ser observado ao fim do protocolo de renovelamento pelo aparecimento de uma banda adicional de alta massa molecular em SDS-PAGE de amostras não reduzidas (Figuras 4.2 e 4.3). Tais agregados são compostos em sua maior parte por moléculas da própria rPBC, provavelmente colapsadas em grandes agregados multi-moleculares solúveis e entrelaçados por ligações dissulfeto errôneas. Este grande gargalo pôde ser contornado pela introdução de um ciclo adicional de ultrafiltrações visando eliminar moléculas com peso molecular acima de 50 kDa (Figuras 4.2 e 4.3), uma vez que a cromatografia de exclusão molecular não se mostrou tão eficiente frente à grande quantidade destes agregados ao fim do renovelamento. Todo o eluato proveniente da ultrafiltração em Centriprep 50 foi reunido até que o conteúdo retido pelo concentrador não apresentasse a banda referente à rPBC monomérica ao exame em SDS-PAGE (Figura 4.3). Em seguida, todo o volume coletado foi concentrado em um Centriprep 10 até uma $D.O._{280nm} = 0,2$. Moléculas de rPBC retiradas do agregado através da adição de redutores se mostraram desprovidas de atividade e inapropriadas para utilização futura.

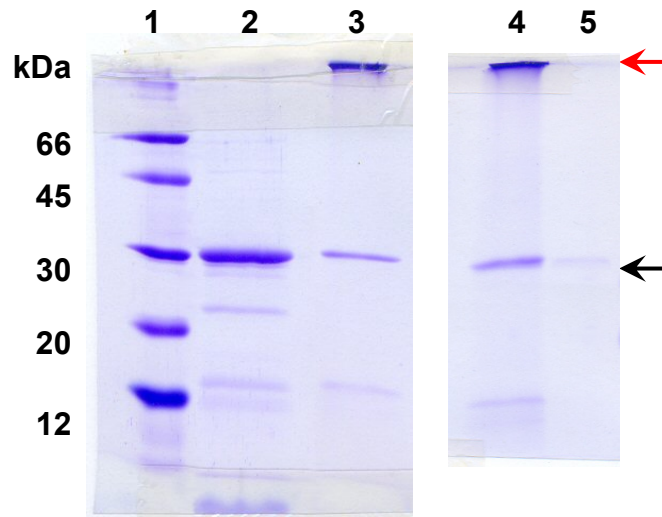


Figura 4.2 - Diagnóstico da agregação da rPBC e separação de moléculas monoméricas das agregadas. 1) Padrões de massa molecular; 2) Amostra da rPBC ao final do reenovelamento na presença de redutor; 3) Amostra da rPBC ao final do reenovelamento na ausência de redutor; 4 e 5) Amostras da rPBC ao final do reenovelamento não fervidas e sem redutor, fração retida e eluída do Centriprep 50 respectivamente, nos primeiros ciclos de ultrafiltração. Uma seta negra indica a banda da rPBC monomérica e uma seta vermelha, a banda respectiva a agregados.

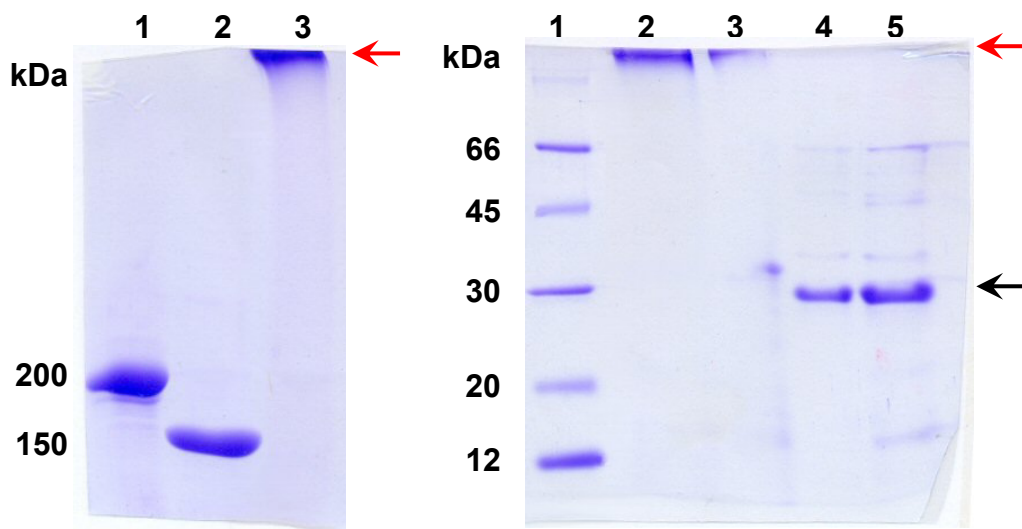


Figura 4.3 - À esquerda, agregados da rPBC, SDS-PAGE 10%. 1 e 2) Padrões de massa molecular, β -amilase e Álcool desidrogenase respectivamente; 3) Amostra da rPBC agregada não fervida e sem redutor, fração retida pelo Centriprep 50; **À direita, separação final dos agregados da rPBC.** 1) Padrões de massa molecular; 2 e 3) Frações retidas no Centriprep 50 contendo somente agregados protéicos; 4 e 5) Frações eluídas do Centriprep 50 e concentradas em Centriprep 10. Todas as amostras foram aplicadas na ausência de redutor e sem pré-aquecimento. Setas negra e vermelha indicam respectivamente bandas referentes à rPBC monomérica e agregada.

4.1.4 - Purificação da rPBC reenovelada

A purificação foi realizada em uma coluna de exclusão molecular Superdex 75 HiLoad 16/60 pré-equilibrada em Tris-HCl 10 mM pH 8,5. A cromatografia de exclusão molecular foi realizada através de injeções de 5 ml da solução de proteína e fluxo de 1 ml/min. de Tris-HCl 10 mM pH 8,5. Frações de 2,5 ml foram coletadas e a cromatografia monitorada por absorbância a 280 nm.

As frações contendo rPBC pura e monomérica foram reunidas e reservadas a -20° C até o final dos ciclos de purificação. Finalmente as frações reservadas foram concentradas por ultrafiltração em um aparelho Amicon equipado com uma membrana de corte de exclusão em 10 kDa, até que a solução retida no aparelho tivesse uma D.O._{280 nm} = 0,24 (cerca de 0,1 mg de rPBC/ml). A proteína obtida foi testada quanto a sua capacidade hemaglutinante e perfil espectroscópico ao CD.

Com a adoção destas modificações ao método previamente descrito [84], o aumento de escala de produção da rPBC pôde ser contemplado, rendendo cerca de 1,5 mg de rPBC por preparação iniciada com 50 ml de corpos de inclusão solubilizados a 0,3 mg/ml em tampão de desnaturação (Tris-HCl 50 mM pH 8,5 8M uréia). Além disto, os corpos de inclusão provenientes de 1 l de cultura, adicionados aos poucos ao tampão de desnaturação até a D.O._{280 nm} = 0,8 são utilizáveis de 2 a 3 vezes mantendo-se os volumes descritos, o que multiplica o rendimento do protocolo agora descrito.

4.2 - Influência de diferentes relações de par redox no rendimento do reenovelamento

Corpos de inclusão contendo a rPBC foram solubilizados em 8M de uréia em Tris-HCl 50 mM pH 8,5. A solução foi diluída com o mesmo volume de Tris-HCl 50 mM pH 8,5 e esta solução contendo rPBC solubilizada e não reduzida foi dividida em 3 frações iguais. A cada fração foi adicionado um mesmo volume de tampão de oxidação diferindo apenas no conteúdo de cisteína e cistina. Três relações molares diferentes, 6:0, 1:1, 0:6, somando 6 mM em concentração final de cisteína + cistina nas soluções foram utilizadas. A partir de então, o restante do procedimento de reenovelamento foi realizado sobre os três sistemas isoladamente, tendo como única diferença as relações molares de cisteína:cistina que foram mantidas nas etapas de diálise até a remoção do desnaturante. Ao final dos reenovelamentos, amostras de cada uma das diferentes condições de reenovelamento oxidativo foram submetidas à análise por SDS-PAGE (Figura 4.4). A análise indica uma importante dependência das condições de oxidativas no rendimento em proteína solúvel. A diferença da intensidade das bandas entre amostras de mesma origem com e sem redutor pode ser atribuída à agregação da rPBC.

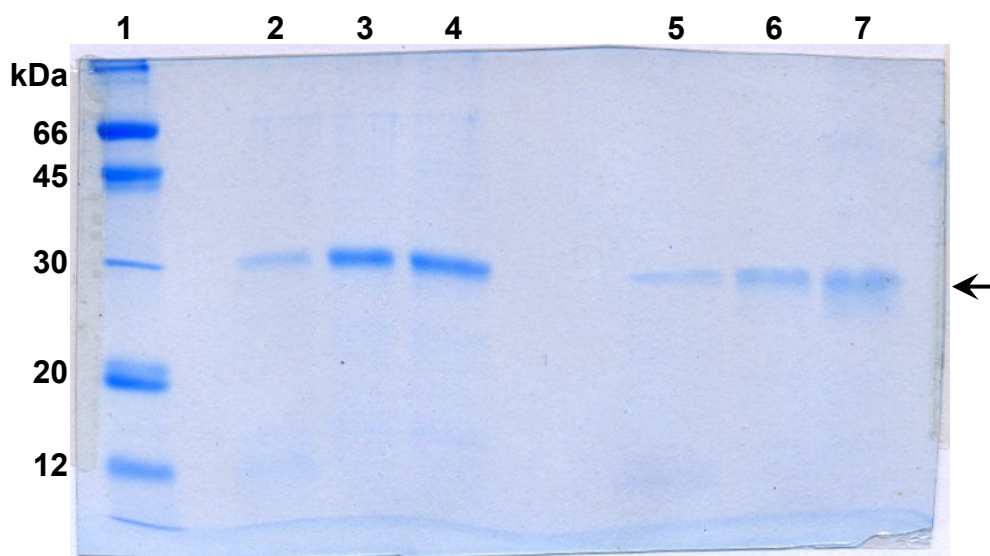


Figura 4.4 - Influência da relação molar do par redox no rendimento do reovelamento da rPBC. 1) Padrões de massa molecular; 2 e 5) Amostra reovelada na presença de 6 mM de cisteína, eletroforese em presença e ausência de redutor respectivamente; 3 e 6) Amostra reovelada na presença de 3 mM de cisteína e 3 mM de cistina, eletroforese em presença e ausência de redutor respectivamente; 4 e 7) Amostra reovelada na presença de 6 mM de cistina, eletroforese em presença e ausência de redutor respectivamente. Uma seta indica a altura da banda referente à rPBC.

Os resultados demonstram que para o reovelamento da rPBC, as condições de oxidação favorecendo a maior obtenção de proteína sob forma solúvel parecem estar deslocadas para 6 mM de cistina. Nota-se uma tendência no rendimento de proteína solúvel correlacionada com o balanço nas quantidades relativas do par redox cisteína-cistina, e pela tendência, favorecendo o balanço molar 0:6 cisteína:cistina para um maior rendimento. Este balanço se mostra como um parâmetro importante para o reovelamento de rPBC. No caso do protocolo anteriormente descrito [84], o mesmo utilizado para a produção de rPBC deste trabalho (adicionado das mudanças descritas nos itens 3.1.1-3.1.3), a relação molar utilizada foi 5:1 cisteína:cistina. O balanço molar 5:1 cisteína:cistina encontra-se num ponto mais próximo ao extremo de menor rendimento pelo experimento. Isto sinaliza a possibilidade de um aumento na produção de rPBC em se implementando ao processo de reovelamento um balanço molar de cisteína:cistina diferente do atualmente utilizado. Entretanto, este experimento foi

realizado a partir dos corpos de inclusão não reduzidos, e talvez isto não seja reprodutível, iniciando-se o processo com rPBC reduzida, devido à possibilidade de diferentes estados de tióis livres nos corpos de inclusão da rPBC quando comparado ao da proteína totalmente reduzida [97,98]. De qualquer forma, este parâmetro fica como mais uma possibilidade importante de aumento no rendimento do reenovelamento da rPBC.

4.3 - Expressão da rPBC no espaço periplasmático fusionada com “*Celulose-Binding Domain*” (CBD)

Uma nova construção visando à expressão no espaço periplasmático foi feita. Para tanto, o inserto correspondente à rPBC foi excisado do pPBC e inserido entre determinados sítios de restrição do pET37b+. Um parâmetro considerado para a escolha deste vetor foi o pequeno tamanho da proteína de fusão, que possibilita uma maior produção no espaço periplasmático, seja considerando constrição espacial (volume ocupado pela fusão) ou mesmo aporte de recursos (gasto metabólico para a produção de uma fusão em que somente parte é de interesse).

4.3.1 - Condições de indução da rPBC fusionada com “*Celulose-Binding Domain*” (CBD)

A expressão da construção plasmidial pET37PBC foi realizada a 20° C sob duas concentrações de indutor, visando maximizar a quantidade de proteína produzida. Amostras das duas condições de expressão foram reservadas para eletroforese em gel. A

análise indica que sob 0,4 mM de IPTG a fração solúvel parece conter mais proteína (Figura 4.5).

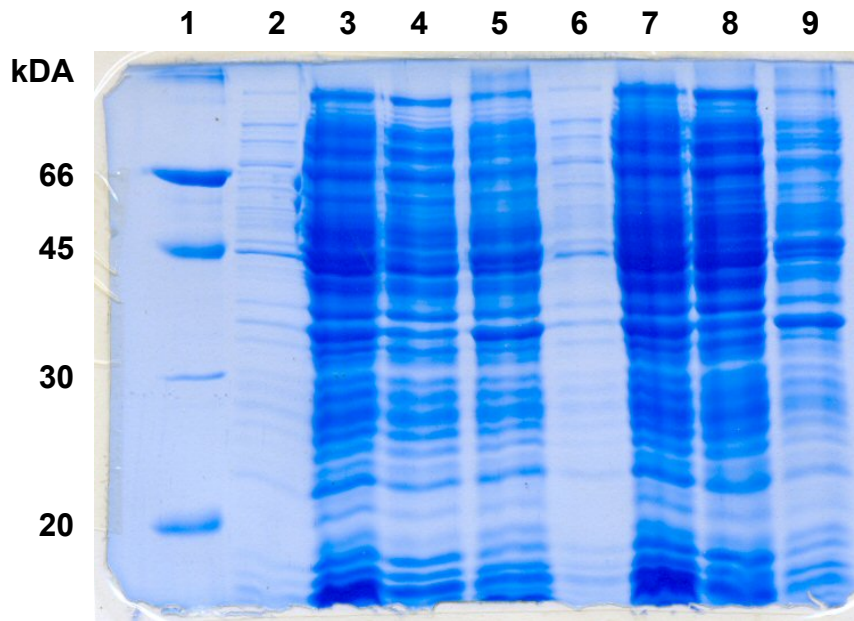


Figura 4.5 - Expressão da rPBC em fusão com CBD no espaço periplasmático. 1) Padrões de massa molecular; 2 e 6) Amostras retiradas antes da adição de IPTG; 3 e 7) Amostras retiradas após indução por 16h, sob 0,1 mM e 0,4 mM de IPTG respectivamente; 4 e 8) Frações solúveis dos lisados após indução com 0,1 mM e 0,4 mM de IPTG respectivamente; 5 e 9) Frações insolúveis dos lisados após indução com 0,1 mM e 0,4 mM de IPTG respectivamente.

Em princípio, era esperada uma banda adicional em torno dos 45 kDa, sendo 15 kDa referentes à CBD mais 30 kDa da rPBC com um sítio de clivagem com fator Xa entre as duas. A análise das expressões não acusou uma banda adicional única respectiva à indução, mas indicou que a fração solúvel respectiva às possíveis bandas eletroforéticas da fusão CBD-rPBC após a indução com 0,4 mM IPTG era mais rica que a da indução com menos IPTG. Uma série de bandas próximas aos 45 kDa presentes nas frações solúveis dos lisados são os melhores candidatos a indicarem a fusão CBD-rPBC. Entretanto, o comportamento de proteínas em SDS-PAGE nem sempre corresponde àquele da proteína em solução ou em outros meios. A ligação por afinidade a uma matriz de celulose de uma proteína apresentada como uma banda eletroforética na faixa dos 45 kDa poderia identificar a banda respectiva à fusão CBD-rPBC.

4.3.2 - Purificação da fusão CBD-rPBC

A fração solúvel do lisado referente à expressão com 0,4 mM de IPTG foi submetida à purificação por afinidade em uma coluna C-BinD 200 seguindo o protocolo do fabricante (Novagen). Amostras referentes às etapas ao longo da expressão e purificação foram retiradas para análise em SDS-PAGE (Figura 4.6).

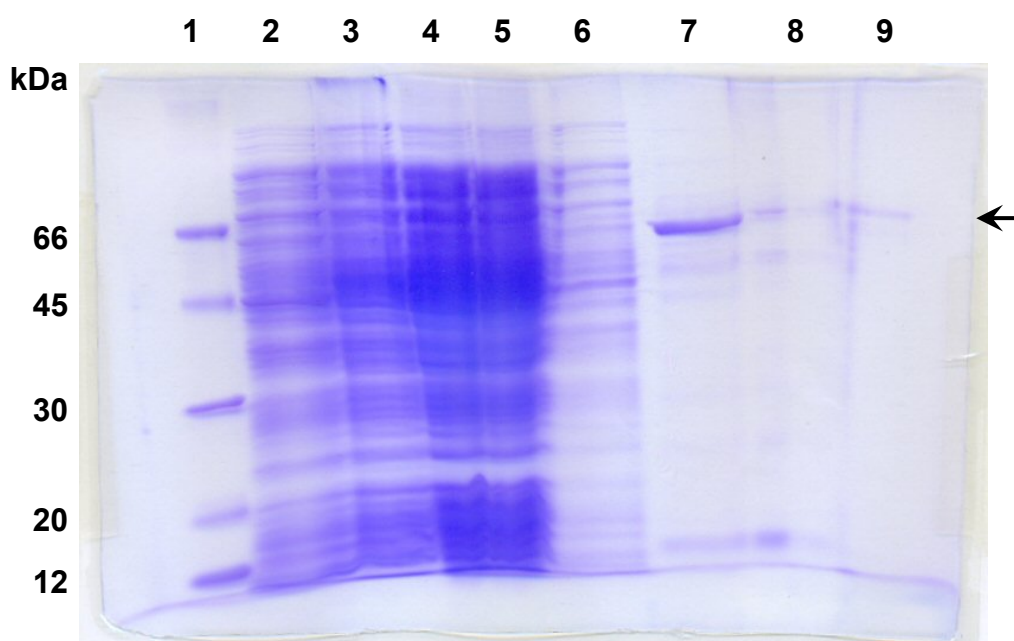


Figura 4.6 - Purificação da fusão CBD-rPBC. 1) Padrões de massa molecular; 2 e 3) Amostras da cultura antes e após a indução respectivamente; 4) Fração solúvel do lisado bacteriano; 5) Fração das proteínas não ligadas à celulose imobilizada após passagem pela coluna C-BinD 200; 6) Fração da lavagem da coluna; 7, 8 e 9) Proteína eluída fracionada nos primeiros 3 volumes de coluna em etilenoglicol. Uma seta indica a altura da banda eletroforética referente à fusão CBD-rPBC.

A análise da eletroforese indica um aumento na quantidade de componentes protéicos pouco acima dos 45 kDa após a indução (Figura 4.6, colunas 2 e 3), como o esperado para a fusão CBD-rPBC. Esta banda aparece tanto da fração solúvel quanto insolúvel do lisado e esperava-se que este componente pudesse ser purificado por afinidade à matriz C-Bind 200 (Novagen).

Seguindo o protocolo do fabricante, a proteína de fusão foi purificada e eluída em maior quantidade no primeiro volume de coluna em etilenoglicol 100%, e diferente

do esperado, se apresentou como uma banda entre 45 e 66 kDa sob SDS-PAGE, descartando o componente aos 45 kDa como o resultante da expressão do pET37PBC. Isto pode ser explicado considerando que sob SDS-PAGE, a distinção de tamanhos diferentes se dá indiretamente através da relação carga/massa das proteínas migrando sob resistência da poliacrilamida e não diretamente sobre seu tamanho. Outra possibilidade seria que a banda purificada seja relativa a algum outro contaminante ligante de celulose e que a purificação da fusão CBD-rPBC não tenha funcionado como o previsto. Uma forma de se confirmar se a proteína purificada é a fusão de interesse é através da clivagem do componente purificado com fator Xa. Caso o sistema funcione como o esperado, o componente deve dar origem a duas bandas eletroforéticas nos tamanhos de 15 kDa (CBD) e 30 kDa (rPBC).

4.3.4 - Clivagem da proteína de fusão CBD-rPBC.

A fração do primeiro volume de eluição em etilenoglicol 100 %, contendo a fusão CBD-rPBC foi dialisada contra tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 100 mM NaCl 1 mM CaCl₂ e dividida em duas frações. Cada fração foi adicionada de fator Xa a 2 unidades/mg e 10 unidades/mg e incubadas a temperatura ambiente. Amostras ao longo da incubação foram retiradas para análise da clivagem proteolítica em SDS-PAGE (Figura 4.7).

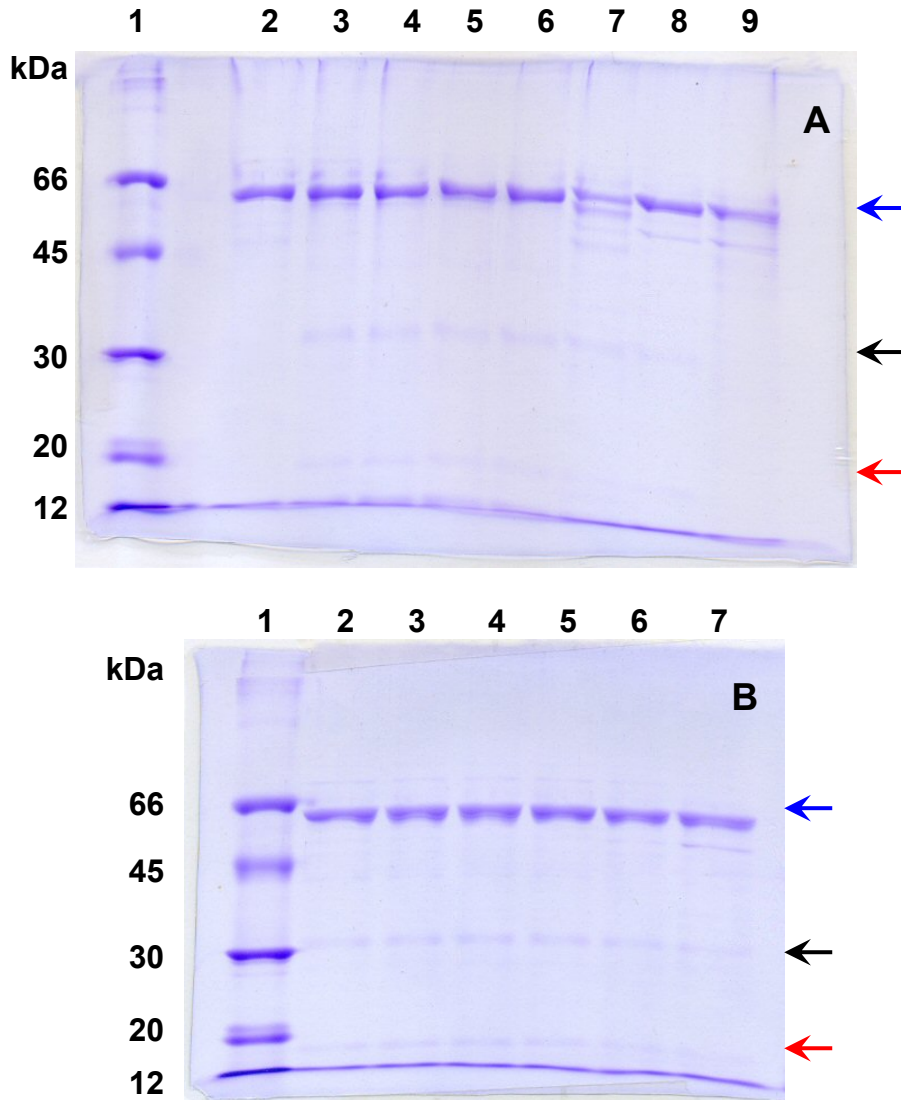


Figura 4.7 - Clivagem da fusão CBD-rPBC. A) Clivagem com 10 unidades de fator Xa/mg de fusão; 1) Padrões de massa molecular; 2) Proteína antes da adição de protease fator Xa; 3, 4, 5, 6, 7, e 8) Amostras retiradas após 30 min., 1h, 2h, 3h, 17h e 24h de incubação respectivamente; 9) Controle negativo da clivagem composto por proteína de fusão incubada por 24h sem a adição de fator XA. **B)** Clivagem com 2 unidades de fator Xa/mg de fusão; 1) Padrões de massa molecular; 2, 3, 4, 5, 6, e 7) Amostras retiradas após 30 min., 1h, 2h, 3h, 17h e 24h de incubação respectivamente. Setas azuis, negras e vermelhas indicam as alturas das bandas referentes à fusão CBD-rPBC, rPBC e CBD, respectivamente.

A eletroforese não indica aumento substancial na clivagem da fusão realizada com 10 unidades de fator Xa/mg da fusão CBD-rPBC em comparação com 2 unidades/mg. A clivagem demonstra o aparecimento das duas bandas eletroforéticas previstas para o sistema, uma em torno dos 15 kDa (CBD) e outra referente à rPBC aos

30 kDa. Embora tenha sido possível a observação das bandas referentes à rPBC e CBD após 30 min. de incubação, o rendimento da clivagem foi baixo e não foi possível a clivagem total da fusão nas condições relacionadas. O experimento indica o sucesso na produção da rPBC sob uma forma solúvel em expressão periplasmática fusionada com CBD. Embora seja possível que a banda referente à fusão pudesse ser ocasionada por um contaminante, é muito improvável que este seja clivado com fator Xa dando origem a duas bandas com tamanhos esperados para a fusão. Este experimento sinaliza a possibilidade de produção da rPBC sob uma forma solúvel, contornando todo o procedimento de reenovelamento outrora descrito. Testes futuros visando à otimização deste sistema de expressão poderão otimizar a produção da rPBC.

4.4 - Medidas Espectroscópicas

4.4.1 - Estabilidade da rPBC em função do pH

Amostras da rPBC reenovelada foram incubadas sob as condições anteriormente descritas. Após a incubação, as amostras incubadas abaixo do pH 7,0 apresentaram uma severa precipitação, impossibilitando suas medições. A análise dos espectros emissão de fluorescência indicou haver pouca mudança no grau de exposição de resíduos de triptofano na faixa de pH 7,0-10,0 (Figura 4.8 A). Em pH acima de pH 10,0, os espectros de emissão sofrem uma acentuada diminuição em sua intensidade, o que poderia ser correlacionado a mudanças no ambiente ao redor de resíduos que exibam fluorescência quando excitados a 295 nm (triptofanos), o que por sua vez pode indicar mudanças conformacionais. Por outro lado, mudanças de intensidade de emissão fluorescente podem ser ocasionadas por supressão da fluorescência em virtude de

diferenças na composição dos tampões, e assim, não necessariamente se correlacionar com mudanças estruturais. As posições dos máximos de emissão em torno dos 340 nm indicam um grau intermediário de exposição dos resíduos de triptofano ao solvente. Os perfis dos espectros de CD tomados nos mesmos valores de pH também confirmam pouca mudança na faixa de pH 7,0 - 10,0 (Figura 4.8 B). Novamente, as maiores mudanças no perfil de CD ocorrem nos valores acima do pH 10,0. Uma banda positiva em torno dos 230 nm demonstra ser a região mais sensível às mudanças de pH. Porém, esta banda não está diretamente relacionada a elementos de estrutura secundária, e sim a contribuições de cadeias laterais de resíduos de caráter aromático ou pontes dissulfeto [91], o que por si só pode indicar informação muito restrita a respeito da conformação protéica, podendo ou não ser correlacionada com o enovelamento protéico global. Já as bandas negativas aos 204 e 218 nm podem ser diretamente correlacionadas com elementos de estrutura secundária cuja mudança pode refletir alterações no enovelamento global da molécula ou a alguma mudança localizada.

Segundo estes parâmetros, a rPBC mostra-se relativamente estável dentro da faixa de pH 7,0-10,0. Sob pHs mais baixos, a rPBC apresentou grande precipitação sendo instável nesta faixa. Em pHs acima da faixa estável, embora a proteína se mantenha em solução, a estrutura protéica demonstra sofrer mudanças relativamente grandes quando comparada com a estrutura “nativa”.

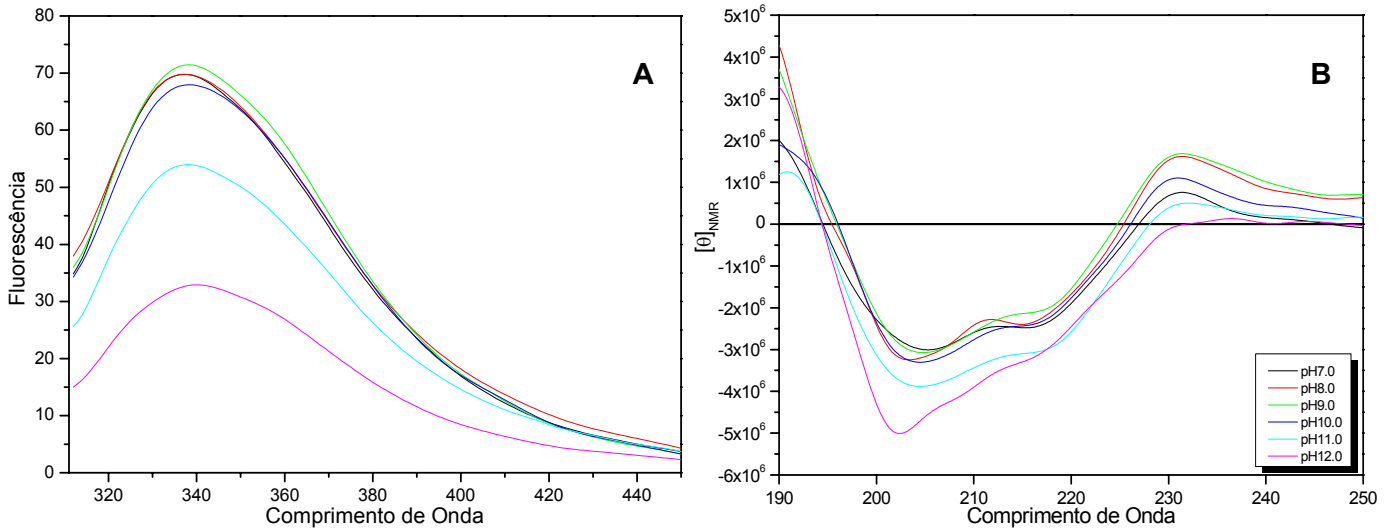


Figura 4.8 - Ensaio de estabilidade estrutural sob diferentes pHs. **A)** Amostras da rPBC a 0,04 mg/ml em acetato-borato-fosfato 20 mM ajustado para os diferentes valores de pH 7-12 foram excitadas a 295 nm e sua intensidade de fluorescência registrada na faixa entre 310-450 nm; **B)** Amostras da rPBC 0,08 mg/ml em tampão acetato-borato-fosfato 20 mM ajustado para os diferentes valores de pH foram medidas a temperatura ambiente e registradas como uma média de 16 varreduras. Em pH abaixo de 7.0 houve grande precipitação protéica que impossibilitou as medidas. Espectros de mesma cor indicam medidas sob o mesmo pH.

Os espectros de CD foram interpretados pelo pacote de programas CDPro e seus resultados estão resumidos a seguir:

- rPBC em pH 7,0 -

CLUSTER	
classe	score
Toda α	0
$\alpha + \beta$	3
α / β	1
Toda β	4
Desnaturada	2

Estrutura	α (r)	α (d)	β (r)	β (d)	Turn	Unrd.
Programa						
SELCON3	.023	.149	.371	.183	.137	.148
CDSSTR	.014	.028	.272	.145	.223	.325
CONTINLL	.000	.035	.283	.141	.221	.320
Média	.012	.071	.309	.156	.194	.264
%	8,3		46,5		19,4	26,4

- rPBC em pH 8,0 -

CLUSTER	
classe	score
Toda α	1
$\alpha + \beta$	3
α / β	1
Toda β	4
Desnaturada	1

Estrutura	α (r)	α (d)	β (r)	β (d)	Turn	Unrd.
Programa						
SELCON3	.022	.144	.334	.172	.111	.179
CDSSTR	.012	.016	.304	.158	.203	.309
CONTINLL	.000	.020	.302	.136	.212	.330
Média	.011	.060	.313	.155	.175	.273
%	7,1		46,8		17,5	27,3

- rPBC em pH 9,0 -

CLUSTER	
classe	score
Toda α	1
$\alpha + \beta$	3
α / β	1
Toda β	4
Desnaturada	1

Estrutura Programa	α (r)	α (d)	β (r)	β (d)	Turn	Unrd.
SELCON3	.019	.145	.306	.162	.097	.149
CDSSTR	.013	.019	.280	.145	.221	.323
CONTINLL	.000	.024	.295	.139	.209	.332
Média	.011	.063	.294	.149	.176	.268
%	7,4		44,3		17,6	26,8

- rPBC em pH 10,0 -

CLUSTER	
classe	score
Toda α	1
$\alpha + \beta$	3
α / β	0
Toda β	4
Desnaturada	2

Estrutura Programa	α (r)	α (d)	β (r)	β (d)	Turn	Unrd.
SELCON3	.001	.040	.337	.138	.138	.299
CDSSTR	.013	.028	.287	.146	.208	.327
CONTINLL	.000	.038	.278	.140	.214	.330
Média	.005	.035	.301	.141	.187	.319
%	4		44,2		18,7	31,9

- rPBC em pH 11,0 -

CLUSTER	
classe	score
Toda α	0
$\alpha + \beta$	3
α / β	1
Toda β	4
Desnaturada	2

Estrutura Programa	α (r)	α (d)	β (r)	β (d)	Turn	Unrd.
SELCON3	.005	.039	.342	.149	.166	.328
CDSSTR	.014	.033	.279	.142	.225	.315
CONTINLL	.000	.044	.294	.138	.225	.332
Média	.006	.039	.309	.143	.205	.325
%	4,5		46,2		20,5	32,5

- rPBC em pH 12,0 -

CLUSTER	
classe	score
Toda α	0
$\alpha + \beta$	3
α / β	1
Toda β	4
Desnaturada	2

Estrutura Programa	α (r)	α (d)	β (r)	β (d)	Turn	Unrd.
SELCON3	.032	.098	.357	.166	.144	.211
CDSSTR	.009	.037	.272	.141	.213	.330
CONTINLL	.000	.039	.265	.135	.228	.333
Média	.014	.058	.298	.147	.195	.291
%	7,2		44,5		19,5	29,1

Tabela 4.1 - Desconvolução dos espectros da rPBC em diferentes pHs. Os espectros obtidos foram analisados com os programas do pacote CDPro, SELCON3, CDSSTR e CONTINLL para a análise de frações de estruturas secundárias e CLUSTER para a classificação de estrutura terciária. α e β denotam a contribuição em estruturas tipo alfa-hélice e folha-beta, respectivamente. (r) indica estrutura secundária regular e (d) distorcida. Unrd indica as contribuições e de estruturas não ordenadas.

De acordo com a desconvolução dos espectros, há certa oscilação nas frações de estrutura secundária componentes da rPBC, com gradativa perda de contribuições de estruturas de α -hélices e folhas- β e aumento de estruturas desordenadas aumentando-se o pH entre 7,0-11,0. No pH 12, a estrutura parece se organizar em outra conformação,

com um balanço de estruturas de α -hélices e folhas- β diferente da inicial ao pH 7,0 e maior conteúdo de estruturas desordenadas. Considerando-se isto, a rPBC deve oscilar sua estrutura na faixa de pH entre 7,0 a 11,0, sem perder drasticamente a estrutura em algum pH. Além disto, a análise pelo programa CLUSTER, que indicou corretamente a rPBC como uma proteína predominantemente composta de elementos de folhas- β , indica também uma possibilidade da rPBC estar desnaturada e segundo esta análise, a rPBC parece ter menos chance estar desnaturada nos pHs 8,0 e 9,0. Tomando-se o conjunto de dados obtidos, pode ser inferido que a rPBC se mantenha mais estável na faixa de pH entre 8,0 a 9,0.

4.4.2 - Estabilidade da rPBC em função do aumento de temperatura

A estabilidade térmica da rPBC foi monitorada por CD ao longo de aquecimento de 10° C a 100° C, e medida a cada 5° C. A rPBC, a cerca de 0,1 mg/ml em Tris-HCl 10 mM pH 8,5, foi incubada por dois minutos em cada temperatura antes de cada varredura. Medidas foram feitas na presença (Figura 4.9 A) e na ausência de D-Galactose (Figura 4.9 B) na solução. Os espectros foram registrados no intervalo de comprimento de onda de 200-250 nm, representados como a média de 16 varreduras e transformados em elipticidade molar do resíduo médio.

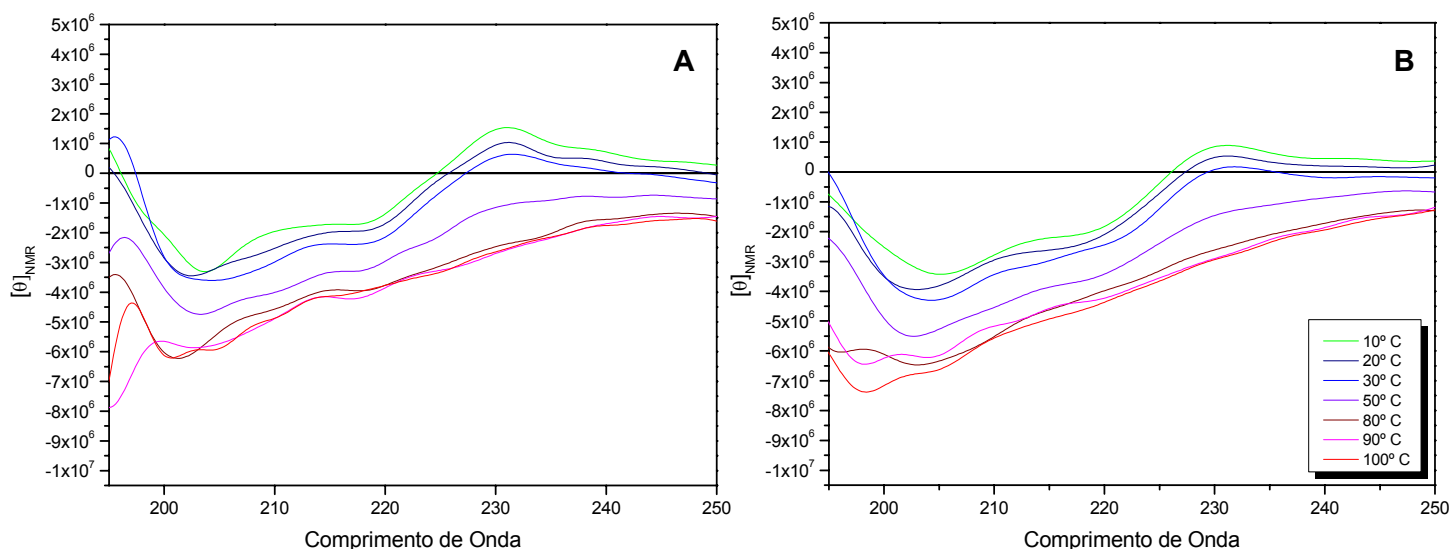


Figura 4.9 - Ensaio de estabilidade térmica da rPBC. Amostras da rPBC a 0,08 mg/ml foram submetidas à desnaturação térmica variando-se a temperatura de 10° C a 100° C sob divisões de 5 ° C. A cada 5 ° C a amostra foi incubada por 2 minutos na respectiva temperatura antes de ser medida. **A)** espectros gerados na ausência de carboidratos; **B)** Espectros gerados em presença do ligante da rPBC, D-Galactose. Apenas 7 dos espectros obtidos são representados na figura, e suas respectivas temperaturas estão indicadas.

A análise das curvas não demonstrou regiões de estabilidade térmica, o que torna difícil a determinação do início e do fim das populações de conformeros majoritariamente “nativos” e desnaturados (isso supondo apenas duas fases). Na prática, as curvas podem representar somente parte da transição de fases, visto que não foi possível determinar com precisão a temperatura de início de desnaturação e nem um patamar representativo do fim desta transição. A proteína poderia, por exemplo, possuir uma região de estabilidade do protômero “nativo” abaixo da faixa de temperaturas medidas, bem como a temperatura em que 100% das moléculas estivessem desnaturadas poderia estar acima da faixa medida. O mais provável, porém, é que a técnica não seja adequada para a monitoração do desenovelamento da rPBC por aumento de temperatura. Ainda assim, os espectros demonstram uma grande sensibilidade da molécula frente ao aumento de temperatura. Quanto à diferença destes parâmetros quando em presença de ligante ou na ausência deste, a diferença é desprezível tanto em função do ruído das medidas como pela incerteza de que estes valores possam realmente

ser representativos. Entretanto, constata-se que o espectro sofre pouca interferência na presença ou ausência do ligante, o que se interpreta como ausência ou pouca mudança conformacional, possível de ser visualizada por CD, relacionada com a ligação da rPBC com D-Gal. Os espectros tomados ao longo da desnaturação térmica indicam que com o aumento de temperatura, há uma diminuição geral nos valores de CD com deslocamento da banda negativa aos 204 nm para os 200 nm, e desaparecimento das bandas negativa aos 218 nm e positiva aos 230 nm.

Alguns dos espectros da rPBC ao longo da desnaturação térmica foram analisados pelo pacote de desconvolução CDPro e o resultado segue na tabela a seguir:

Estrutura (%) Temperatura	α	β	<i>Turn</i>	<i>Unrd.</i>
10° C	5,2	37,6	23,8	34,7
20° C	5,8	35,0	23,9	35,5
30° C	5,7	35,0	24,1	35,5
50° C	8,3	31,5	26,5	33,9
80° C	8,2	21,8	29,4	39,4
90° C	12,3	22,0	26,3	40,3
100° C	12,8	22,9	26,2	37,6

Tabela 4.2 - Desconvolução dos espectros de CD da rPBC em diferentes temperaturas. Os espectros obtidos foram analisados com os programas do pacote CDPro, SELCON3, CDSSTR e CONTINLL para a análise de frações de estruturas secundárias. α e β denotam a contribuição percentual média entre os três algoritmos de desconvolução em estruturas tipo alfa-hélice e folha-beta, respectivamente. *Unrd* indica as contribuições de estruturas não ordenadas.

A desconvolução dos espectros de CD indica que ao longo do aumento de temperatura a rPBC parece perder estruturas do tipo folha- β distribuindo a contribuição desta fração entre elementos desordenados e α -hélices.

Em suma, as medidas espectroscópicas demonstram que a rPBC deve permanecer relativamente estável dentro da faixa de pH entre 8,0 a 9,0, e em pH 12, a proteína provavelmente deve estar desnaturada. Além disso, sua estrutura parece ser

muito sensível a mudanças de temperatura e a ligação com D-Gal não ocasiona mudanças conformacionais detectáveis através de CD.

4.5 - Ensaio com células de mamífero

4.5.1 - Ensaio de promoção de adesão

Células de mamífero de diversas linhagens foram cultivadas, marcadas com um marcador fluorescente e incubadas com a rPBC imobilizada em poços de microplacas. Nestes ensaios, espera-se que caso haja interações da proteína imobilizada com a superfície das células, estas permanecerão aderidas aos poços através da proteína, que age como uma espécie de “cola molecular”. O número de células aderidas poderia ser controlado pela quantidade de sítios de interação disponíveis, número proporcional ao número de moléculas de rPBC imobilizadas. Este número de moléculas imobilizadas seria determinado pela disponibilidade destas em solução, dado pela concentração da rPBC liberada em cada poço. Como as amostras foram preparadas obedecendo a uma diluição seriada, quando a adesão é detectada, o número de células aderidas segue a tendência das concentrações utilizadas. Ao final do experimento, a adesão é então medida após a lise das células que permanecessem aderidas, o que libera seus conteúdos fluorescentes, através da leitura da fluorescência dos poços. Tipos celulares diferentes devem possuir populações de receptores de membrana diferentes, tanto em número quanto em tipo, e caso a rPBC possua capacidade de discriminar alvos preferenciais entre estes, adesão seletiva quanto ao tipo celular poderia ser observada. Tal seletividade seria importante em uma possível aplicação da rPBC como molécula carreadora de substâncias para tipos celulares distintos, sendo capaz de atingir um tipo

de célula sem, contudo perturbar outro. A análise dos dados revela que a rPBC deve possuir seletividade quanto a células alvo (Figura 4.10).

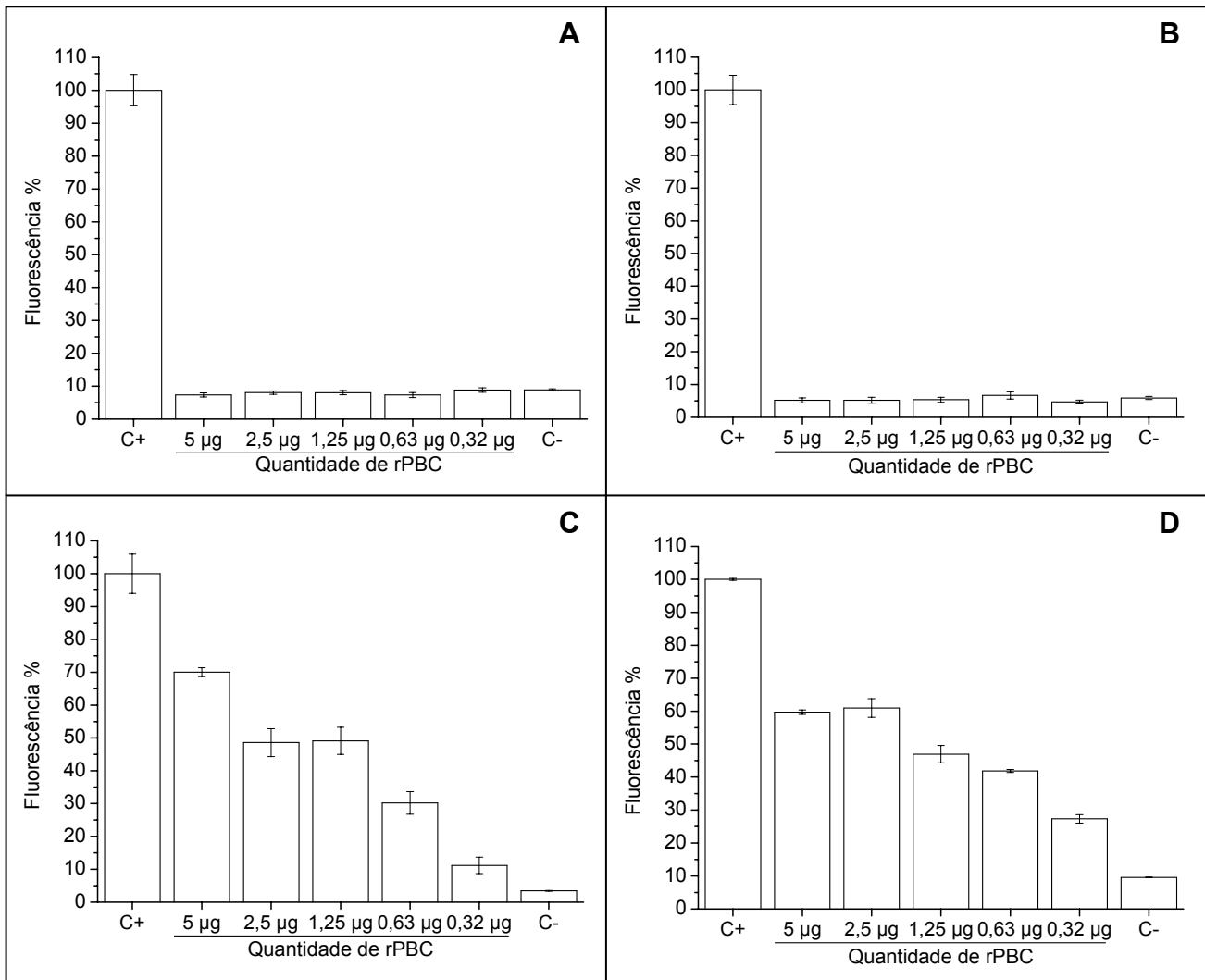


Figura 4.10 - Ensaio de promoção de adesão artificial de células de mamífero mediada pela cadeia B da pulchellina recombinante renovelada. Microplacas de 96 poços foram recobertas com rPBC em diluições seriadas e submetidas a ensaio de promoção de adesão celular com as seguintes linhagens: **A)** TK; **B)** HeLa; **C)** MDA-MB-231; **D)** K-562 $\alpha_2\beta_1$. Controles positivos e negativos estão assinalados como C+ e C- respectivamente. C+ em **A** e **B** foram 1 μ g de fibronectina e em **C** e **D**, 1 μ g de colágeno I. C- foram BSA 1%. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e as médias dos valores de fluorescência obtidos estão representadas como valores de porcentagem dos controles positivos. As barras de erro representam valores absolutos da variação encontrada dentro de cada concentração. A análise pelo método de ANOVA exclui os dados obtidos como resultado de oscilações aleatórias. Nos experimentos **A** e **B**, ANOVA distingue apenas duas classes: controles positivos e negativos e nesta última, todos os outros pontos se incluem.

Os ensaios de adesão celular promovida pela rPBC demonstram que a proteína interage positivamente com células das linhagens MDA-MB-231 e K-562 $\alpha_2\beta_1$, contrastando com os resultados obtidos com células HeLa e TK. Este efeito de adesão preferencial demonstra a seletividade da rPBC em se ligar a componentes de superfície celular presentes em certos tipos de células, não interagindo com outros que não os possuem. Nota-se também que a adesão é mais pronunciada conforme a quantidade de rPBC depositada, ou seja, sua concentração durante o “*coating*”. Isto corrobora para que a o número de moléculas da rPBC depositada seja responsável pela quantidade de células aderidas, cujo número de possíveis sítios de interação deve ser relativamente constante por célula. Reforçando ainda mais que a rPBC seja a responsável pela adesão verificada, nota-se que todos os valores obtidos para MDA-MB-231 e K-562 $\alpha_2\beta_1$, são razoavelmente superiores aos seus controles negativos. Além disto, no caso de linhagens cuja interação não foi observada (HeLa e TK), todos os valores encontrados na presença da rPBC são comparáveis aos controles negativos, ou seja, para estes tipos celulares parece não haver graus de interação intermediários, indicando a ausência de sítios de ligação.

Uma vez definidas linhagens celulares alvos através dos ensaios acima descritos, a linhagem K-562 foi escolhida para exames mais detalhados sobre a natureza desta interação. A escolha foi baseada na facilidade de cultivo destas células e, por não se tratar de linhagem de cultivo aderido, a fim de excluir artifícios relacionados com o tratamento com tripsina.

4.5.2 - Ensaio de inibição de interação de células da linhagem K-562 $\alpha_2\beta_1$ com o colágeno I

A identificação de um possível receptor para a rPBC seria um dos parâmetros importantes a se definir para uma maior compreensão da interação da proteína com células alvo. Tendo isto em mente, um dos candidatos mais prontamente acessíveis seria a integrina $\alpha_2\beta_1$, cuja expressão é realizada pela linhagem K-562 $\alpha_2\beta_1$, uma das linhagens cujo exame de adesão prova interagir com a rPBC. Isto poderia ser demonstrado facilmente uma vez que a linhagem não modificada K-562, que não produz integrinas $\alpha_2\beta_1$ [99] adere a moléculas de fibronectina, mas não colágeno e no caso da K-562 $\alpha_2\beta_1$, a adesão ao colágeno é mediada pela integrina. Sendo assim, células K-562 $\alpha_2\beta_1$ marcadas com o fluoróforo foram incubadas com uma diluição seriada da rPBC, visando bloquear os sítios de interação utilizados pela linhagem celular. As células assim tratadas foram então submetidas a um ensaio de adesão promovida pelo colágeno (Figura 4.11 A). Caso a rPBC se ligasse aos mesmos receptores utilizados na interação com o colágeno I, ou seja, a integrinas $\alpha_2\beta_1$, os sítios de ligação ficariam bloqueados, impossibilitando, ou ao menos reduzindo, sua interação com o colágeno I de uma forma proporcional à concentração de rPBC. Ainda, caso o receptor para a rPBC seja a integrina $\alpha_2\beta_1$, células K-562 sem a transfecção $\alpha_2\beta_1$ não poderiam interagir com a rPBC. Desta forma, como uma contraprova, um ensaio de promoção de adesão da rPBC com células K-562 foi realizado (Figura 4.11 B). A interpretação dos dados obtidos corrobora para que o receptor da rPBC não seja a integrina $\alpha_2\beta_1$, mas alguma outra molécula ou moléculas presente na superfície das células.

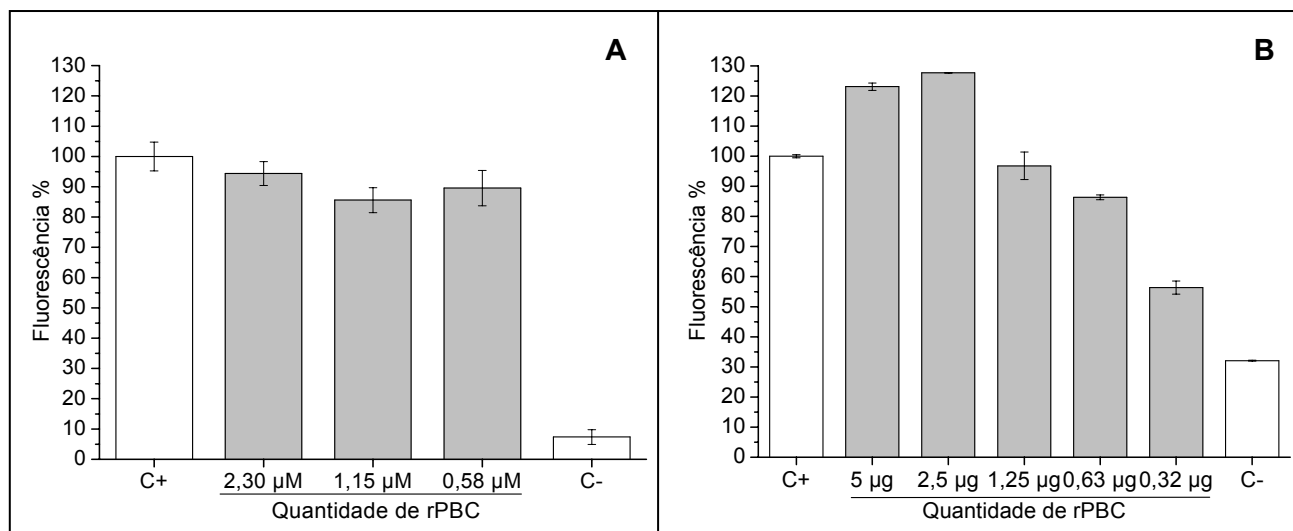


Figura 4.11 - Ensaio de inibição da adesão de células K-562 $\alpha_2\beta_1$ ao colágeno promovida pela rPBC. A) Células K-562 $\alpha_2\beta_1$ marcadas com CMFDA foram incubadas com uma diluição seriadas de rPBC (10 μ g a 2,30 μ M, 5 μ g a 1,15 μ M e 2,5 μ g a 0,58 μ M) e depositadas em poços de microplaca previamente recoberta com 1 μ g de colágeno I e submetidas a medidas da fluorescência resultante da lise de células aderidas (barras cinza). Células não incubadas com a rPBC foram usadas nos controles positivos e negativos. **B)** Células K-562 (não transfectadas com $\alpha_2\beta_1$) foram depositadas em poços de microplaca previamente recoberta por rPBC em uma diluição seriada. A adesão foi medida pela leitura da fluorescência resultante da lise das células aderidas (barras cinza). Controles positivos foram 1 μ g de fibronectina e negativos, BSA 1%. Todos os experimentos foram feitos em triplicatas e representados por suas médias. Barras de erros representam flutuações encontradas em cada ponto medido, em valores absolutos. A análise por ANOVA indica que os valores experimentais possuem significância e que em **A**, todas as medidas exceto o controle negativo se encontram dentro de uma mesma classe.

4.5.3 - Inibição da adesão por competição com açúcares

Outra informação de interesse a ser averiguada foi a respeito da natureza da interação das células com a rPBC. A adesão proporcionada pela proteína pode ser de origem diversa ou pelas propriedades lectínicas da rPBC. Um experimento para checar tais hipóteses foi feito pela da inibição da adesão provocada pela rPBC através da ocupação de seus sítios de ligação a carboidratos. Se a atividade lectínica é a responsável direta pela adesão, ou seja, a rPBC interage com glicoconjugados presentes na superfície celular, é razoável esperar que a proteína complexada com açúcares em

solução seja incapaz de se ligar às células e provocar a adesão. Desta forma, diluições seriadas da proteína foram incubadas com D-Gal e Lactose antes e durante a imobilização nos poços de microplacas. Células K-562 $\alpha_2\beta_1$ marcadas foram adicionadas sobre estas microplacas recobertas por rPBC com seus sítios de ligação ocupados por ligantes e suas adesões comparadas com a adesão desempenhada por proteína na ausência do ligante, através da fluorescência das células aderidas lisadas. Os dados revelam que a competição com D-Galactose pelos sítios ligantes da rPBC diminuiu a adesão promovida pela molécula (Figura 4.12), sugerindo que a interação da rPBC com as células deve ocorrer através de suas características lectínicas.

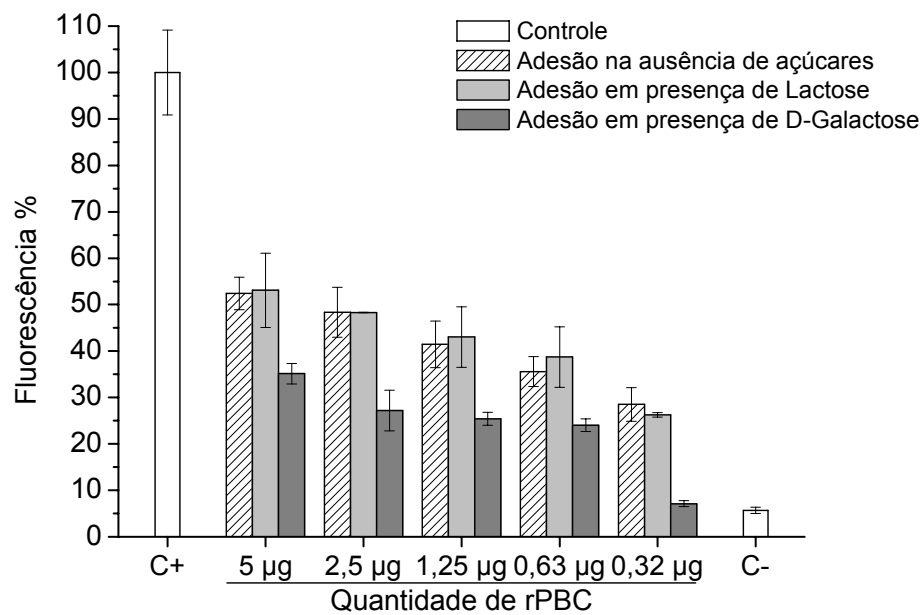


Figura 4.12 - Ensaio de inibição da adesão de células da linhagem K-562 promovida pela rPBC por competição pelos sítios de ligação a carboidratos. Diluições seriadas da rPBC foram incubadas com Lactose (em cinza claro) e D-Galactose (em cinza escuro) foram utilizadas para recobrir poços de microplacas. Células K-562 $\alpha_2\beta_1$ foram submetidas a exame de promoção de adesão sob estas condições. Amostras não incubadas com carboidratos foram utilizadas como parâmetro de adesão normal na ausência de ligantes. Controles positivos foram 1 µg de colágeno I, negativos BSA 1%. Todos os experimentos foram realizados como triplicata e representados como valores médios de cada conjunto. Barras de erro expressam valores absolutos de variância. Os valores obtidos são significantes pelo exame de ANOVA, pelo qual medidas de adesão promovida pela rPBC e rPBC incubada com Lactose caem dentro das mesmas classes para cada concentração de proteína utilizada, e amostras incubadas com Galactose representam outra classe.

Para se investigar a interação da rPBC com células de mamífero, mediada pelas suas características lectínicas, amostras da proteína foram incubadas com D-Galactose, glicano que inibe suas propriedades aglutinativas e Lactose, outro açúcar ligante visto que interfere na aglutinação da proteína nativa. Como previsto, a incubação com D-Gal inibe, ainda que parcialmente, a adesão celular promovida pela rPBC (Figura 4.12) e isto pode ser compreendido de diferentes formas. Os receptores de superfície presentes nas células K-562 podem representar estruturas que possuem características mais construtivas do que a D-Gal frente aos sítios de ligação da rPBC. Em outras palavras, a afinidade da rPBC pelos receptores das células K-562 pode ser maior do que a afinidade por D-Gal em solução. Outra hipótese seria que a rPBC possui sítios com diferentes afinidades à D-Gal. Desta forma, o bloqueio com D-Gal poderia de fato ser efetivo a um destes, mas não o suficiente para bloquear o outro, deixando-o disponível para interagir com as células. Tais situações já foram encontradas para outras RIPs [100-105] e de qualquer forma, as hipóteses não são reciprocamente excludentes sendo que ambas podem contribuir para os resultados observados.

Embora Lactose seja um dos ligantes para a pulchellina nativa, esta parece não inibir a adesão promovida pela rPBC. Este resultado demonstra que a rPBC não exhibe exatamente as mesmas propriedades da pulchellina. Isto poderia ser explicado pela presença de isoformas nas preparações da proteína nativa, um fato muito comum entre outras RIPs, sendo a rPBC correlacionada a apenas uma destas isoformas. Além disto, a proteína nativa possui modificações pós-traducionais que a rPBC não possui e a ausência de tais modificações pode afetar a sua estrutura e atividade.

4.5.4 - Visualização da interação da rPBC com células K-562

Uma vez confirmada a interação da rPBC com células K-562 através de suas características lectínicas, uma propriedade interessante a se investigar é a possibilidade de endocitose da proteína. Para se examinar este evento, a proteína foi marcada com o fluoróforo Alexa Fluor 488, que se liga covalentemente às aminas primárias presentes na estrutura protéica e emite fluorescência verde quando excitado na faixa dos 500 nm (luz azul), sendo assim identificada por microscopia de fluorescência. Assim, células K-562 foram incubadas com a rPBC previamente marcada e fixadas em lâminas de microscopia óptica para sua visualização sob microscopia de fluorescência. Duas hipóteses foram levantadas sobre a interação da rPBC com as células: a proteína poderia se ligar a resíduos de glicanos expostos na superfície celular e lá permanecer como uma “camada protéica ao redor das células” ou, além disto a rPBC poderia ser endocitada e assim ser também encontrada no interior das células. Imagens foram registradas com o auxílio de uma câmera fotográfica digital acoplada diretamente sobre a ocular de um microscópio de fluorescência Nikon Eclipse E400. As imagens evidenciam a presença da proteína ao redor e também no interior das células (Figura 4.13 B e D). Como contraprova da seletividade da rPBC, a proteína marcada foi submetida ao ensaio com células HeLa propagadas sobre lamínulas, as quais, como esperado, não exibiram a marcação fluorescente (dados não mostrados). Como controle negativo, amostras da proteína marcada foram desnaturadas por aquecimento e submetidas ao mesmo processo e não demonstraram sinal de fluorescência quando analisadas. Ensaio na presença do ligante D-Gal em solução não revelaram diferenças significativas em relação ao experimento sem o açúcar. Ainda, todos os experimentos foram repetidos utilizando-se a pulchellina nativa marcada com o mesmo fluoróforo. Os ensaios com células K-562

revelaram a mesma distribuição da proteína nativa marcada referente à rPBC, entretanto, ensaios com a linhagem HeLa indicaram que, diferente da rPBC, a pulchellina nativa interage com esta linhagem sendo encontrada tanto na superfície destas células como no seu interior (dados não mostrados). Isto reflete novamente as diferenças entre a rPBC e a proteína nativa, quer seja pela ausência de modificações pós-traducionais (glicosilações, por exemplo), correlação com alguma das isoformas presentes no preparado da proteína nativa, ou pela própria ausência da cadeia A em sua estrutura.

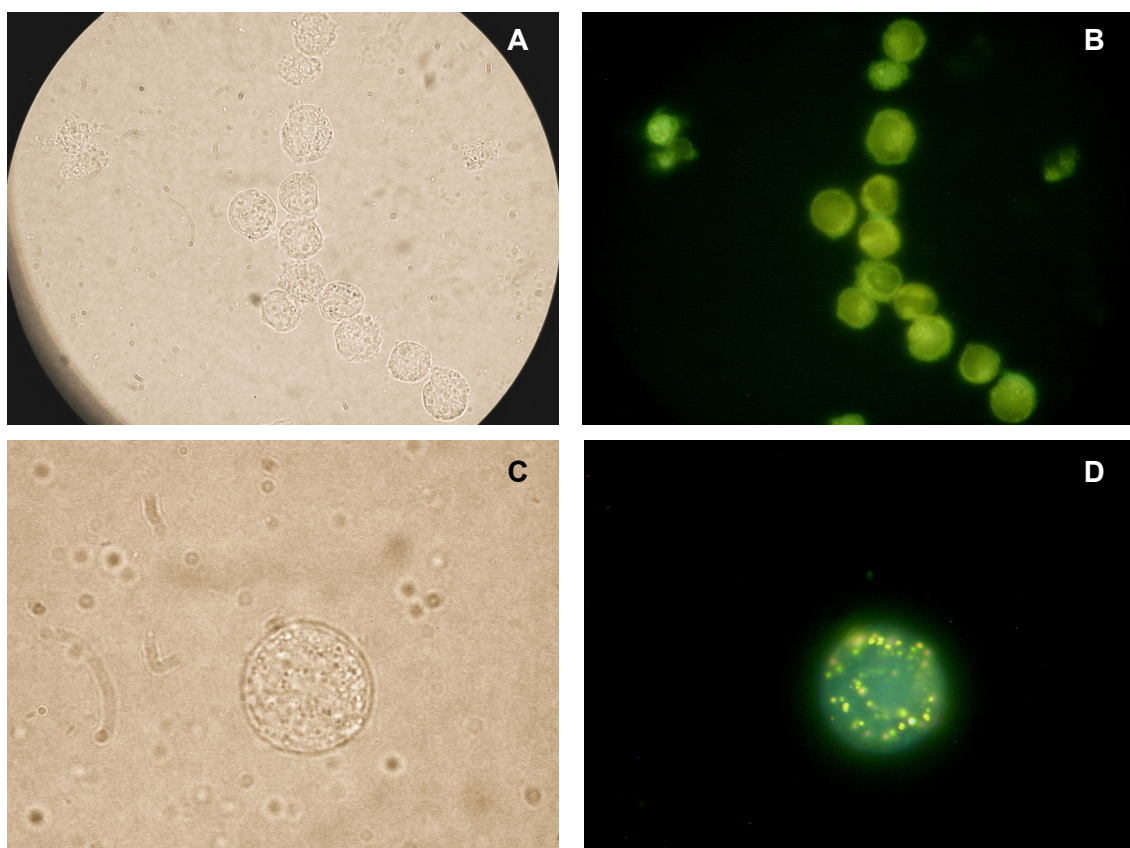


Figura 4.13 - Microscopia de fluorescência da interação entre rPBC marcada e células K-562. Em **A** e **B**, visão panorâmica sob aumento de 400X em microscopia óptica normal de transmitância em campo claro e microscopia de fluorescência sob excitação em 500 nm, respectivamente; Em **C** e **D**, detalhamento de uma única célula sob aumento de 1000X respectivamente em microscopia óptica convencional e de fluorescência, evidenciando a entrada da proteína marcada. Exames na presença de D-Gal não revelaram diferenças significativas. A pulchellina nativa demonstrou a mesma distribuição e diferente da rPBC, foi detectada em células da linhagem HeLa (dados não mostrados).

Os resultados demonstram a proteína recobrando a superfície da célula e no seu interior como uma série de pequenos grânulos (Figura 4.13 D), sugerindo que ela seja endocitada através de vesículas de endocitose. Estes dados reforçam que a rPBC deve ser endocitada por um mecanismo igual, ou muito semelhante ao descrito para outras RIPs, através de endossomos. Nota-se também que há certo acúmulo da rPBC em uma certa região no interior das células (Figura 4.13 B). O mecanismo descrito para outras RIPs, resumidamente, descreve a interiorização da proteína por endossomos [55-60], os quais se fundem ao aparelho de Golgi [61], resultando no seu acúmulo nesta organela. Em seguida, ocorre um transporte retrógrado do Golgi para o retículo endoplasmático [62,70], onde a toxina é “confundida” com uma molécula mal enovelada e então conduzida ao citoplasma para sua degradação [69, 74-76], escapando desta devido ao seu baixo conteúdo em lisina [76, 77] e finalmente exercendo sua função catalítica sobre os ribossomos [14-21].

4.5.5 - Localização intracelular da rPBC em células K-562 por microscopia de fluorescência

Visto que a entrada da rPBC parece ser semelhante à descrita para outras RIPs [74-77], a rota de intoxicação utilizada por este grupo de proteínas deveria ser compartilhada pela pulchellina e rPBC, ou pelo menos até certo ponto, tendo-se em mente indícios de que a cadeia A tenha que ser separada da B no retículo endoplasmático para que exerça sua ação tóxica. Além disto, o mecanismo que transloca a toxina do retículo para o citosol (ERAD) parece ser desempenhado pelo desenovelamento da cadeia A e não da B [76, 77]. Assim, um bom candidato para se relacionar a rota de entrada da rPBC com a descrita para outras RIPs, seria o ponto em

que a proteína se acumula no complexo de Golgi [61]. Isto poderia ser feito através de co-localização de uma sonda específica para algum componente exclusivo da organela, com a própria rPBC marcada. Assim sendo, a rPBC foi marcada com um fluoróforo que exibe fluorescência azul quando excitado em 350 nm, para ser utilizado simultaneamente com uma imuno-coloração específica para uma proteína específica do complexo de Golgi [106], exibindo fluorescência verde quando excitada em 500 nm. A pulchellina nativa também foi marcada com Alexa Fluor 350, a fim de comparar sua co-localização com a da rPBC. Individualmente, cada uma das três colorações funcionaram a contento, entretanto, a rPBC não pôde ser localizada após a dupla coloração, diferente da proteína nativa. Tal diferença de comportamento vem novamente ressaltar que a rPBC não compartilha exatamente das mesmas características da proteína nativa. Este tipo de “vazamento” da proteína endocitada já foi relatado para a ricina, e creditado à utilização de Triton [57], o mesmo detergente utilizado na permeabilização das células segundo o protocolo de imuno-coloração do aparelho de Golgi. A dupla coloração da pulchellina nativa e do complexo de Golgi revela uma boa co-localização, confirmando o acúmulo da proteína nativa no aparelho de Golgi (Figura 4.14 A, B e C), e desta forma, uma maneira indireta de se estimar a localização da rPBC poderia ser feita com a co-localização da rPBC com a pulchellina nativa. Assim, a rPBC marcada com Alexa Fluor 350 foi misturada com pulchellina nativa marcada com Alexa Fluor 488 e esta mistura foi incubada com células K-562. Após a incubação, as células foram utilizadas para exame de microscopia de fluorescência (Figura 4.14 D, E e F). A análise dos resultados indica que há boa co-localização entre uma região de acúmulo da rPBC dentro das células, com a localização da pulchellina nativa. Uma vez que a região foi demonstrada co-localizar a pulchellina nativa com o complexo de Golgi, é razoável

supor que a rPBC também se acumule nesta organela, compartilhando pelo menos até este estágio a rota de entrada descrita para outras RIPs [74-77].

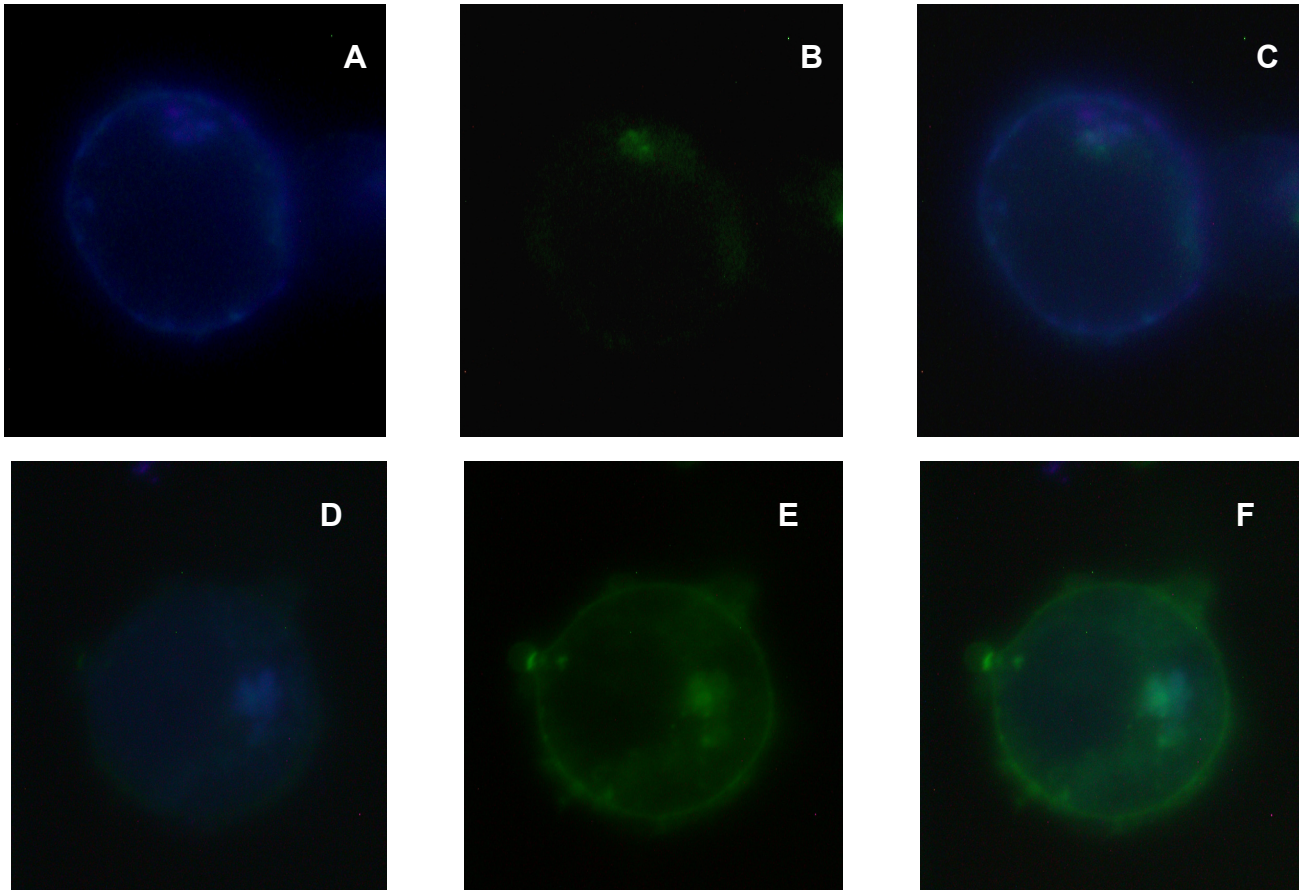
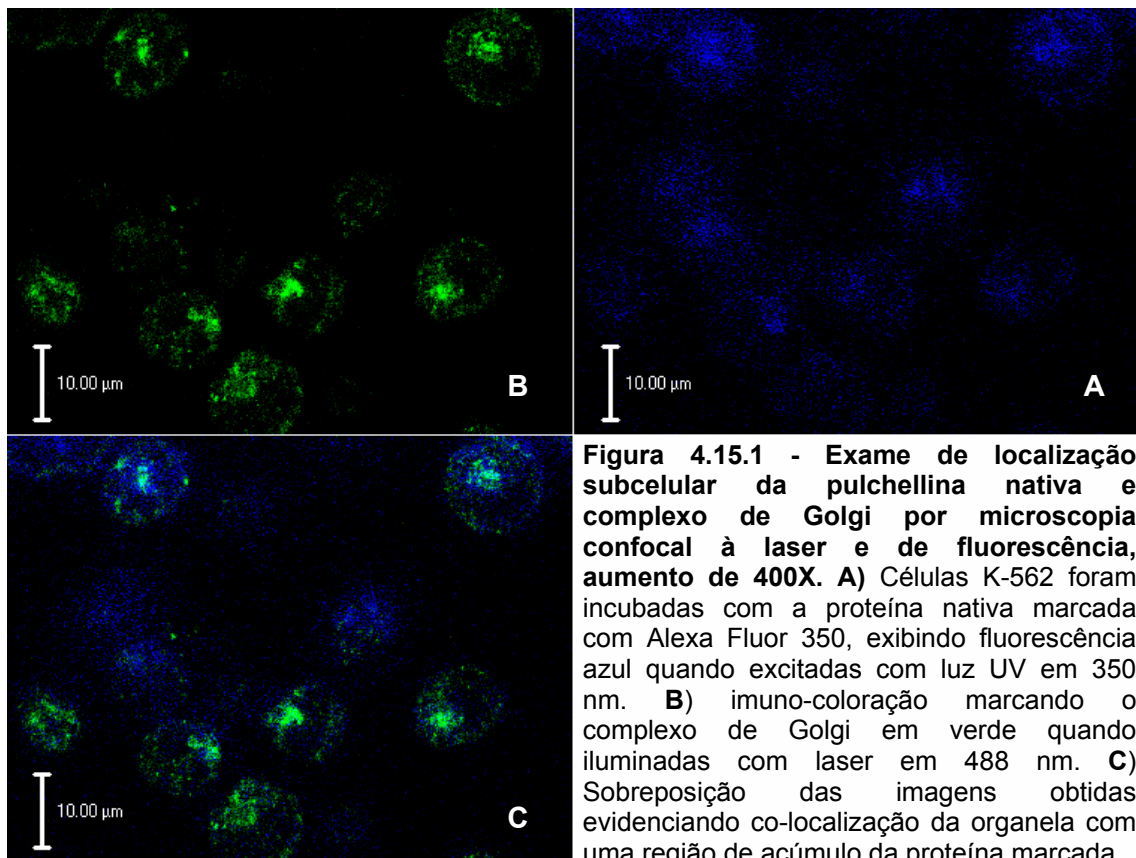
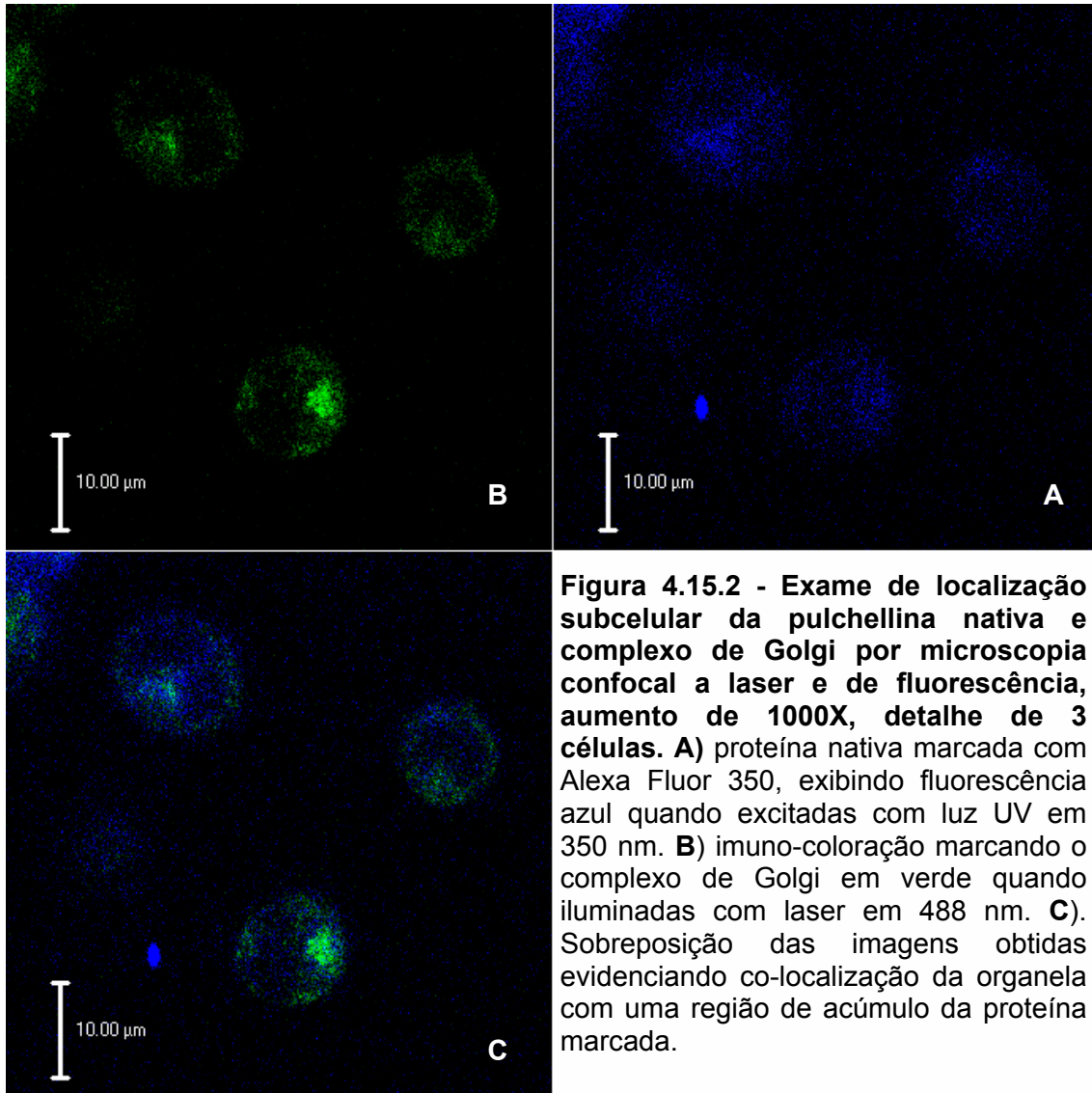


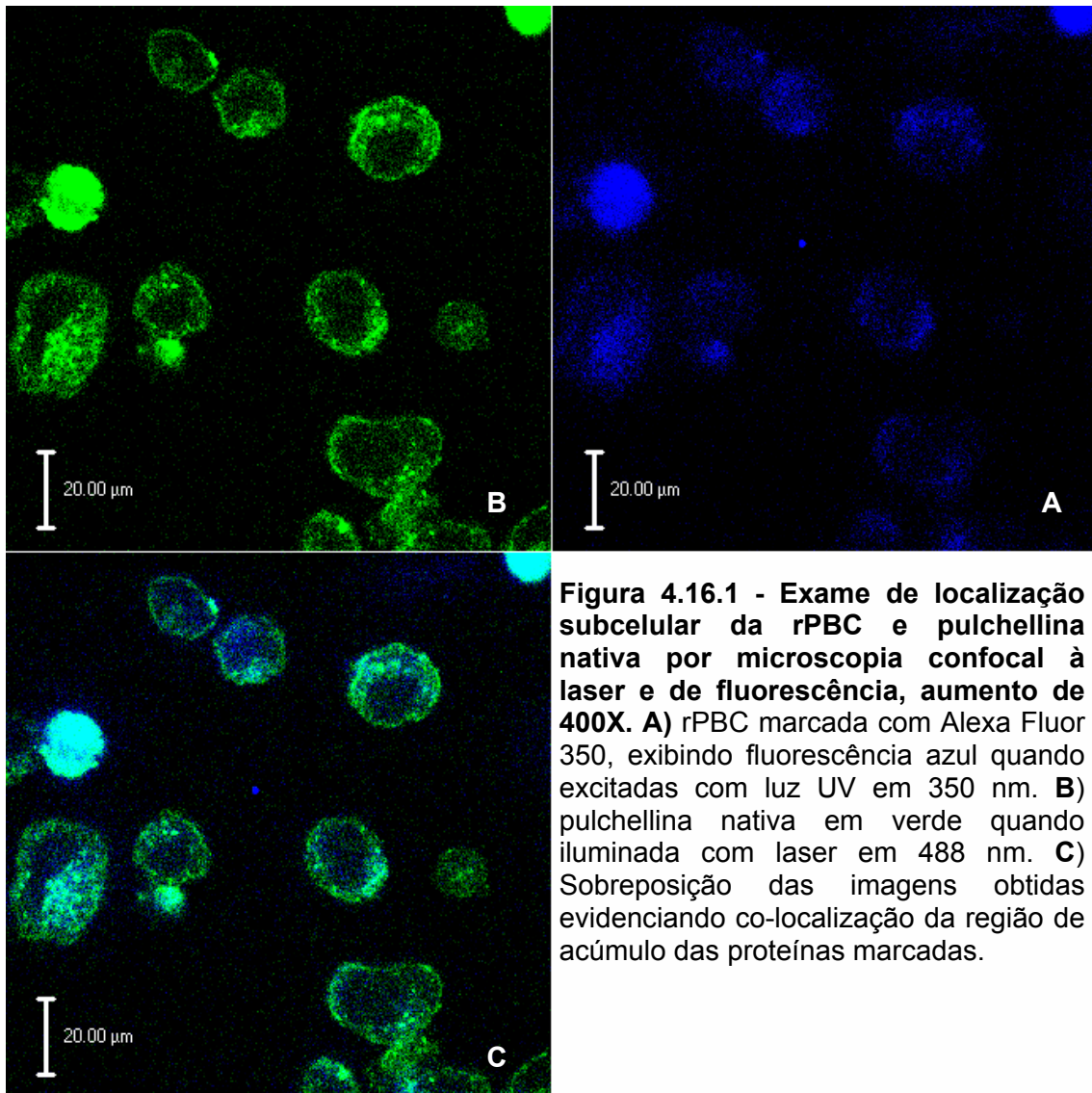
Figura 4.14 - Microscopia de fluorescência da localização subcelular da pulchellina nativa e rPBC sobre o complexo de Golgi de células K-562. A, B e C) Células K-562 foram incubadas com a proteína nativa marcada com Alexa Fluor 350, exibindo fluorescência azul quando excitadas em 350 nm (A) e em seguida submetidas à imuno-coloração marcando o complexo de Golgi com fluoróforo verde quando iluminadas em 500 nm (B). A sobreposição das imagens obtidas (C) evidencia boa co-localização da organela com uma região de acúmulo da proteína marcada; **D, E e F)** Células K-562 foram incubadas com uma mistura equimolar de rPBC marcada com Alexa Fluor 350, emissão azul sob 350 nm (D) e pulchellina nativa marcada com Alexa Fluor 488, emissão verde sob 500 nm (E). A sobreposição das imagens indica boa co-localização de uma região de acúmulo intracelular das proteínas, região que para a proteína nativa co-localiza o complexo de Golgi, e que, portanto deve se tratar da mesma organela para a rPBC.

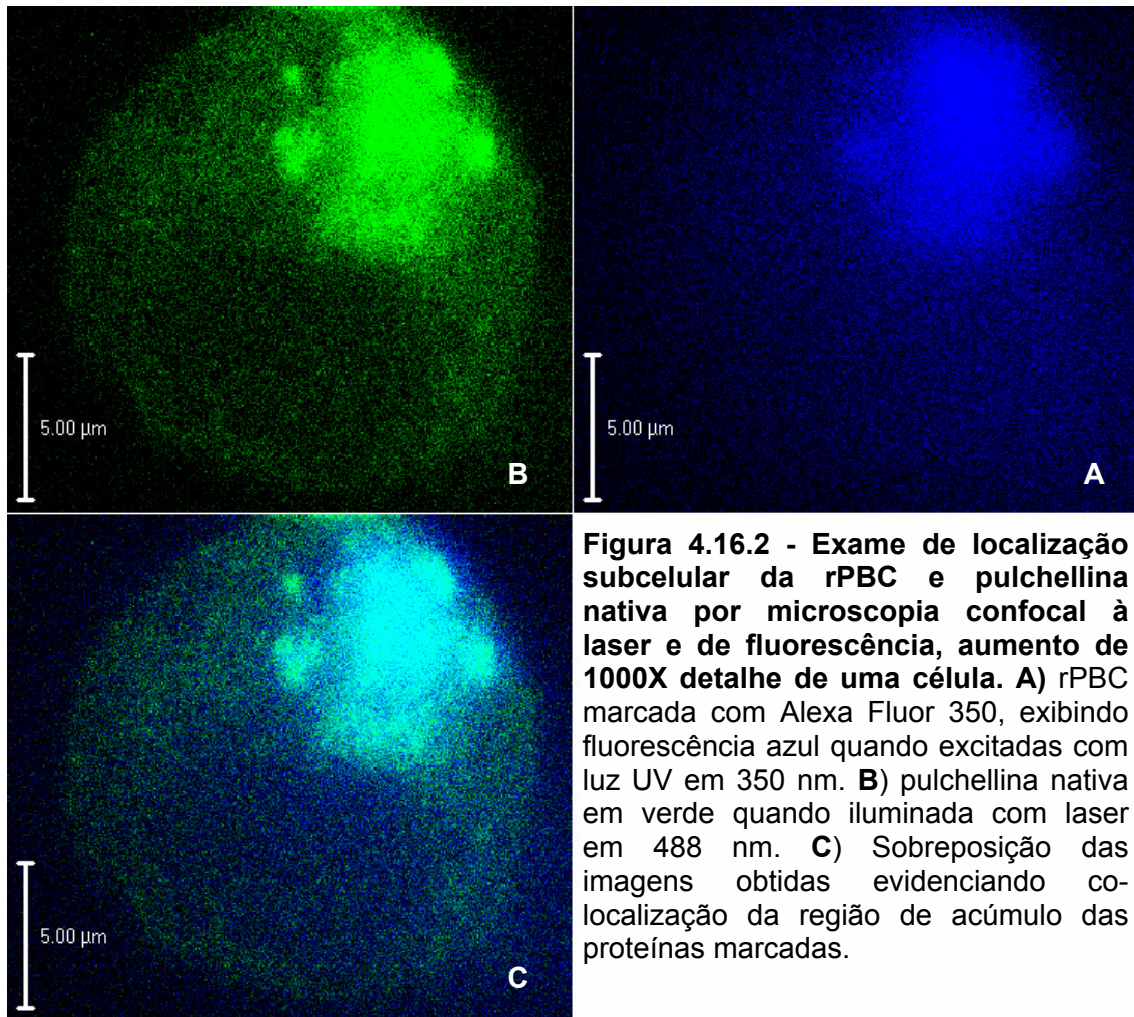
4.5.6 - Localização intracelular da rPBC em células K-562 por microscopia confocal

O procedimento utilizado anteriormente para exames de localização subcelular da rPBC, através de sua co-localização com a pulchellina nativa e da co-localização da pulchellina nativa com o complexo de Golgi de células K-562 foi repetido, desta vez para a observação em microscopia confocal a laser. As lâminas foram submetidas à varredura de laser em 488 nm e luz UV em 350 nm. Devido às limitações do equipamento, não foi possível a varredura de laser em 350 nm. Ainda assim, as imagens obtidas possuem melhor resolução e indicam a correlação da localização de um acúmulo da rPBC e da pulchellina nativa no aparelho de Golgi (Figuras 4.15 e 4.16).









4.5.7 - Etapas de endocitose discriminativas entre rPBC e pulchellina nativa em células K-562 vivas

Ambas, rPBC e pulchellina nativa demonstram se acumular no complexo de Golgi, um compartimento comum no processo de endocitose previamente descrito para outras RIPs. Entretanto, diferenças entre o comportamento da proteína nativa e a rPBC foram registrados, salientando-se a interação com a linhagem celular HeLa, a qual não se mostrou sensível à rPBC, mas sim à pulchellina nativa. Em outro experimento, ocorreu o desaparecimento da rPBC marcada do interior das células K-562 mediante ao processo de imuno-coloração anti-Golgi, efeito não observado para a proteína nativa. Vistos a semelhança na localização subcelular e as diferenças descritas, há de se supor

que talvez a rota de entrada até o aparelho de Golgi seja idêntica para ambas as proteínas, mas que dinâmica dos efeitos que levam ao seu destino não seja exatamente igual. Pode haver preferência entre a ligação da rPBC ou proteína nativa a um dado receptor, ou receptores diferentes com graus de interação diferenciados para as moléculas. Além disto, estas diferenças podem residir nos fatores anteriormente citados como as diferenças de atividade e estrutura entre isoformas (sendo a rPBC correlacionada com apenas uma destas); a ausência de glicosilação (a glicosilação pode ser responsável por outro tipo de interação com as células [57] ou impelir modificações na estrutura protéica que culminam em atividades diferenciadas); a ausência da cadeia A (a cadeia A poderia interagir com a cadeia B modificando sua estrutura e atividade ou então ser reconhecida como outro tipo de ligante pelos receptores celulares). Uma forma de se verificar a total distinção ou não entre os eventos de ligação e endocitose das proteínas seria verificando-se a partir de uma mistura homogênea de ambas as moléculas marcadas, se as células distinguem ou não entre as duas. Caso as moléculas sejam tratadas exatamente da mesma forma, a localização de vesículas endocíticas contendo ambas as proteínas em igual proporção seria prevista. No extremo oposto, vesículas contendo somente um tipo de molécula, totalmente isentas da outra seriam observadas. Assim sendo, uma mistura equimolar da rPBC marcada com Alexa Fluor 350 com pulchellina nativa marcada com Alexa Fluor 488 foi incubada por 5 min. com células K-562. As células não fixadas foram visualizadas por microscopia de fluorescência sob os comprimentos de onda adequados. Os dados indicam a existência de vesículas contendo as proteínas tanto isoladas como misturadas (Figura 4.17).

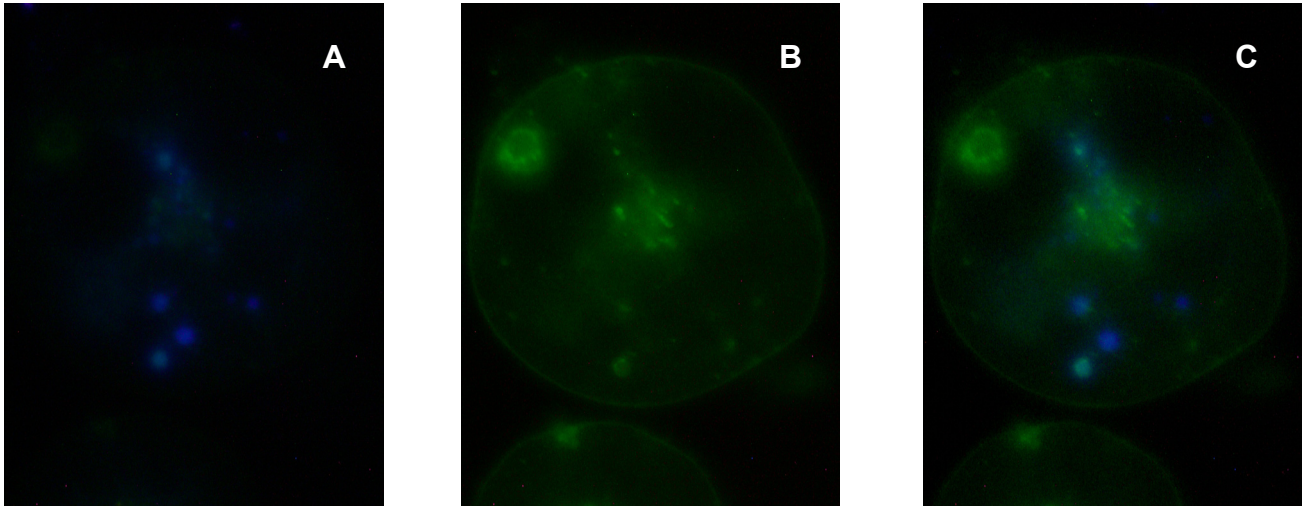


Figura 4.17 - Microscopia de fluorescência mostrando etapas iniciais de endocitose da rPBC e pulchellina nativa em células K-562 vivas. Células K-562 não fixadas foram incubadas com rPBC e pulchellina nativa e submetidas a exame de microscopia de fluorescência, aumento de 1000X. **A)** Vesículas contendo rPBC em azul sob excitação de luz UV aos 350 nm; **B)** Vesículas contendo pulchellina nativa em verde sob excitação de 500 nm; **C)** Sobreposição das duas imagens demonstrando a existência de vesículas contendo proteínas isoladas e juntas.

A observação destes resultados sugere que as proteínas sejam parcialmente discriminadas em alguma etapa de suas endocitoses, ainda que se acumulem numa mesma organela. Isto leva a uma possibilidade de explicação referente às diferenças encontradas entre a rPBC e a pulchellina nativa baseada na existência de isoformas para a proteína nativa, das quais a rPBC não se relaciona a todas. Ainda, células K-562 podem possuir um conjunto de receptores que interage diferentemente, de acordo com as respectivas subunidades lectínicas de isoformas diferentes, ou seja, com cadeias B diferentes. Alguma das diferentes formas nativas, aquela possuindo uma cadeia B relacionada com a rPBC, poderia ser incapaz de interagir com células da linhagem HeLa, da mesma forma que a mesma poderia ter sido eliminada no protocolo de imunocoloração para complexo de Golgi, remanescendo outras formas com cadeias B diferentes. Mesmo sendo esta uma hipótese interessante, trata-se de um experimento preliminar e que não considera a interferência da glicosilação, ou mesmo a interação direta com as células através da cadeia A.

4.6 - Atividade “*in vivo*” da holotoxina recomposta a partir de cadeias A e B recombinantes produzidas isoladamente

4.6.1 - Dinâmica da formação do heterodímero sob análise em SDS-PAGE

Quantidades equimolares de cada cadeia de origens recombinantes distintas foram incubadas a 4° C por 48 horas e amostras foram retiradas ao longo do tempo para a monitoração da formação do heterodímero respectivo à estrutura quaternária da pulchellina nativa. A proteína heterodimérica pôde ser observada a partir de 2 horas de incubação atingindo um máximo em 48 horas (Figura 4.18).

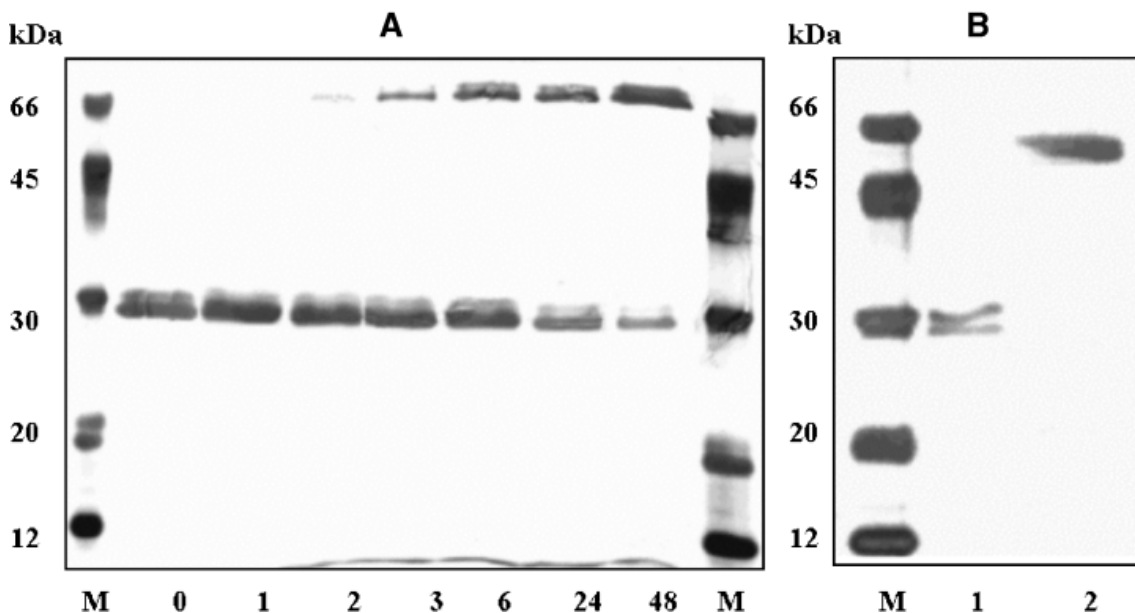


Figura 4.18 - Dinâmica da reconstituição da proteína heterodimérica. A) As cadeias A e B recombinantes foram incubadas a 4°C e amostras retiradas para análise em SDS-PAGE em condições não redutoras nos tempos de incubação indicados a cada coluna em horas. Padrões de massa molecular são indicados por M. **B)** Análise do heterodímero formado e purificado por ultrafiltração sob condições redutoras e não redutoras (colunas 1 e 2 respectivamente). Padrões de massa molecular são indicados por M. Fonte: Silva, A. L. *et al* (2005).

4.6.2 - Atividade biológica do heterodímero reconstituído

Se a cadeia B realmente exibe atividade ligante, ensaios para a determinação de dosagens letais, poderiam confirmar este fato. No caso de uma atividade tóxica ser registrada, esta seria uma prova de que o heterodímero reconstituído funciona da mesma forma que a pulchellina nativa. Para que haja ação tóxica, ambas as cadeias recombinantes necessitam desempenhar suas funções a contento, ou seja, a cadeia B precisa mediar a entrada da toxina nas células e a cadeia A abolir a síntese protéica desativando ribossomos numa taxa maior que a síntese de novos. Ambos os fragmentos gênicos das cadeias maduras clonados previamente prevêm em seus produtos de expressão, resíduos de cisteína que participam de uma ligação dissulfeto inter-cadeias presente na toxina nativa. Esta interação covalente envolve o resíduo de cisteína mais próximo ao *N*-terminal da cadeia B com o resíduo presente na região *C*-terminal da cadeia A. A análise em SDS-PAGE demonstra que a ligação inter-cadeias parece ter sido realizada como o esperado, visto que o heterodímero reconstituído se dissocia nas suas subunidades monoméricas sob condições redutoras (Figura 4.18). Assim o heterodímero reconstituído, a cadeia B, a cadeia A e a pulchellina nativa foram injetados na cavidade intraperitoneal de camundongos e suas letalidades monitoradas por 48 horas. Os dados revelam uma toxicidade do heterodímero reconstituído em uma amplitude similar à da pulchellina nativa (Figura 4.19). Isto comprova a funcionalidade não só do heterodímero, mas também, por conseqüente, de ambas as cadeias isoladas.

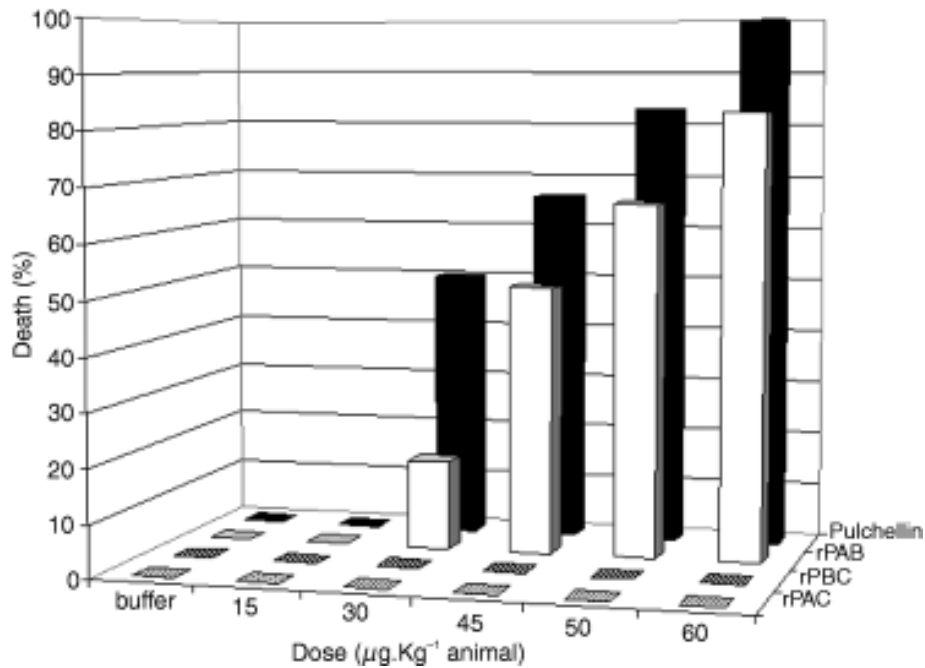


Figura 4.19 - Atividade tóxica do heterodímero reconstituído comparado com a de suas cadeias constituintes e da proteína nativa. A pulchellina nativa (barras negras), o heterodímero reconstituído (barras brancas), a cadeia B (cinza escuro) e a cadeia A (cinza claro) foram administrados intraperitonealmente em camundongos segundo diferentes dosagens por kg de animal. Amostras do tampão de cada amostra foram utilizadas como controles negativos. As injeções foram realizadas em 6 animais por grupo de dosagem. Após 48 horas a letalidade foi inferida e representada como porcentagem de animais mortos. Fonte: Silva, A. L. *et al* (2005).

O heterodímero parece possuir uma D.L. ₅₀ em torno de 50 µg/kg de animal e embora as observações indiquem uma toxicidade menor do que a da pulchellina nativa, seus valores não deixam de estar em magnitudes similares. Desta forma a atividade biológica de ambas as cadeias utilizadas no experimento ficou demonstrada. No que tange à rPBC, o experimento demonstra que:

- O renovelamento da rPBC produziu uma proteína biologicamente ativa;
- A atividade da rPBC quanto a sua função lectínica não depende totalmente de modificações pós-traducionais;
- O resíduo de cisteína na região *N*-terminal é funcional para o acoplamento oxidativo da cadeia A recombinante;
- A rPBC intermedeia a entrada da toxina nas células.

Tendo em vista estes resultados, novamente a hipótese de diferenças associadas com a presença de isoformas parece adequada para explicar a diferença entre os graus de toxicidade da pulchellina nativa comparada com o heterodímero reconstituído. A pulchellina nativa pode ser constituída por uma mistura de isoformas com cadeias B diferentes, exibindo graus diferentes de interação com células animais e assim modulando diferentes graus de toxicidade. A rPBC poderia ser correlacionada a alguma(s) desta(s), cuja toxicidade poderia não ser a maior entre as diferentes isoformas componentes da pulchellina nativa. Adicionalmente, embora a glicosilação não pareça ser pré-requisito para a sua atividade, não se pode excluir totalmente sua interferência. A glicosilação poderia contribuir como fator de interação com as células que potencializa a intoxicação pela pulchellina e/ou conferindo estabilidade à molécula. Quanto a uma possível interação da cadeia A com células animais, talvez realmente exista, entretanto esta não deve ser suficiente para mediar sua endocitose, visto a não letalidade da administração da cadeia A.

CAPÍTULO II: “Estudos Estruturais da
Camptosemina, Lectina de *Camptosema ellipticum*”

Introdução

5 - Introdução

5.1 - Distribuição de lectinas nos vegetais

O estudo de lectinas teve como marco inicial a descoberta de fatores tóxicos protéicos em extrato de *Ricinus communis* por Stillmark [1], resumidamente descritos no capítulo anterior. Ele constatou que tais fatores eram responsáveis por causar aglutinação em células sangüíneas. O termo lectina (do Latim *lectus* que significa escolher) foi utilizado pela primeira vez por Boyd (1954) [107] para enfatizar a habilidade exibida por algumas hemaglutininas em discriminar células do grupo sangüíneo ABO.

Embora numerosas lectinas de origem vegetal tenham sido estudadas em detalhes (cerca de 500 lectinas de diferentes espécies vegetais já foram descritas), seu papel fisiológico ainda permanece pouco esclarecido. Existe uma crença de que a maioria das lectinas no vegetal é dirigida contra açúcares exógenos (Galactose e Lactose, por exemplo) e que, portanto, seriam destinadas a interagir com outros organismos, seja no seu reconhecimento ou em fenômenos relacionados à defesa vegetal [108]. Lectinas que se acumulam em grandes quantidades possivelmente combinam um papel de defesa (a fitopatógenos ou herbívoros) com uma função de estocagem [109, 110]. Ainda, há a sugestão de que as lectinas vegetais também poderiam ser candidatas a desempenhar algum papel fisiológico importante dentro do corpo ou da própria célula vegetal, como mediadoras de interações proteína-carboidrato [108, 111]. Atualmente, lectinas vegetais têm aplicações que vão desde a investigação de carboidratos de superfície (particularmente em células neoplásicas ou na determinação de grupos sangüíneos), até seu uso como ferramentas úteis na caracterização de glicoproteínas [112].

Geralmente, as lectinas vegetais são distribuídas em todo o corpo do vegetal. A maior concentração, porém, é comumente encontrada em órgãos de estocagem. Outras partes da planta como folhas, caule, raízes e flores na maioria das vezes contêm somente pequenas quantidades que, por sua vez, não são necessariamente idênticas em estrutura ou especificidade de ligação a carboidratos, quando comparadas àquelas lectinas dos órgãos de estocagem [113]. A maioria das lectinas que estão sendo utilizadas e são comercialmente disponíveis são isoladas de sementes, embora as quantidades disponíveis nas sementes possam variar enormemente. Até o momento, são conhecidas aproximadamente 200 estruturas tridimensionais de lectinas vegetais, animais, de bactérias e de vírus. Destas, mais da metade são lectinas de plantas por serem facilmente obtidas, uma vez que geralmente se localizam em órgãos de reserva como sementes, tubérculos, rizomas e bulbos, com quantidades variando de 1 a 10% do conteúdo total de proteínas solúveis destes órgãos. Além disso, lectinas vegetais são convenientemente purificadas por métodos simples e eficientes como cromatografia de afinidade [108, 109, 114, 115].

5.2 - Classificação das lectinas vegetais

Peumans e Van Damme (1995) [116] classificaram as lectinas em quatro grandes grupos: as merolectinas, as hololectinas, as superlectinas e as quimerolectinas (Figura 5.1). As primeiras são proteínas de cadeia única, que apresentam um único sítio de ligação a carboidratos, como a heveína, e sendo monovalentes são desprovidas de atividade hemaglutinante e incapazes de precipitar glicoconjugados. As hololectinas apresentam dois ou mais domínios ligantes idênticos ou similares e compreendem a maioria das lectinas sendo por definição di ou multivalentes, aglutinando células e

precipitando glicoconjugados. Já as superlectinas são compostas de duas ou mais cadeias polipeptídicas, compreendendo mais de um sítio de interação com carboidrato, mas que diferente das hololectinas, possuem especificidades a diferentes grupos de carboidratos. O único representante deste grupo até então isolado é a TxLCl, superlectina isolada do bulbo de tulipas que consiste de um domínio *N*-terminal manose-específico arranjado em “*tandem*” com um domínio GalNAc-específico estruturalmente diferentes [117]. As quimerolectinas possuem, além do domínio ligante a carboidratos, outro domínio com atividade catalítica ou biológica diferente, que age independente do domínio ligante a açúcares. Neste último grupo incluem-se as lectinas com atividade catalítica como as quitinases classe I e RIPs do tipo 2, cujos sítios de ligação a carboidrato não participam da atividade catalítica. Dependendo do número de sítios de ligação a carboidratos, as quimerolectinas podem se comportar como merolectinas ou hololectinas quanto a sua capacidade hemaglutinante e de precipitação de glicoconjugados.

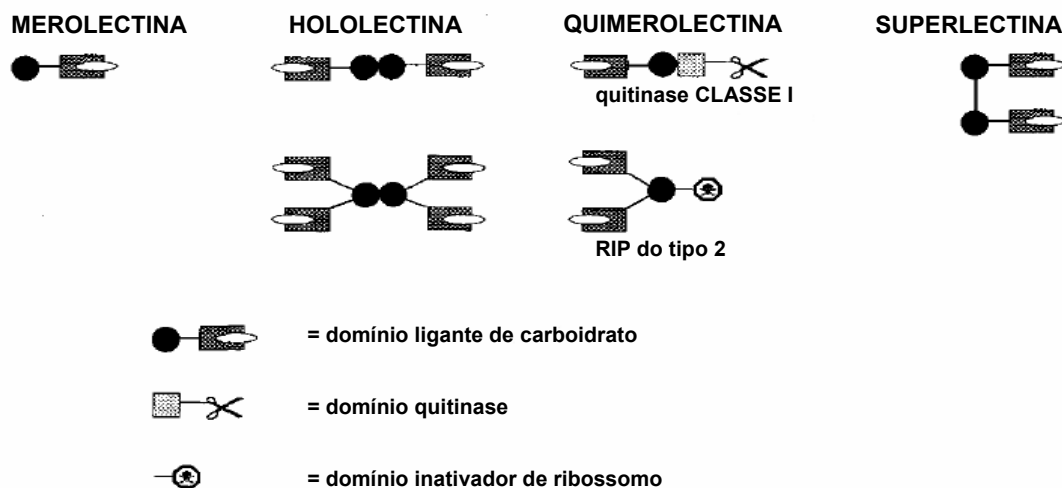


Figura 5.1 - Representação esquemática dos quatro tipos de lectinas de plantas, modificado a partir de Peumans e Van Damme (1995).

Graças aos recentes avanços tecnológicos no campo da biologia molecular, aproximadamente 300 lectinas diferentes já foram razoavelmente estudadas até hoje.

Com a introdução de técnicas como a clonagem e seqüenciamento de DNA, várias lectinas tiveram seus genes clonados, possibilitando a situá-las filogeneticamente, levando a prováveis relações evolutivas entre estas proteínas [109]. As lectinas vegetais são compreendidas em um grupo heterogêneo de proteínas classificado em função de sua capacidade de se ligar a açúcares simples bem definidos e/ou a carboidratos complexos de forma reversível. Baseados nos avanços da biologia molecular, as lectinas vegetais são hoje definidas como proteínas de plantas que possuem no mínimo um domínio não catalítico que se liga reversivelmente a um mono ou oligossacarídeo específico [108]. As lectinas vegetais não representam uma superfamília única de genes e proteínas de plantas, mas exibem uma grande diversidade estrutural. Análises bioquímicas e estruturais evidenciam que a maioria das lectinas vegetais pode ser classificada em 7 famílias de proteínas relacionadas estrutural e evolutivamente [109], a saber: amarantinas, lectinas do floema de cucurbitáceas, lectinas com domínio heveína, lectinas relacionadas à jacalina, lectinas de monocotiledôneas que ligam manose, lectinas de leguminosas e as anteriormente descritas proteínas inativadoras de ribossomos do tipo 2 [109-111].

5.3 - A família das lectinas de leguminosas

A família das lectinas de leguminosas é a melhor caracterizada dentre as 7 anteriormente citadas [109], tendo sido extensivamente estudada graças a sua presença em legumes comestíveis comuns, nos quais elas podem agir como fatores antinutricionais [118]. As lectinas de leguminosas são distintas pelo fato de conterem íons Mn^{2+} e Ca^{2+} associados a uma série de aminoácidos altamente conservados, os quais participam na ligação do carboidrato. Essas lectinas são comumente glicosiladas e

compostas por 2 ou 4 monômeros unidos por ligações não covalentes, levando a uma molécula funcional com múltiplos sítios de ligação a carboidrato [118].

Os representantes das lectinas de leguminosa encontram-se naturalmente em estruturas quaternárias diméricas e tetraméricas, sendo que os monômeros componentes destas associações são altamente conservados em estrutura secundária e terciária. Suas estruturas terciárias são tão características que uma classe de enovelamento própria, o enovelamento das lectinas de leguminosas, já foi padronizado [119]. O monômero de lectinas de leguminosas é composto por 3 folhas- β de fitas antiparalelas unidas por uma série de “*loops*”, organizadas em um rocambole- β . As duas maiores folhas- β formam um sanduíche no qual a folha maior composta por 6 fitas antiparalelas é geralmente denominada de folha- β das costas (“*back β -sheet*”) e a outra folha de folha- β frontal (“*front β -sheet*”). Este sanduíche é levemente mais aberto em uma das extremidades onde se encaixa a terceira e menor folha- β (5 fitas β antiparalelas), perpendicular à folha das costas e compartilhando fitas- β retorcidas com a folha- β das costas (Figura 5.2) [120-122]. O principal núcleo hidrofóbico do monômero localiza-se entre as folhas- β das costas e frontal. Não há estruturas do tipo α -hélice e cerca de 50 % dos resíduos do monômero estão em regiões de “*loops*”. Um destes “*loops*” (um “ Ω -*loop*” contendo um resíduo conservado de glicina do sítio de ligação a monossacarídeo) se dobra sobre a folha- β frontal, resultando num segundo núcleo hidrofóbico entre a folha- β frontal e este “*loop*”.

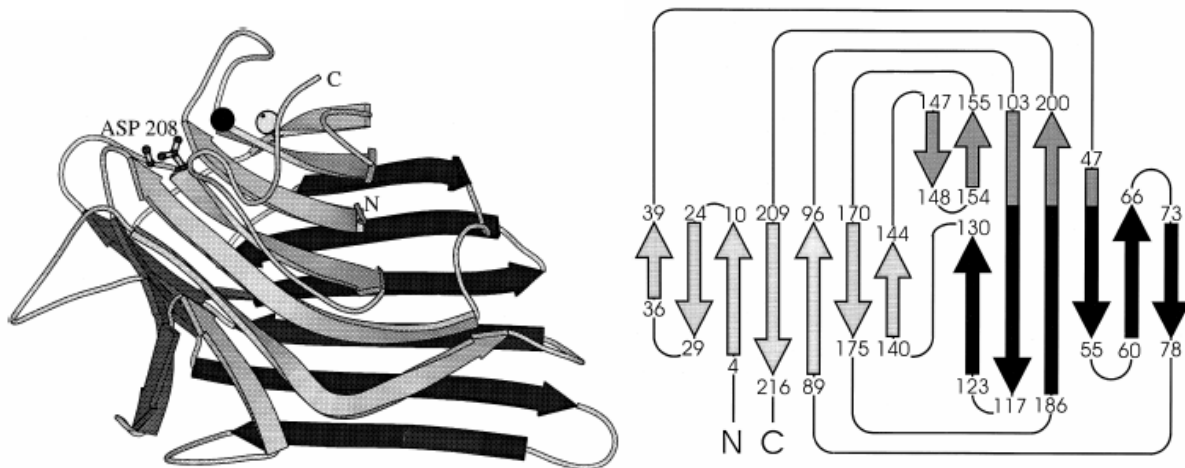


Figura 5.2 - Representações esquemáticas da estrutura do monômero de lectinas de leguminosas baseada no monômero da concanavalina A. À esquerda representação tridimensional em diagrama de estruturas secundárias. O resíduo *cis*-Asp208 está indicado e os íons de manganês e cálcio estão representados por esferas negra e cinza respectivamente. A folha- β das costas de 6 fitas antiparalelas está em negro, a folha- β frontal de 7 fitas em cinza claro e a menor folha- β de 5 fitas em cinza escuro. À direita, diagrama topológico do enovelamento das lectinas de leguminosas. A coloração de fitas obedece ao mesmo esquema e os números são referentes aos resíduos da concanavalina A. Modificado a partir de Loris *et al* (1998).

A atividade de ligação a carboidratos das lectinas de leguminosas depende da presença simultânea de íons de metais de transição e cálcio. A ligação destes íons foi originalmente descrita para a concanavalina A (ConA) e se demonstra altamente conservada entre outras lectinas de leguminosas. Na ConA, os dois íons estão interligados por dois resíduos de aspartato e ambos os metais possuem quatro ligações com a proteína e duas moléculas de água ligadas. Uma das moléculas de água ligada ao íon cálcio forma uma ponte com a carbonila de um resíduo de aspartato (Asp208 na ConA) que é precedida por uma ligação *cis*-peptídica (Figura 5.3 A). As interações essenciais com carboidratos envolvem pontes de hidrogênio com três resíduos extremamente conservados: Asp208 que é precedido pela ligação *cis*-peptídica e mantido pela interação com o íon cálcio via molécula de água, Asn14 que se mantém posicionado graças a uma interação direta com o íon cálcio e o NH da ligação peptídica

da Arg228 (que na maioria das lectinas de leguminosas é uma glicina) que se mantém coordenada pela interação com o íon cálcio através da molécula de água (Figura 5.3 B). Outras interações essenciais envolvem interações de van der Waals entre resíduos aromáticos (Tyr12 na ConA, mas frequentemente Phe e em alguns casos Leu ou Cys) e o anel do sacarídeo. Outras interações envolvem um segmento do “loop” que se dobra sobre a folha- β frontal (Thr97-Glu102 na ConA) [120].

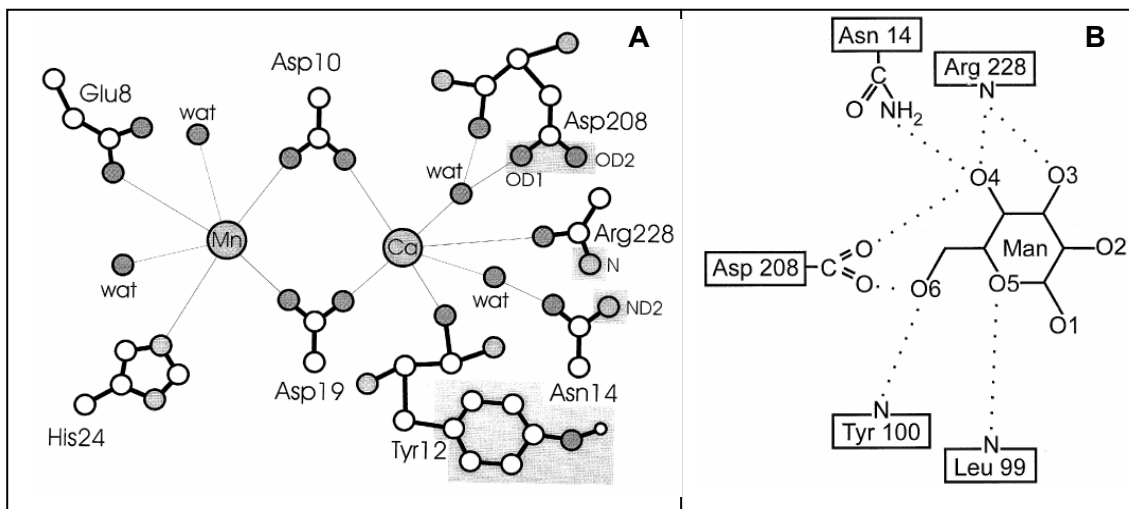


Figura 5.3 - Representações esquemáticas da ligação de íons e carboidratos à lectinas de leguminosas. A) Representação do sítio de ligação duplo da ConA. Átomo de carbono em branco, nitrogênio em cinza claro e oxigênio em cinza escuro. Os dois íons então indicados e grupos funcionais essenciais para ligação de monossacarídeos estão destacados com fundo cinza. Moléculas de água estão indicadas (wat). **B)** Representação do sítio de ligação a monossacarídeos da ConA. Diagrama esquemático da ligação de manose (Man) à ConA. Fonte: Loris *et al* (1998).

As lectinas de leguminosas tetraméricas não possuem simetria radial (Figura 5.4), significando que as interações entre seus monômeros não são iguais. Estas geralmente possuem dois planos de simetria e são consideradas dímeros de dímeros [122]. Os tipos de interações encontradas nestas lectinas podem ser diferenciados com base na orientação e posicionamento relativo entre suas folhas- β das costas, e consequentemente, de seus monômeros. Os tipos de interface dimérica das lectinas oligoméricas podem ser classificados em canônica tipo-II, X1, X2, X3 e X4, além de uma interface não usual verificada em PNA, que decorrente disto possui apenas um

plano de simetria [119]. A interface de interação chamada canônica tipo-II [123] é a mais comumente encontrada entre monômeros de lectinas de leguminosas oligoméricas e foi inicialmente observada no oligômero da concanavalina A [124]. Este tipo de interface envolve uma aproximação lado a lado entre os eixos perpendiculares às folhas das costas de cada monômero, de forma que suas folhas das costas estejam no mesmo plano e formem uma folha contínua de 12 fitas β (figuras 5.4. e 5.5)

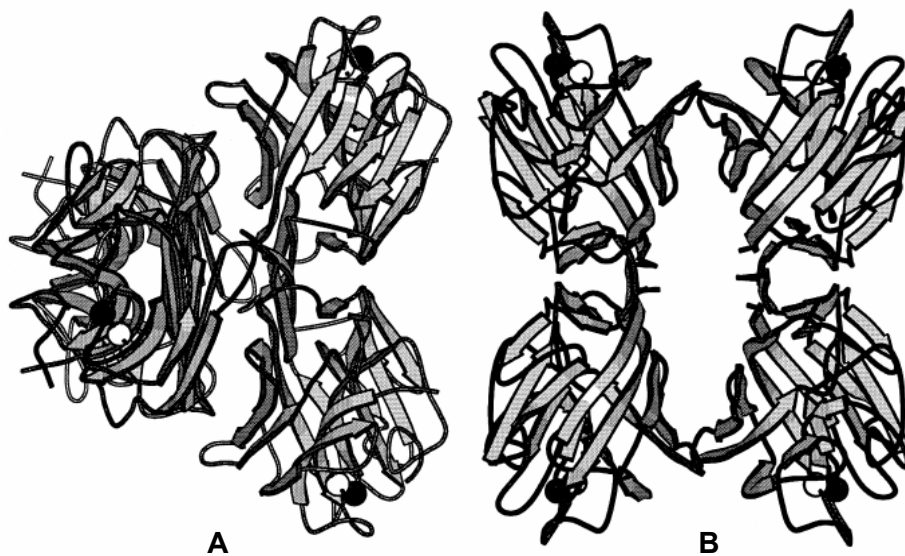


Figura 5.4 - Comparação entre os tetrâmeros formados pela concanavalina A (A) e a aglutinina de grão de soja (B). Ambos os tetrâmeros consistem de dois dímeros canônicos. Modificado a partir de Loris *et al* (1998).

Diferentes formas cristalográficas da ConA e a estrutura quase idêntica da lectina de *Canavalia brasiliensis* (substituição de dois resíduos) demonstram que a estrutura tetramérica de lectinas de leguminosas pode oscilar em alguma extensão [125-128]. Os dois dímeros canônicos podem rotacionar em muitos graus um em relação ao outro e demonstrar até pequenos graus de translação relativa entre os dímeros. Uma pequena rotação relativa dos monômeros nos dímeros canônicos foi também observada, sugerindo que o tetrâmero da ConA é uma estrutura dinâmica em solução [120].

Além das interações do tipo canônica, existem outros tipos de interface dimérica entre monômeros de lectinas de leguminosas (interfaces X1, X2, X3 e X4), envolvendo

diferentes tipos de interações entre as folhas- β das costas nas interfaces diméricas [119] (Figura 5.5).

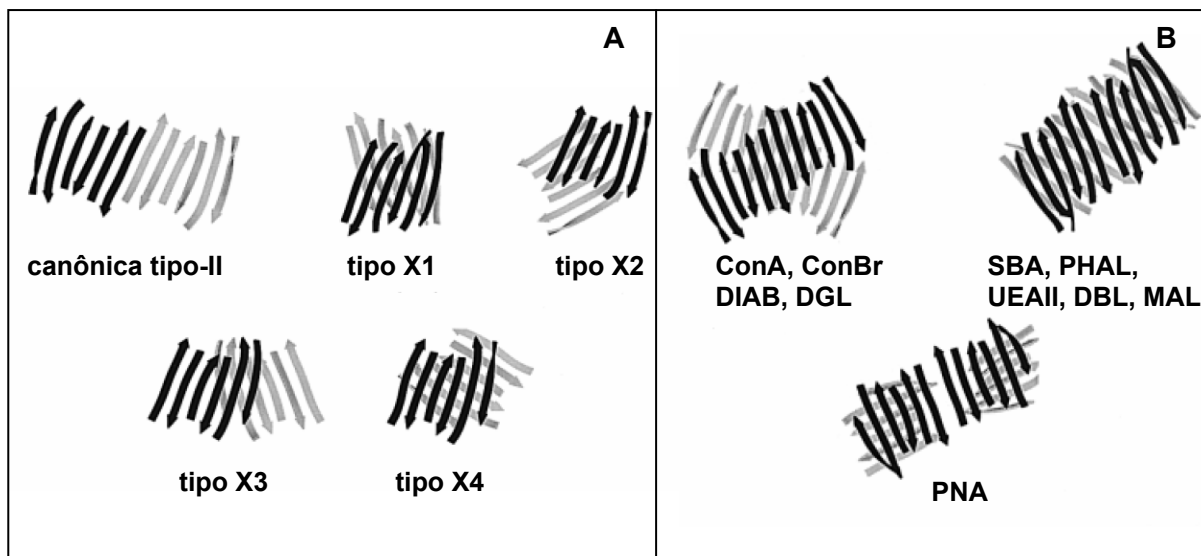


Figura 5.5 - Representações esquemáticas de diferentes tipos de interações encontradas em lectinas de leguminosas. A) Representações das folhas- β das costas envolvidas nos diferentes tipos de interfaces diméricas das lectinas de leguminosas. A folha- β das costas de cada monômero é identificada por cores diferentes. **B)** Representações das folhas- β das costas em lectinas de leguminosas tetraméricas. Subunidades 1 e 2 formam interfaces canônicas tipo-II são mostradas em preto. Subunidades 3 e 4 estão em cinza. Lectinas tetraméricas esquematizadas: *Canavalia ensiformis* - concanavalina A (ConA), *C. brasiliensis* (ConBr), *Dolichos lablab* (DIAB), *Dioclea grandiflora* (DGL), *Glycine max* - Soy bean agglutinin (SBA), *Phaseolus vulgaris* (PHAL), *Ulex europaeus* (UEAI), *Dolichos biflorus* (DBL), *Maackia amurensis* (MAL), *Arachis hypogea* - Peanut Agglutinin (PNA). Esquemas modificados a partir de Manoj e Suguna (2001).

5.4 - Atividade biológica de lectinas de leguminosas

Lectinas são proteínas de ocorrência natural em vários tecidos de plantas, microrganismos e animais, e que têm como sua principal característica a habilidade de se ligar a carboidratos de maneira específica e reversível. Devido a esta característica lectinas são mediadoras de uma série de processos biológicos, como interações célula-célula e hospedeiro-patógeno, “turnover” de glicoproteínas plasmáticas e respostas auto-imunes. Assim, as lectinas têm proporcionado importantes aplicações biotecnológicas como bioadesivos, utilização em testes de carcinogênese, determinação

de grupos sanguíneos humanos, diagnóstico de imunodeficiências congênitas ou adquiridas, tipagem e separação de células neoplásicas, detecção de cromossomos defeituosos, purificação de anticorpos específicos, reagentes cito e histoquímicos para detecção de glicoconjugados em tecidos, células ou organelas, investigação de rotas intracelulares de glicosilação de proteínas, demonstração de glicoconjugação em hormônios, neurotransmissores e receptores de membrana, ativação da mitose de linfócitos, entre outros [108, 114, 121, 129, 130].

Na década de 60, foi descrita a atividade mitogênica para a fitoaglutinina A (PHA), extraída de *Phaseolus vulgaris*, ou seja, esta lectina possui a capacidade de estimular linfócitos a sofrerem mitose [131]. Esta descoberta teve um grande impacto na imunologia, pois até então os linfócitos eram tidos como células incapazes de se dividir após sua diferenciação. Após essa descoberta, várias outras lectinas foram descritas como mitogênicas. Particularmente interessante, a concanavalina A (ConA) merece destaque, pois estudos com essa lectina demonstraram que sua atividade mitogênica poderia ser inibida por baixas concentrações de monossacarídeos, provando que sua atividade era resultado da ligação aos açúcares na superfície dos linfócitos. Assim, as lectinas com atividade mitogênica tornaram-se logo ferramentas para estudos de transmissão de sinal em células e para análises de eventos bioquímicos que ocorrem na estimulação de linfócitos “*in vitro*” [112].

Uma outra descoberta marcante foi observada para a lectina WGA (aglutinina de germen de trigo), que se mostrou capaz de aglutinar preferencialmente células malignas [132], fato depois verificado também para a concanavalina A. Esses resultados trouxeram evidências de que alterações nos açúcares da superfície celular podem estar associadas ao desenvolvimento de câncer.

5.5 - O gênero *Camptosema*

A família Leguminosae (Fabaceae) recebe o nome de família das leguminosas devido ao fruto presente na maioria das espécies que a representam. É uma família com aproximadamente 650 gêneros e mais de 18.000 espécies, distribuídos em três subfamílias [133]. Há uma ampla distribuição mundial, com exemplares em quase todos os habitats e com grande importância ecológica e econômica, uma vez que vários exemplares são utilizados na alimentação humana e animal.

A tribo Phaseoleae, na qual se insere o gênero *Camptosema*, compreende o maior número de gêneros e é economicamente a mais importante das tribos de Leguminosae. Essa tribo é dividida em oito subtribos, sendo *Camptosema* incluído na subtribo Diocleinae [133]. *Camptosema* é um gênero neotropical de trepadeiras herbáceas ou semi-lenhosas, arbustos ou lianas com folhas uni- ou trifolioladas, inflorescências pseudo-racemosas, flores papilionóides com pétalas vermelhas, androceu pseudomonadelfo, ovário estipitado e frutos deiscentes. Desde o seu estabelecimento, a circunscrição do gênero sofreu grandes transformações, principalmente com a transferência para *Camptosema* de espécies descritas em *Collaea*, *Cratylia* e *Galactia*, tornando os limites característicos do gênero imprecisos [134]. No trabalho sobre sistemática e filogenia do gênero *Camptosema* desenvolvido por Queiroz (1999) é proposta a transferência de alguns gêneros, porém o correto posicionamento de *C. ellipticum* (Figura 5.6) e espécies afins ainda necessita que estudos mais aprofundados sejam desenvolvidos no gênero *Galactia*.



Figura 5.6 - Fotografias de *Camptosema ellipticum*. À esquerda, hábito da planta em seu local de coleta. À direita, detalhe de um ramo florido e com frutos, nos quais se encontram as sementes que contêm a lectina camptosemina.

5.6 - Camptosemina, uma lectina de leguminosa

Recentemente foi identificada em nosso grupo uma lectina em sementes de *Camptosema ellipticum*, uma espécie filogeneticamente relacionada ao gênero *Canavalia*, cujas espécies possuem lectinas com importantes aplicações biotecnológicas, como descritas para concanavalina A, por exemplo. Embora espécies dentro da mesma subtribo sejam muito estudadas e exibam muitas aplicações, nenhuma lectina foi descrita ou caracterizada para o gênero *Camptosema* até o momento. Resultados obtidos demonstram que a lectina camptosemina é capaz de promover intensamente a adesão de células de uma linhagem de câncer de mama. Assim, visando a potencial aplicação da camptosemina sua caracterização torna-se essencial. O presente trabalho apresenta a caracterização estrutural preliminar da camptosemina, através da

dedução de sua seqüência primária a partir do isolamento de seu cDNA e estudo de oligomerização por métodos espectroscópicos.

Objetivos

6 - Objetivos

6.1 - Objetivos gerais

O presente trabalho teve como objetivo geral estudar estruturalmente a camptosemina.

6.2 - Objetivos específicos

- **Isolar o cDNA que codifica a cadeia madura da camptosemina a fim de determinar sua estrutura primária;**
- **Estudar sua estabilidade estrutural da camptosemina nativa frente a variações no pH e na temperatura.**

Materiais e Métodos

7 - Materiais e Métodos

7.1 - Purificação da camptosemina

A extração e purificação da camptosemina seguiram o protocolo já estabelecido no grupo de Grupo de Biofísica Molecular “Sérgio Mascarenhas”. Resumidamente, frutos de *Camptosema ellipticum* foram coletados, as sementes descascadas e seus cotilédones retirados para extração de seu conteúdo protéico solúvel. Para isto, os cotilédones foram congelados em nitrogênio líquido e macerados manualmente num almofariz. Após a maceração foi obtido um pó fino que foi ressuspenso em PBS e mantido sob agitação por 4 horas para a extração da fração solúvel. Após a incubação, todo o volume foi filtrado em papel de filtro convencional (para a separação de particulados insolúveis) e o filtrado reservado à -20° C para posterior purificação. A camptosemina foi purificada a partir deste extrato bruto por duas sessões de cromatografia de exclusão molecular seguida por uma cromatografia de troca iônica.

7.1.1 - Cromatografia de exclusão molecular

Amostras de 1 ml do extrato bruto de sementes de *C. ellipticum* foram aplicadas em uma coluna Superdex 75 HR 10/30 pré-equilibrada com PBS. A cromatografia de exclusão molecular foi conduzida em um cromatógrafo Äkta purifier (GE Healthcare Life Sciences) sob fluxo constante de 0,5 ml/min. de PBS como eluente e monitorada pela absorbância em 280 nm. As frações referentes a um pico principal exibindo atividade hemaglutinante foram reunidas e re-submetidas à cromatografia de exclusão molecular sob as mesmas condições. Amostras eluídas da cromatografia de exclusão molecular foram retiradas para análise em SDS-PAGE. Após esta segunda

cromatografia de exclusão molecular, amostras do pico de absorvância referente à camptosemina foram reunidas e simultaneamente concentradas e trocadas de tampão para Tris-HCL 20 mM pH 8,0 em um Centriprep 10. Após este procedimento foi realizada a cromatografia de troca iônica.

7.1.2 - Cromatografia de troca iônica

Amostras de 1ml resultantes das frações de eluição sob o pico de absorvância da camptosemina na dupla cromatografia de exclusão molecular do extrato bruto e em Tris-HCL 20 mM pH 8,0 foram aplicadas em uma coluna MonoQ 5/5 pré-equilibrada no mesmo tampão. A eluição da proteína retida no trocador aniônico foi realizada pela adição de um gradiente linear de Tris-HCL 20 mM pH 8,0 com NaCl 1M. A cromatografia foi realizada em um sistema Äkta purifier e monitorada pela absorvância em 280 nm. Amostras da camptosemina purificada foram submetidas à SDS-PAGE e ensaio de atividade hemaglutinante.

7.1.3 - Atividade hemaglutinante

Amostras da camptosemina foram submetidas a ensaio de promoção de hemaglutinação utilizando-se hemácias humanas do tipo O⁺. O ensaio foi feito adicionando-se 50 µl da proteína purificada a 50 µl de uma suspensão a 2% de hemácias humanas em PBS sobre microplacas de 96 poços. Para a inibição da atividade hemaglutinante, 200 mM de Lactose foram adicionados à solução protéica antes da adição da suspensão de hemácias. Tampão Tris-HCL 20 mM pH 8,0 foi utilizado como controle negativo. As placas foram incubadas a temperatura ambiente por 30 min. e a

atividade hemaglutinante verificada pela formação de um disco de hemácias aglutinadas sobre o fundo dos poços da microplaca. Todas as amostras da camptosemina utilizadas neste trabalho foram verificadas quanto à sua capacidade hemaglutinante e inibição da atividade pela adição de Lactose.

7.2 - Isolamento do cDNA

A proteína purificada foi submetida ao seqüenciamento por degradação de Edman de sua porção *N*-terminal e a informação obtida utilizada para o desenho de um oligonucleotídeo para a amplificação de um fragmento gênico parcial da camptosemina madura. Os dados referentes ao seqüenciamento do *N*-terminal da camptosemina foram obtidos por Fernanda Aparecida Heleno Batista e fazem parte de sua dissertação de mestrado pelo PPGGEv - UFSCar.

Na tentativa de isolar o fragmento gênico que codifica parte da proteína madura, foi realizada uma RT-PCR (*Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction*). Baseando-se na estrutura primária parcial obtida a partir do seqüenciamento amino-terminal da camptosemina, foi sintetizado um oligonucleotídeo degenerado (Camp-fw2 5' ATHAARYTNCARGGNAAYGC 3') correspondente a região de menor degeneração e maior confiabilidade na seqüência de aminoácidos descrita (seqüência IKLQGNAA). A degeneração do oligonucleotídeo foi minimizada na região 3'. Este oligonucleotídeo degenerado foi usado em conjunto com um oligo-dT (Oligo (dT) 15 - Promega) também utilizado para a síntese da primeira fita de cDNA a partir de RNA total de sementes imaturas de *C. ellipticum*.

Para a RT-PCR, RNA total de sementes de *C. ellipticum* imaturas (coletadas, congeladas imediatamente em N₂ líquido e armazenadas a -80°C) foi extraído, sendo utilizado para isso o kit *RNAeasy Plant Mini* (Qiagen). O RNA foi quantificado em espectrofotômetro (HITACHI U-2001). A RT-PCR foi realizada em duas etapas, seguindo um protocolo de síntese de cDNA, precipitação com etanol e PCR. O protocolo foi o seguinte:

- Síntese da primeira fita de cDNA:

Mistura de reação da RT-PCR	Quantidade final
RNA total da semente	1 µg
<i>Primer</i> oligo-dT	100 pmol
dNTPs	0,4 mM
<i>AMV/Tf/5X Reaction Buffer</i>	[1 X]
<i>AMV Reverse Transcriptase</i>	5 U
Água livre de RNase	7 µL
Volume final da reação	25 µL

Tabela 7.1 - Composição da mistura para RT-PCR para a síntese de cDNA a partir de mRNA total de sementes de *C. ellipticum*.

Toda a mistura para a síntese de cDNA sem a adição da transcriptase reversa foi aquecida a 70° C por 5 min., resfriada em banho de gelo por 5 min. e centrifugada para então ser adicionada da *AMV Reverse Transcriptase* (Promega) antes da reação. A reação de polimerização foi realizada em um termociclador Eppendorf Mastercycler (Eppendorf) incubando-se a 48° C por 60 minutos. Ao final da síntese, todo o cDNA resultante foi precipitado pela adição de 200 µL de etanol 100%. O cDNA precipitado foi lavado com 200 µL de etanol 75 %, recuperado por centrifugação 16000 g por 5 min. e liofilizado para utilização como molde para PCR descrita a seguir.

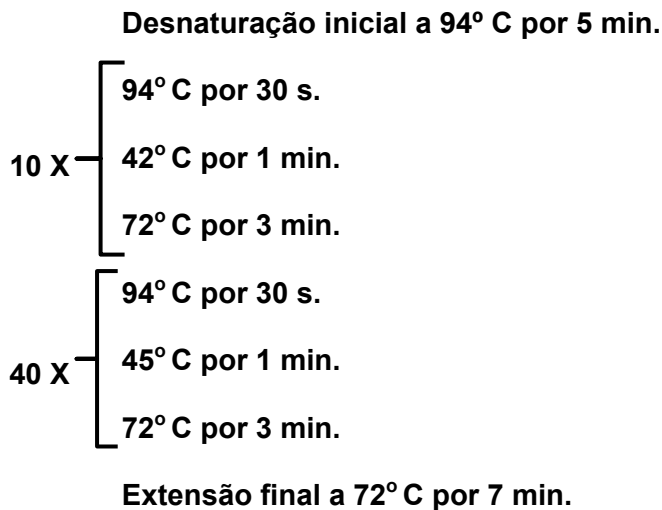
- Síntese da segunda fita e amplificação:

Mistura de reação da PCR	Quantidade final
<i>Primer Camp-fw2</i>	100 pmol
<i>Primer oligo-dT (15)</i>	100 pmol
dNTPs	0,4 mM
MgSO ₄	2,5 mM
<i>10X High Fidelity PCR Buffer</i>	[1X]
<i>High Fidelity PCR Enzyme Mix</i>	2,5 U
Água livre de nucleases	16,5 µL
Volume final da reação	25 µL

Tabela 7.2 - Composição da mistura de PCR para a amplificação do cDNA referente à camptosemina.

A amplificação foi realizada termociclador Eppendorf Mastercycler seguindo-se

o ciclo:



Uma amostra do produto de PCR foi analisada por eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TAE corado com brometo de etídio e visualizado em luz UV.

7.2.1 - Clonagem do cDNA

Todo o volume resultante da reação de amplificação foi submetido à eletroforese em gel de agarose e purificado com a utilização do kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-*

Up System (Promega). O DNA purificado foi clonado no vetor pCR 2.1, de acordo com o protocolo *TopoTA cloning* (Invitrogen). A mistura de ligação foi utilizada numa transformação de células de *E. coli* DH5 α competentes por tratamento com cloreto de cálcio [85]. As células foram plaqueadas em meio Lúria-Bertani (LB) contendo X-gal (0,1 mg/mL) (Gibco BRL), IPTG (0,45 mM) (Sigma) e ampicilina (50 μ g/mL) (Sigma). Colônias positivas foram submetidas à extração de DNA plasmidial com o kit *Wizard Plus Minipreps DNA Purification Systems* (Promega) e clones confirmados por digestão com endonuclease *EcoR* I seguida de eletroforese em gel de agarose 0,8 %. Os clones confirmados foram seqüenciados pelo método do didesoxinucleotídeo marcado [135] num seqüenciador ABI Prism 377 (Perkin Elmer), segundo o protocolo do fabricante.

7.2.2 - RACE 5' (“Rapid Amplification of cDNA Ends”)

A técnica de RACE (“*Rapid Amplification of cDNA Ends*”), modificada a partir do método descrito por Bertoli (1997) [136], foi utilizada para complementar a informação da extremidade 5' do cDNA clonado. As modificações substituem as etapas de precipitação de DNA com CTAB e NaCl por simples e rápidas precipitações com etanol. Para a produção do cDNA, foi utilizado um oligonucleotídeo específico CampRACE_External (5' CTGGGTGTCCTGAGGTGCAAG 3'). O cDNA foi usado como molde para uma PCR, onde um segundo oligonucleotídeo específico (CampRACE_Internal - 5' GCAACATTGCCGGTGGCTTC 3') e adaptadores foram utilizados para amplificar a região 5' (RACE 5').

No protocolo para o RACE 5' foram utilizados 1 μ g de RNA total de sementes imaturas de *C. ellipticum* e 15 pmol do oligonucleotídeo específico CampRACE_External, além de 5U da *AMV Reverse Transcriptase* (Promega) para a

síntese do cDNA. A mistura foi pré-aquecida a 70° C por 5 min., resfriada em gelo e centrifugada para então ser adicionada a transcriptase reversa. A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada por incubação a 48° C por 60 minutos.

- Síntese da primeira fita de cDNA:

Mistura de reação da RT-PCR-RACE 5'	Quantidade final
RNA total da semente	1 µg
<i>Primer</i> CampRACE_External	15 pmol
dNTPs	0,4 mM
<i>AMV/Tf/5X Reaction Buffer</i>	[1 X]
<i>AMV Reverse Transcriptase</i>	5 U
Água livre de RNase	7 µL
Volume final da reação	25 µL

Tabela 7.3 - Composição da mistura para RT-PCR para a síntese de cDNA para o RACE 5' a partir de mRNA total de sementes de *C. ellipticum*.

Após a síntese da primeira fita de cDNA, todo o volume de reação foi precipitado pela adição de 200 µL de etanol absoluto e o cDNA precipitado foi lavado com etanol 75% e liofilizado para adição de adaptadores poli-G 3'. A transferase terminal (Life Technologies - Invitrogen) foi usada para adicionar a cauda poli-G na primeira fita (extremidade 3' do cDNA), segundo instruções do fabricante. A adição de homopolímero dG foi realizada por incubação da mistura à temperatura ambiente por 1 hora.

- Adição de adaptadores 3' (homopolímero dG):

Mistura de adição de poli-G-RACE 5'	Quantidade final
dGTP	16 mM
<i>TdT 5X Buffer</i>	[1 X]
<i>Terminal Deoxynucleotidyl Transferase</i>	15 U
Água livre de RNase	15 µL
Volume final da reação	25 µL

Tabela 7.4 - Composição da mistura de adição de adaptador de homopolímero dG para a amplificação do cDNA referente à região 5' da camptosemina.

Todo o cDNA com adaptadores poli-G 3' foi recuperado por precipitação com etanol e juntamente com 100 pmol dos “*primers*” C-EcoRI (oligo dC com um sítio para

endonuclease *EcoR* I 5') e CampRACE_Internal foram usados em uma PCR, cujo os outros componentes da reação foram aqueles fornecidos pelo kit *High Fidelity Master Mix* (Fermentas).

- Síntese da segunda fita e amplificação:

Mistura de reação da PCR-RACE 5'	Quantidade final
<i>Primer</i> CampRACE_Internal	100 pmol
<i>Primer</i> C-EcoRI	100 pmol
dNTPs	0,2 mM
<i>10X High Fidelity PCR Buffer with 15 mM MgCl₂</i>	[1X]
<i>High Fidelity PCR Enzyme Mix</i>	2,5 U
Água livre de nucleases	41,5 µL
Volume final da reação	50 µL

Tabela 7.5 - Composição da mistura de PCR para a amplificação da região 5' do cDNA referente à camptosemina.

A reação de PCR foi realizada em um termociclador Eppendorf Mastercycler nas seguintes condições:

Desnaturação inicial a 94° C por 5 min.

40 X $\left\{ \begin{array}{l} 94^{\circ} \text{ C por 30 s.} \\ 54^{\circ} \text{ C por 30 s.} \\ 72^{\circ} \text{ C por 1 min.} \end{array} \right.$

Extensão final a 72° C por 10 min.

Uma amostra do produto de PCR foi analisada por eletroforese em gel de agarose. O produto da PCR foi então clonado segundo o protocolo do fabricante do *InsTAclone PCR Cloning Kit* (Fermentas). Os fragmentos amplificados foram inseridos no vetor pTZ57R/T e o vetor utilizado numa transformação de células de *E. coli*. 50 µL de células de *E. coli* linhagem DH5α competentes por cloreto de cálcio [85], foram transformadas por choque térmico com a mistura de ligação, e plaqueadas em meio LB ágar contendo X-gal 0,1 mg/mL, IPTG 0,4 mM e ampicilina 50 µg/mL. O DNA plasmidial dos transformantes positivos foi extraído por lise alcalina e os clones

positivos foram confirmados por digestão do DNA plasmidial com endonucleases *Xba* I e *Bam*HI (Promega) visualizada por eletroforese em gel de agarose. O DNA dos clones foi submetido ao seqüenciamento automático de DNA, como já descrito anteriormente. As seqüências obtidas referentes ao RACE 5' e a amplificação parcial do mRNA da camptosemina foram analisadas e sobrepostas na forma de um "contig" representando a totalidade dos dados obtidos através do pacote de programas de bioinformática Lasergene 7.0 (www.dnastar.com).

7.3 - Espectroscopia

A caracterização espectroscópica da camptosemina foi realizada por medidas de dicroísmo circular (CD) e fluorescência sob diferentes pHs e temperaturas. Para as medidas de CD, a camptosemina foi medida em espectropolarímetro J-715 (JASCO) utilizando-se de cubetas de 0,1 cm de caminho óptico em uma solução protéica em D.O. $280 \text{ nm} = 0,2$ (cerca de 0,2 mg/ml) de camptosemina em tampão Tris-HCl pH 8,0, nas medidas sob aquecimento, ou em tampão acetato-borato-fosfato 20 mM ajustado para diferentes pHs de 2,0 a 12,0, nas medidas sob pHs diferentes.

Medidas de fluorescência foram realizadas em um fluorímetro ISS-K2 utilizando cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. As medidas foram executadas sob dois modos de aquisição de dados:

- **Fluorescência estática:** Foram usadas amostras da camptosemina a 0,1 mg/ml em tampão acetato-borato-fosfato 20 mM pH 8,0 na presença e ausência de DTT 10 mM nas medidas sob aquecimento, ou em acetato-borato-fosfato 20 mM ajustado para diferentes pHs de 2,0 a 12,0, nas medidas sob pHs diferentes. As amostras foram

excitadas a 280 nm e 295 nm e seus espectros de emissão adquiridos no intervalo de comprimento de onda de 300-450nm;

- **Anisotropia de emissão polarizada:** Foram usadas amostras da camptosemina a 0,02 mg/ml em tampão acetato-borato-fosfato 20 mM pH 8,0 nas medidas sob aquecimento, ou em acetato-borato-fosfato 20 mM ajustado para diferentes pHs, nas medidas sob pHs diferentes foram excitadas com luz polarizada aos 280 e 295 nm. A anisotropia média foi obtida após 10 varreduras consecutivas da amostra a cada temperatura da rampa de aquecimento.

7.3.1 - Estabilidade térmica

Amostras da camptosemina foram examinadas por CD e fluorescência ao longo de uma rampa de aquecimento de 10° C-100° C sob divisões de 5° C. As medidas de CD foram registradas como uma média de 16 varreduras consecutivas da amostra no intervalo de comprimento de onda de 250-195 nm a cada temperatura do aquecimento, sob controle do programa de aquisição do equipamento. A cada temperatura a proteína foi incubada por 2 minutos antes das medidas. Os espectros de CD foram analisados com o pacote de programas CDPro [87-92].

Para as medidas de fluorescência ao longo do aquecimento as amostras foram incubadas por 5 min. em cada temperatura antes das medidas. As medidas aos 100° C foram substituídas por medidas aos 97° C devido a limitações físicas do experimento.

7.3.2 - Mudanças estruturais em função do pH

Amostras da camptosemina foram examinadas por CD e fluorescência em diferentes valores de pHs. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 30 min. em todos os pHs antes das medidas.

As medidas de CD foram registradas como uma média de 16 varreduras consecutivas da amostra no intervalo de comprimento de onda de 250-195 à temperatura ambiente. As medidas de fluorescência também foram realizadas a temperatura ambiente. Amostras da camptosemina sob os diferentes pHs foram submetidas à SDS-PAGE [86].

As análises espectroscópicas acima descritas foram realizadas em colaboração com a Prof^a. Dr^a. Leila Maria Beltramini, de Grupo de Biofísica Molecular “Sérgio Mascarenhas.

7.4 - Promoção de adesão de células de câncer de mama

Células da linhagem MDA-MB-231 foram cultivadas sob as mesmas condições anteriormente descritas no capítulo I. Diluições seriadas da proteína foram utilizadas no processo de “*coating*” de uma microplaca de 96 poços e preparadas para ensaio de promoção de adesão mediada pela camptosemina às células MDA-MB-231 marcadas como descrito no capítulo I. As células aderidas foram lisadas e a fluorescência da marcação registrada como a média de uma triplicata.

Resultados e Discussão

8 - Resultados e Discussão

8.1 - Purificação da camptosemina

Amostras de extrato bruto proveniente do conteúdo solúvel de um macerado de cotilédones das sementes de *C. ellipticum* foram submetidas à cromatografia de exclusão molecular em uma coluna Superdex 75 HR 15/30 sob fluxo de 0,5 ml/minuto. O eluato foi monitorado pela absorvância em 280 nm e coletado em frações de 1ml. Amostras das frações possuindo atividade hemaglutinante sob um pico referente à camptosemina foram submetidas à SDS-PAGE (Figura 8.2). As frações ricas em camptosemina foram re-cromatografadas pelo mesmo método de cromatografia de exclusão molecular a fim de se conseguir um produto mais puro (Figura 8.1).

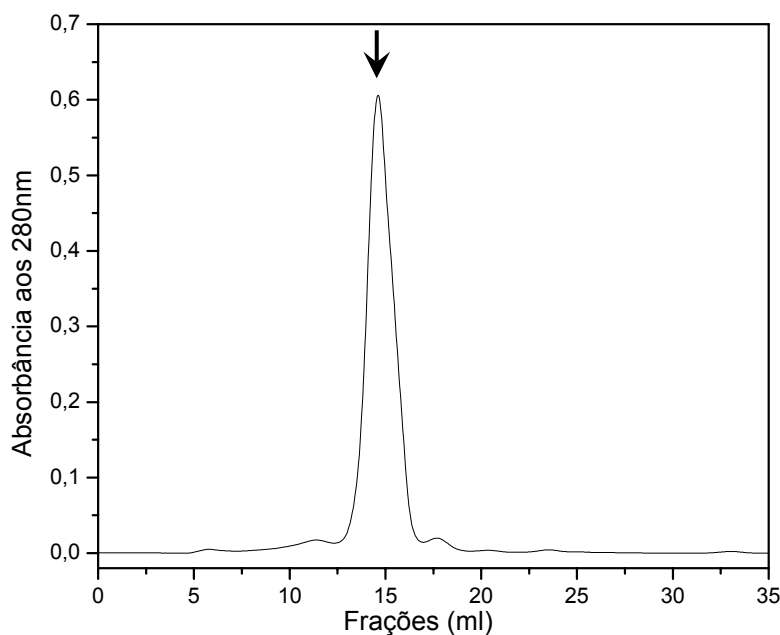


Figura 8.1 - Segunda cromatografia de exclusão molecular da purificação da camptosemina. Amostras do extrato bruto de sementes de *C. ellipticum* foram aplicadas em coluna Superdex 75 pré-equilibrada em PBS. O fluxo da fase líquida (PBS) foi de 0,5 ml/min. e a eluição monitorada por absorvância aos 280 nm. O eluato foi coletado em frações de 1 ml e as frações contendo camptosemina reservadas e re-submetidas à cromatografia de exclusão molecular sob as mesmas condições. Uma seta indica a posição de eluição da proteína.

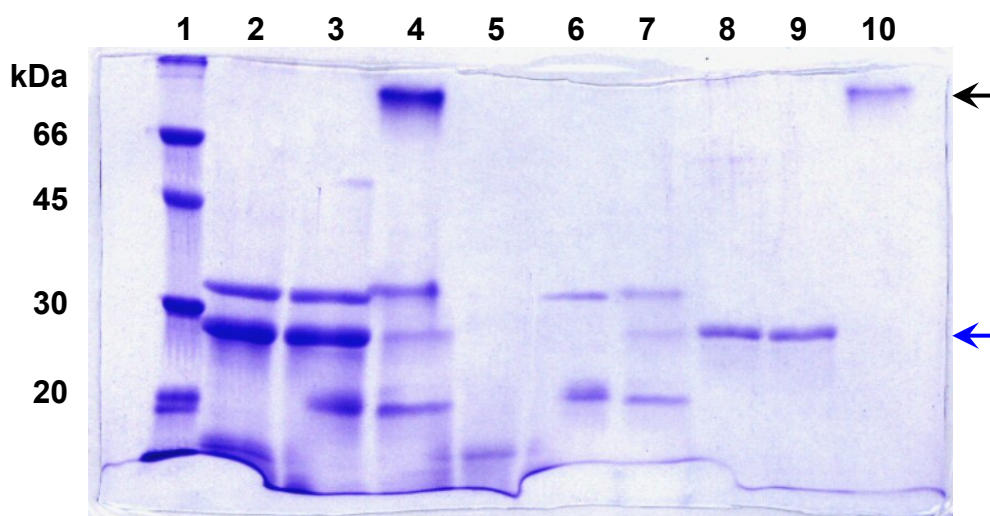


Figura 8.2 - Re-cromatografia de exclusão molecular do extrato bruto de sementes de *C.ellipticum*. SDS-PAGE 15% mostrando: **1)** Padrões de massa molecular; **2, 3 e 4)** amostras da fração 12, ferveira e não reduzida, ferveira e na presença de redutor, e não ferveira e sem redutor, respectivamente; **5, 6 e 7)** amostras da fração 10, ferveira e não reduzida, ferveira e na presença de redutor, e não ferveira e sem redutor, respectivamente; **8, 9 e 10)** amostras da fração 15, ferveira e não reduzida, ferveira e na presença de redutor, e não ferveira e sem redutor, respectivamente; Uma seta negra mostra a altura da banda eletroforética respectiva à camptosemina em sua forma oligomérica e uma seta azul indica a proteína monomérica.

As amostras enriquecidas em camptosemina provenientes da dupla cromatografia de exclusão molecular foram reunidas, concentradas e trocadas de tampão para Tris-HCl 20 mM pH 8,0. As amostras foram então aplicadas em uma coluna de troca iônica MonoQ 5/5. A proteína foi eluída por um gradiente linear de 1 M NaCl em tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0. A eluição foi monitorada por absorvância em 280 nm e fracionada a cada 1 ml (Figura 8.3). Frações respectivas à camptosemina foram submetidas à análise por SDS-PAGE (Figura 8.4).

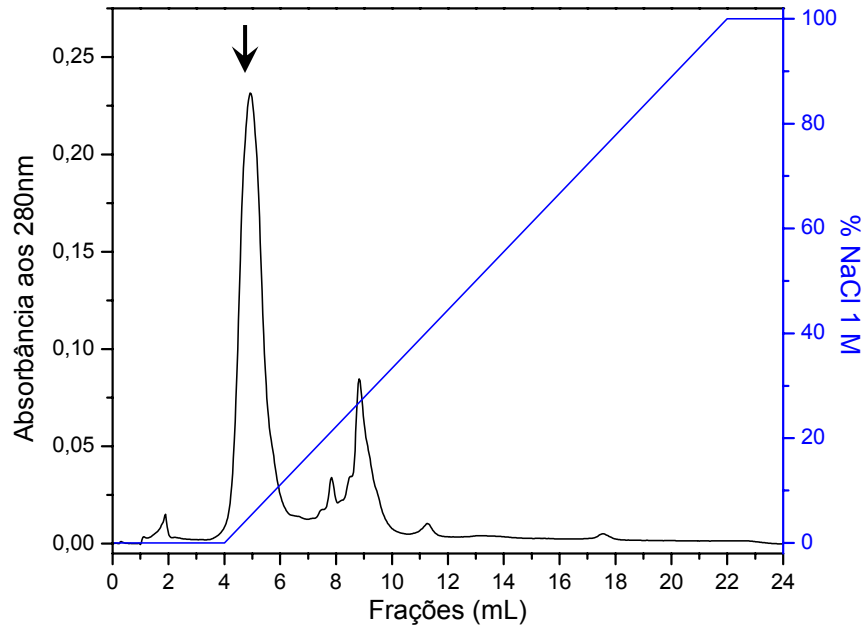


Figura 8.3 - Cromatografia de troca iônica para a purificação da camptosemina. Amostras pré-enriquecidas em camptosemina por cromatografia de exclusão molecular em tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0 foram injetadas em uma coluna MonoQ e eluídas por um gradiente de NaCl, indicado em azul. Uma seta indica o pico referente à eluição da camptosemina. A proteína é eluída com aproximadamente 70 mM de NaCl.

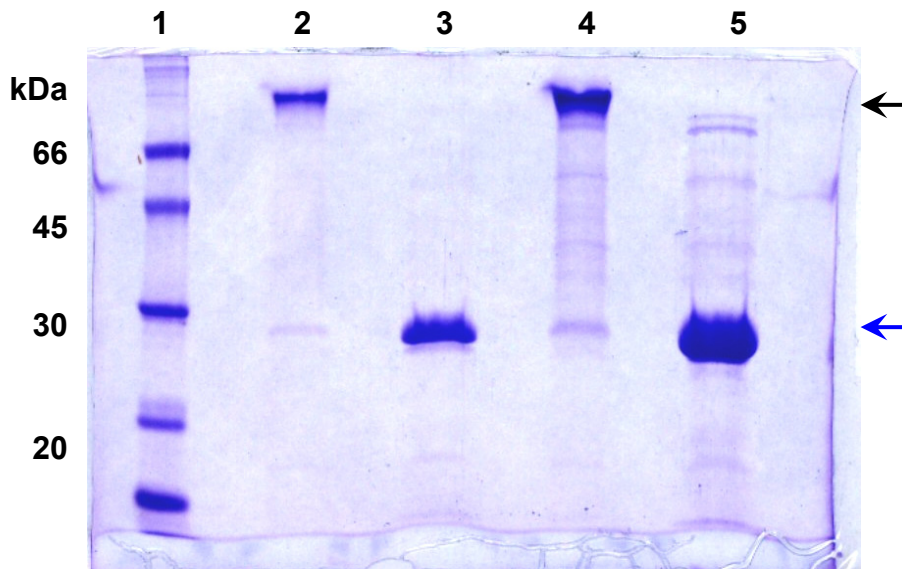


Figura 8.4 - Perfil eletroforético da purificação da camptosemina por troca iônica. Amostras referentes ao pico de eluição da camptosemina foram submetidas à SDS-PAGE. **1)** Padrões de massa molecular; **2 e 3)** Fração 5 eluída da cromatografia de troca iônica, amostras não fervida e fervida respectivamente; **4 e 5)** Fração 6 eluída da cromatografia de troca iônica, amostras não fervida e fervida respectivamente. Uma seta negra indica a altura do oligômero da camptosemina. Uma seta azul indica a altura do monômero.

8.2 - Atividade biológica da camptosemina

Visando verificar a interação da camptosemina com células de mamífero, um ensaio utilizando células da linhagem carcinogênica MDA-MB-231, isolada de tecidos de câncer de mama (n° ATCC HTB-26) foi realizado (Figura 8.5). O cultivo das células, marcação, imobilização da proteína e controles, bem como a leitura dos experimentos foram realizados como anteriormente descrito para a rPBC (capítulo I). Os dados de fluorescência foram normalizados em valores relativos à porcentagem dos controles positivos, e são representações da média de leitura de triplicatas.

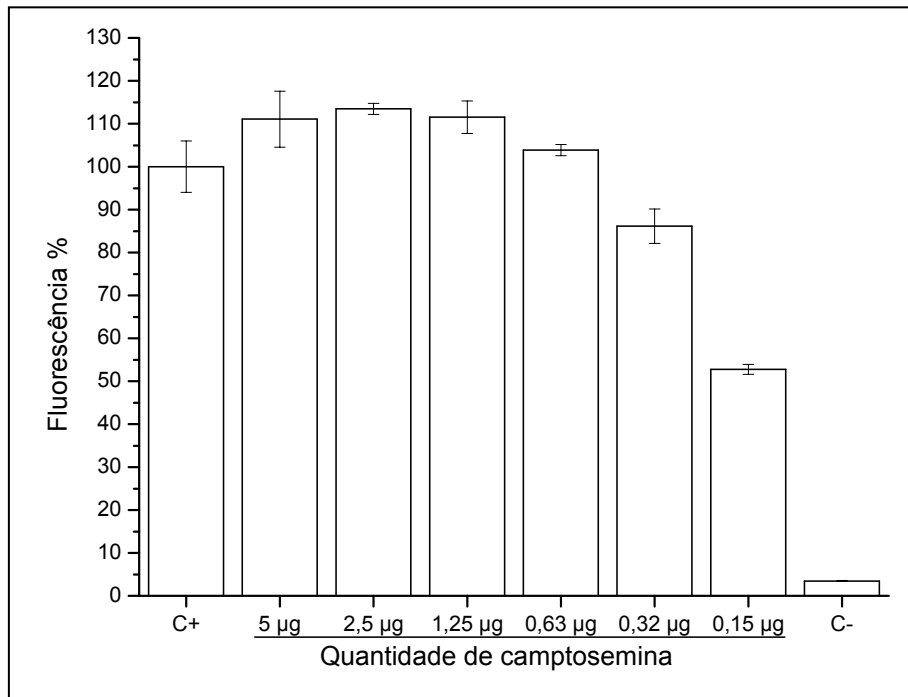


Figura 8.5 - Promoção de adesão mediada pela camptosemina a células tumorais MDA-MB-231. Diluições seriadas da camptosemina foram utilizadas para recobrir os poços de microplacas e submetidas a ensaio de promoção de adesão com células da linhagem MDA-MB-231 previamente marcadas com CMFDA. Controles positivos (colágeno I) e negativos (BSA 1%) estão assinalados como C+ e C-, respectivamente. Todos os pontos foram realizados em triplicata e as médias dos valores de fluorescência obtidos, representadas como porcentagem dos controles positivos. As barras de erro representam valores absolutos da variação encontrada dentro de cada ponto.

Os dados indicam que a camptosemina promove a adesão desta linhagem celular, em extensão comparável à do controle positivo, indicando forte interação. Interações de lectinas de leguminosas com células e estruturas celulares específicas já estão sendo exploradas comercialmente, como nos casos da concanavalina A (ConA), aglutinina de gérmen de trigo (WGA), aglutinina de grão de soja (SBA), aglutinina de amendoim (PNA) entre outras, utilizadas, por exemplo, em conjugados com fluoróforos (Alexa Fluor) para diversas finalidades incluindo microscopia de fluorescência (www.invitrogen.com). Assim, ensaios com outros tipos celulares se tornam de interesse, visando o conhecimento da natureza deste tipo de interação e a avaliação da utilização da camptosemina como ferramenta para diagnóstico de determinados tipos celulares.

8.3 - Isolamento do cDNA

A seqüência obtida pelo seqüenciamento *N*-terminal não possuía identidade com qualquer outra proteína depositada no banco de dados do NCBI através dos “*scripts*” *BLASTp* e *BLASTp – short nearly exact matches*. Entretanto, devido à proximidade filogenética do gênero *Camptosema* com *Galactia*, ambos classificados dentro da subtribo *Diocleinae*, um alinhamento da seqüência obtida foi realizado com os *N*-termini de representantes dos gêneros *Galactia* e *Dioclea*. O alinhamento revelou certo grau de semelhança entre os representantes, indicando que a camptosemina poderia pertencer a este grupo de lectinas, incluído na classe de lectinas de leguminosas. O seqüenciamento do *N*-terminal da camptosemina revelou certa identidade com a lectina de *Galactia lindenii* (GLLa), conforme demonstra o alinhamento a seguir (Figura 8.6).

		10										20																		
GLLa	A	K	V	T	S	I	K	Y	T	S	I	S	-	S	S	X	G	K	P	L	Q	G	N	A	-	-	-	-	-	-
Camptosemina	A	K	V	T	S	F	C	Y	T	S	F	S	X	X	A	<u>Q</u>	I	K	-	<u>L</u>	<u>Q</u>	<u>G</u>	<u>N</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	I	Q	G	N	L
	T	I														V		E												
	V															H														

Figura 8.6 - Alinhamento da seqüência N-terminal da camptosemina com a GLLa. Resíduos idênticos entre os dois N-terminais são indicados em negrito. Em amarelo estão destacadas as diferentes possibilidades de um dado resíduo dadas pela baixa confiabilidade do resíduo. Os resíduos utilizados como referência para o desenho do oligonucleotídeo degenerado estão sublinhados.

Com base nas informações obtidas, foi possível o desenho de um oligonucleotídeo degenerado visando à amplificação da seqüência codificante da camptosemina a partir de seu mRNA. Além disto, devido ao tamanho dos monômeros da camptosemina, comportamento de sua oligomerização e da identidade de sua região N-terminal com uma lectina de leguminosa, foi possível assumir a hipótese de que a camptosemina deve pertencer a este grupo de lectinas.

8.3.1 - Amplificação e clonagem do cDNA

O mRNA presente no RNA total, extraído de sementes imaturas de *C. ellipticum* foi utilizado como molde para a síntese de cDNA, utilizando oligos dT que se anelam na extremidade poli-A presente nos mRNAs. Este cDNA foi então utilizado como molde para a amplificação por PCR do cDNA utilizando-se do par de oligonucleotídeos oligo dT e o “*primer*” degenerado Camp-fw2. A análise de 5 µL do produto da reação (Figura 8.7) foi realizada por eletroforese em um gel de agarose 0,8% contendo brometo de etídio, em tampão TAE, visualizada sob luz ultravioleta. O padrão utilizado foi o *GeneRuler 1 Kb DNA Ladder Old Version* (Fermentas). Uma banda correspondente a aproximadamente 900 pb representando o tamanho esperado do fragmento amplificado foi observada. Um “arraste” também pode ser observado (Figura 8.7, coluna 2)

provavelmente devido a baixa temperatura de hibridização usada em conjunto com oligo dT como oligonucleotídeo para a amplificação.

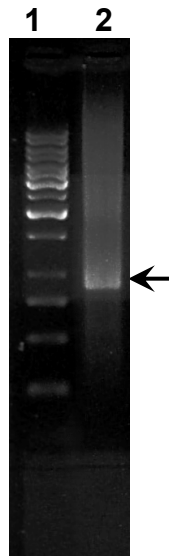


Figura 8.7 - Amplificação do cDNA parcial da camptosemina através de RT-PCR. Produto da amplificação utilizando “*primer*” degenerado camp-fw2 e oligo dT observado em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta. **1)** Padrão de massa molecular *GeneRuler 1kb DNA Ladder*, **(2)** Produto de PCR Camp-FW2 e oligo (dt) 15 (Promega). Uma seta indica a banda do produto de PCR.

O fragmento amplificado por RT-PCR foi submetido à eletroforese em gel e purificado para ser ligado no vetor de clonagem pCR 2.1, de acordo com o protocolo *TopoTA cloning* (Invitrogen). As células transformadas com a mistura de ligação foram plaqueadas em meio Lúria-Bertani sob seleção. As colônias positivas foram submetidas à extração de DNA plasmidial e clones positivos confirmados por digestão com endonuclease *EcoR I* seguida de eletroforese em gel de agarose 0,8 % (Figura 8.8).

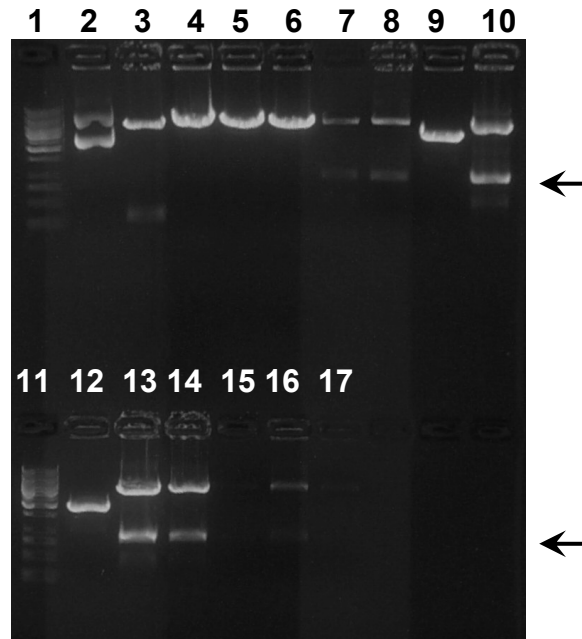


Figura 8.8 - Análise de restrição do DNA plasmidial dos clones obtidos com endonuclease *EcoR* I. 1 e 11) Padrão de massa molecular *GeneRuler 1kb DNA Ladder*; Demais colunas) DNA plasmidial de diferentes clones digeridos com *EcoR* I. Setas indicam a banda respectiva ao inserto clonado no plasmídeo.

Os clones que continham o DNA de interesse foram confirmados por seqüenciamento automático e uma seqüência nucleotídica parcial foi obtida. Esta seqüência foi submetida a uma pesquisa no banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) através do “*script*” tBLASTx [83], o qual retornou similaridade mais alta à seqüência da lectina de *Robinia pseudocacia*. Entre outros “*scores*” de identidade foram retornados seqüências das lectinas concanavalina A (ConA), aglutinina de amendoim (PNA), aglutinina de soja (SBA), e outras classificadas como lectinas de leguminosas, confirmando a clonagem. Com base no seqüenciamento dos clones foi possível o desenho de um novo conjunto de oligonucleotídeos específicos para a obtenção de informação da extremidade 5’ do cDNA, a qual não havia sido coberta pela amplificação parcial com o oligonucleotídeo degenerado.

8.3.2 - RACE 5'

A fim de se obter informações a respeito da região 5' do cDNA clonado, foi realizada a técnica de RACE (*"Rapid Amplification of cDNA Ends"*), modificada a partir do método descrito por Bertioli (1997) [136]. Esta técnica pode trazer interessantes informações, inclusive averiguar se a proteína contém algum sinal de endereçamento para um sítio específico da célula na biossíntese. Além disto, o oligonucleotídeo degenerado anteriormente utilizado foi desenhado sobre uma região cujo produto de amplificação não contempla o extremo *N*-terminal da proteína de interesse, informação que então pode ser obtida pelo RACE.

Para a produção do cDNA, foi utilizado um oligonucleotídeo específico CampRACE_External (5'CTGGGTGTCCTGAGGTGCAAG 3'), que baseado na seqüência parcial anteriormente clonada, hibridiza numa seqüência conhecida dentro do mRNA. Este cDNA, posteriormente serviu como molde para uma PCR, na qual um segundo oligonucleotídeo específico (CampRACE_Internal) que hibridiza em uma região prevista dentro do cDNA sintetizado e um oligonucleotídeo poli-C, que hibridiza no adaptador poli-G foram utilizados para amplificar a região 5' (RACE 5').

A análise de 0,5 µL do produto da PCR foi realizada por eletroforese em um gel de agarose 0,8% (Figura 8.9). O produto amplificado no RACE 5' apresentou bandas eletroforéticas com tamanhos de aproximadamente 100 pb e 200 pb, compatíveis com o esperado.

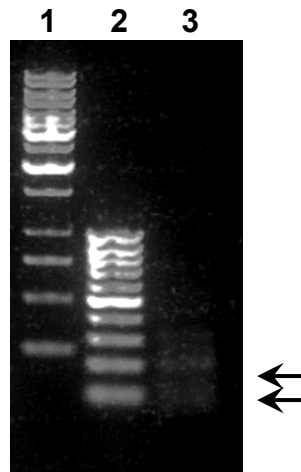


Figura 8.9 - Análise do produto amplificado a partir do RACE 5' sob eletroforese em gel de agarose, TAE. 1) Padrão de massa molecular *GeneRuler 1kb DNA Ladder old version* (Fermentas); 2) padrão de massa molecular 100bp DNA Ladder (Fermentas); 3) Produto de PCR RACE 5' utilizando "primers" oligo dG e CampRACE_internal. Setas indicam as bandas correspondentes ao produto de amplificação.

O produto da PCR foi então clonado no vetor pTZ57R/T (Fermentas) o qual foi utilizado numa transformação de células de *E. coli* DH5 α .

DNA plasmidial dos transformantes positivos foi extraído por lise alcalina e clones positivos foram confirmados por digestão do DNA plasmidial com endonucleases *Xba* I e *Bam*H I (Promega) visualizada por eletroforese em gel de agarose (Figura 8.10). O DNA dos clones foi submetido ao seqüenciamento automático de DNA, como já descrito anteriormente.

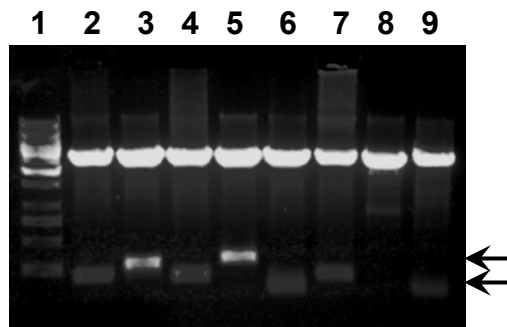


Figura 8.10 - Análise de restrição com endonucleases *Xba* I e *Bam*H I dos clones obtidos pelo RACE 5'. 1) Padrão de massa molecular *GeneRuler 1kb DNA Ladder old version* (Fermentas); **Demais colunas)** DNA plasmidial de diversos clones digeridos com *Xba* I e *Bam*H I. Setas indicam a altura de bandas eletroforéticas dos clones positivos.

A análise das seqüências obtidas dos clones provenientes do RACE 5' demonstrou que os fragmentos de tamanhos diferentes são referentes à cDNAs com extremidades 5' incompletas, com graus de preservação desta extremidade diferentes. Nenhum dos clones acessados indicou a presença de um códon iniciador 5', indicando uma provável degradação parcial dos mRNAs.

8.3.3 - Análise do seqüenciamento

As seqüências obtidas a partir de diversos clones, tanto da RT-PCR quanto do RACE, foram sobrepostas e comparadas de forma a se obter a melhor cobertura possível (Figura 8.11). Para isto, foram adequadamente desconsideradas as informações provenientes dos adaptadores utilizados para o RACE, a região de hibridização dos oligonucleotídeos degenerados e seqüências dos vetores de clonagem que flanqueiam todos os insertos. A sobreposição de informações redundantes entre os diversos clones indica a clonagem de dois grupos de seqüências muito parecidas entre si, aqui nominalmente representadas pelos clones 13 e 29. Quanto à informação originada pelo RACE, os clones indicam a existência de um provável peptídeo sinal cuja informação completa não foi obtida, talvez devido à degradação do mRNA. Entretanto, a informação também não descarta a existência de duas formas para o gene aqui representadas nominalmente pelos clones 2 e 4, mas neste caso, as diferenças entre as duas formas não resulta em substituições de resíduos de aminoácidos, diferente das formas observadas na região correspondente à proteína madura. A montagem do “*contig*” proposto para a camptosemina está esquematizada no alinhamento apresentado a seguir:



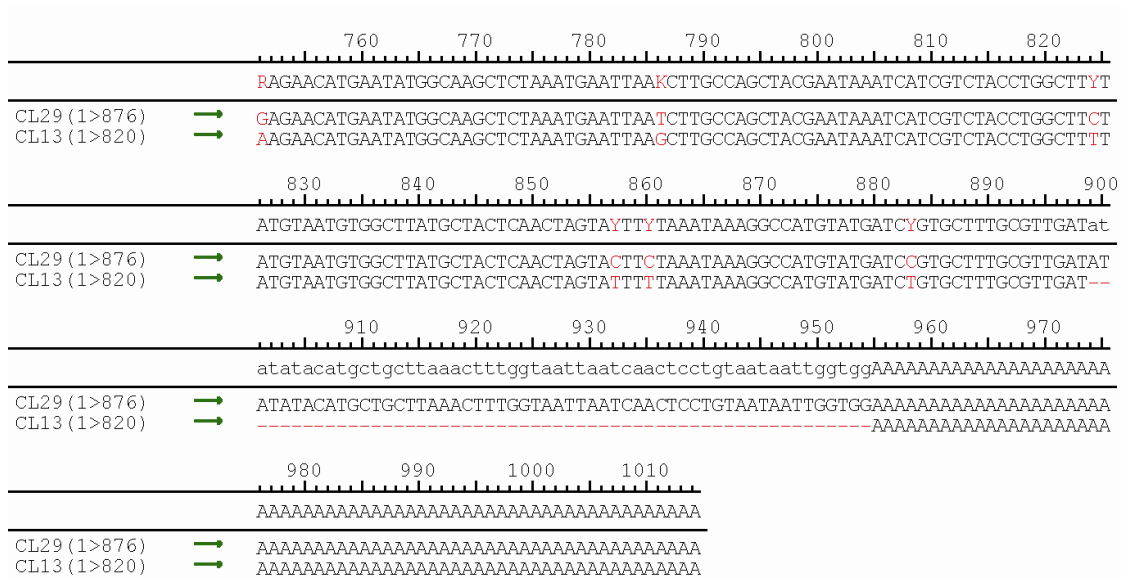


Figura 8.11 - Alinhamento dos grupos de seqüências obtidas. Clones representantes dos grupos de seqüências obtidas foram sobrepostos de forma a apresentar a cobertura do cDNA da camptosemina. RACE 2 e 4 são representativos de tipos de seqüências obtidas pelo RACE 5'. CL13 e CL29 são representativos de tipos de seqüências obtidas pela clonagem do cDNA utilizando oligonucleotídeo degenerado. As variações encontradas nas seqüências obtidas pelo RACE não implicam em substituições de resíduos preditos.

Como ressaltado anteriormente, o RACE 5' indicou a presença de um peptídeo sinal que deve estar incompleto, devido à falta de um códon iniciador para a tradução da proteína nascente. Entretanto, com a informação proveniente do seqüenciamento da região *N*-terminal previamente descrita foi possível a delimitação do início da seqüência da camptosemina madura, o que também possibilita a leitura da informação parcial do provável peptídeo sinal encontrado.

Embora provavelmente incompleta, a seqüência codificante na extremidade 5' obtida prediz uma extensão *N*-terminal característica (peptídeo sinal) sugerindo que a camptosemina deva ser inicialmente sintetizada como um pré-peptídeo. Para analisar esta possibilidade, a seqüência primária da extremidade *N*-terminal deduzida foi submetida à análise pelo programa *Signal P* (Figura 8.12), disponível “*on line*” (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), sob os dois “*scripts*” de análise disponíveis.

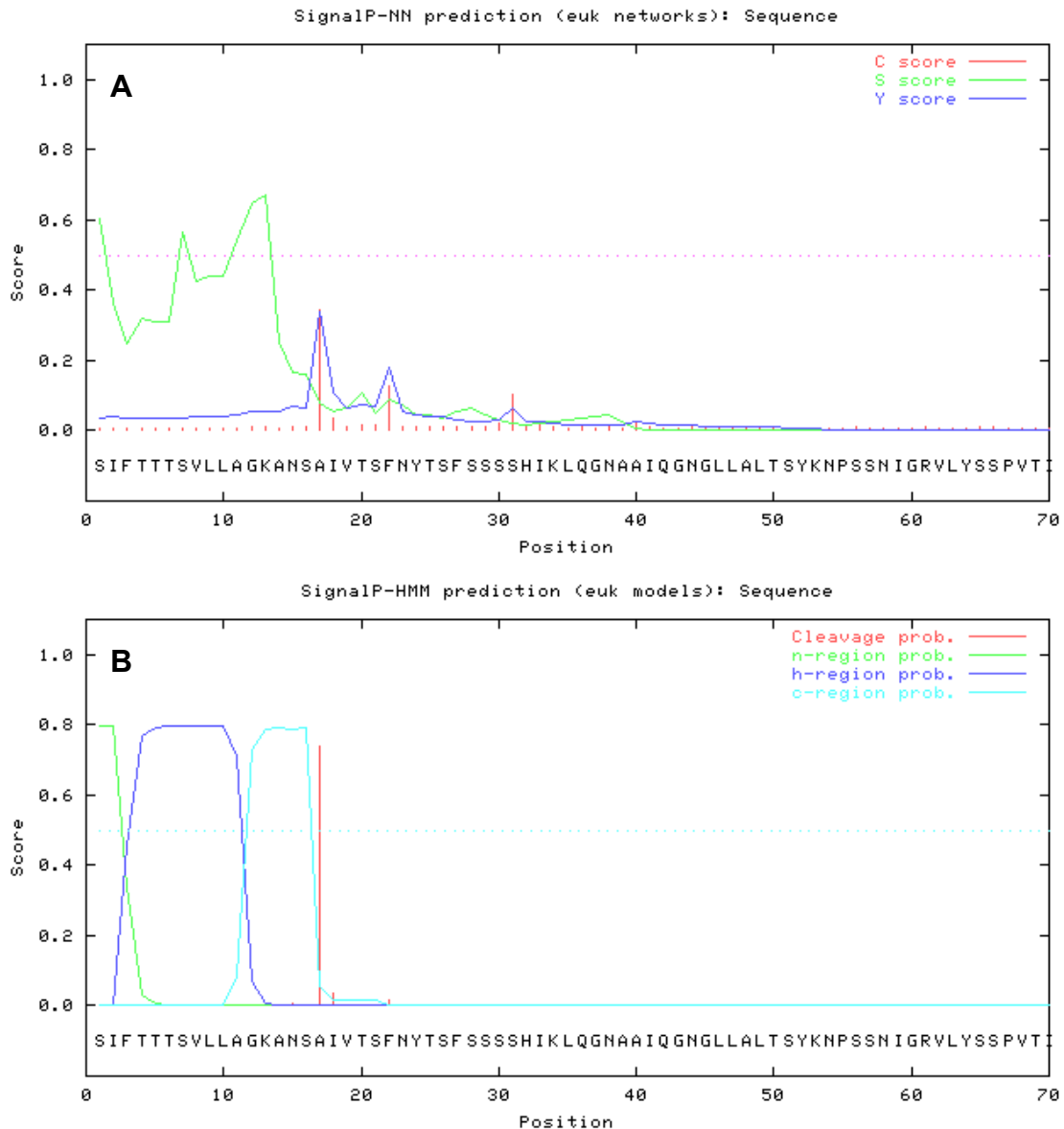


Figura 8.12 - Análise do peptídeo sinal deduzido a partir da região 5' das seqüências clonadas. A) Análise pelo método de rede neural. Em vermelho, probabilidade do sítio de clivagem; em verde, probabilidade de existência de peptídeo, em azul o “score” combinado entre ambas probabilidades; **B)** Análise pelo método de modelagem “*hidden Markov*”. Em vermelho, “score” para sítio de clivagem, em verde para *N*-terminal de peptídeo sinal, em azul escuro região hidrofóbica e em azul claro, *C*-terminal de peptídeo sinal. A região analisada não apresenta mudanças entre seqüências primárias deduzidas pelos clones.

Os resultados mostram 80% de probabilidade de a seqüência tratar-se de um peptídeo sinal, além de identificar exatamente o sítio de clivagem coincidente com o exibido pela proteína madura, o que corrobora para que a camptosemina seja produzida como uma pré-proteína cujo peptídeo sinal *N*-terminal, removido na proteína madura.

A tradução das seqüências clonadas relativas à camptosemina madura (sem o peptídeo sinal) prediz uma proteína de 25,89583 kDa e P.I. em 5.92 (clone 13) e outra de 26,01907 kDa e P.I em 5.27 (clone 29), ambas com 243 resíduos de aminoácidos. Como as mudanças encontradas nas seqüências provenientes do RACE não acarretam substituições, foi possível a predição de duas formas para a pré-proteína, ambas com o mesmo peptídeo sinal. Estas duas formas foram então submetidas à procura por identidades no banco de dados do NCBI (BLASTp) que retornou similaridade com diversos representantes da família de lectinas de leguminosas. As seqüências de alguns destes representantes foram então alinhadas [137] com as seqüências primárias deduzidas da camptosemina (Figura 8.13) e o alinhamento utilizado para a construção de um dendograma [137] (Figura 8.14) visando situar a camptosemina dentro de algum subgrupo estrutural, cujas características devem ser semelhantes.



Clone29	SE-YVPADGIVFFLAPQDTQIPSGSTGG-YLGVVN-----PKDAFNNFVGV	136
Clone13	SG-YVPADGIVFFLAPQDTQIPPSTGG-NLGVVN-----PKDAFNNFVGV	136
Robinia	PG-RNPADGIVFFLAPDTEIPNNSGG-KLGIVD-----GNNAFNQFVGV	155
PNA	KD-YDPADGIIFFIAPEDTQIPAGSIGGGTLGVSD-----TKGAG-HFVGV	143
P. vulgaris	NN-AGPADGLAFALVPVGSQP---KDKGGFLGLFD-----GSNSNFHTVAV	142
SBA	DT-KRLADGLAFFLAPIDTKP---QTHAGYLGLFN-----ENESGDQVVAV	155
L. culinaris	SS-YNVADGFTFFIAPVDTKP---QTGGGYLGVFNSK-----EYDKTSQTVAV	148
WBA	FPRPHPADGLVFFIAPPNTQT---GEGGGYFGIYN-----PLSPYFVAV	122
ECorL	YTRPLPADGLVFFMGPTKSKP---AQGYGLGIFNNS-----KQDNSYQTLGV	152
ConBR	DS--HPADGIAFFISNIDSSIPSGSTGR-LLGLFPDANVIRNSTIDFNAAYNADTIVAV	170
ConA	DS--HPADGIAFFISNIDSSIPSGSTGR-LLGLFPDANVIRNSTIDFNAAYNADTIVAV	170
	***: * : :. :*:	:: *
Clone29	EFDDYSN--AWDPSY--PHIGIDVNSLISLQTAKWNRKSGSLVKAALIMYDCHAKTSLVAV	192
Clone13	EFDDYSN--EWDPSY--PHIGIDVNSLISLQTAKWNRKSGSLVKAALIYDGHRTSLVAV	192
Robinia	EFDSYIN--DWDADS--AHIGIDVNSLISLKTVKWNRVSGSLVNVGIIYDSLTKTSLVAV	211
PNA	EFDTYSNSEYNDPPT--DHVGIDVNSVDSVKTVPWNVSAGAVVKTVIYDSSTKTSLVAV	201
P. vulgaris	EFDTLYNK-DWDPRE--RHIGIDVNSIRSIKTTPWNFVNGENAEVLITYDSSTKLLVASL	199
SBA	EFDTFRN--SWDPPN--PHIGINVNSIRSIKTTSWDLANNKVKVLITYDASTLLVASL	211
L. culinaris	EFDTFYNA-AWDPSNKERHIGIDVNSIKSVNTKSWNLQNGERANVVI AFNAATNVLTVTL	207
WBA	EFDTFRN--TWDP-Q-IPHIGIDVNSVISTKTVPFTLDNGGIANVVIKYDASTKILHVVL	178
ECorL	EFDTFSN--QWDPPQ-VPHIGIDVNSIRSIKTQPFQLDNGQVANVVIKYDASSKILHAVL	209
ConBR	ELDTYPNTDIGDPSY--PHIGIDIKSVRSKKTAKWNMQNGKVGTAHIIYNSVGRKLSAVV	228
ConA	ELDTYPNTDIGDPSY--PHIGIDIKSVRSKKTAKWNMQNGKVGTAHIIYNSVGRKLSAVV	228
	: * * . :***::*: * * : . . . : : * . :	
Clone29	END-----GQIITVAQMVDLKA VLPSKVVVGLSASTS-----SGGIQRHDVYSWAFN	239
Clone13	END-----GQIITVAQTVDLKA VLPSKVVVGLSASTS-----SGGAQRHDVYSWAFH	239
Robinia	THAN-----GQISTIAQVVDLKA VLPEKVRVGFSAATT-----SGGQIHDHISWSFT	259
PNA	TNDN-----GDITTI AQVVDLKA VLPERVKFGFSASGS-----LGGRQIHLIRSWSF	249
P. vulgaris	VYPS-----QKTSFIVSDTVDLKSVLPEWVSVGFSAATG----INKNVETNDVLSWSFA	250
SBA	VYPS-----QRTSNILSDVVDLKTSLPEWVRIGFSAATG----LDIP-GESHVLSWSFA	261
L. culinaris	TYPNSLEEENVTSYTLNEVVPLKDVVPEWVRIGFSAATG----AEFA---AHEVHSWSFH	260
WBA	VFPS-----LGTIYTTIADIVDLKQVLPESVNVGFSAATGDPSPGQRNATEHDIHSWSFS	233
ECorL	VYPS-----SGAIYTTIAEIVDVKQVLPWVDVGLSGATG----AQRDAAEHVDVYSWSFQ	260
ConBR	SYPN-----GDSATVSYDVLDNLVLPWVVRVGLSASTG-----LYKETNTILSWSF	275
ConA	SYPN-----GDSATVSYDVLDNLVLPWVVRVGLSASTG-----LYKETNTILSWSF	275
	: * :. :*. * .*:*.:	: : **.*
Clone29	SRLDTPSNSKEN-----MNMASK	259
Clone13	SRLDTPSNSKKN-----MNMASK	259
Robinia	SNLETTVSVTSEN-----INIKSYA	279
PNA	STLITTTRRSIDNNEKKIMMASA-	273
P. vulgaris	SKLSDGTTSEG-LNLANLVLNKIL-	273
SBA	SNLPHASSNIDPLDLTSFVLHEAI-	285
L. culinaris	SELGGTSSSKQAADA-----	275
WBA	ASLPGTNEF-----	242
ECorL	ASLPETNDAVIPTSNHNTFAI----	281
ConBR	SKLKSNEIPDIATVV-----	290
ConA	SKLKSNEIPDIATVV-----	290
	: *	.

Figura 8.13 - Alinhamento das proteínas previstas para camptosemina com diversos integrantes das lectinas de leguminosas. A procura por identidades no banco de dados retornou similaridade seqüencial com outras lectinas de leguminosas, dentre as quais algumas foram utilizadas no alinhamento. As seqüências utilizadas foram as seguintes: **Clone29** e **Clone13**, as duas formas para a camptosemina; **Robinia**, *Robinia pseudocacia bark lectin* (Nº GenBank AB012635); **PNA**, *peanut agglutinin* (Nº GenBank S42352); **P. vulgaris**, *Phaseolus vulgaris agglutinin* (Nº GenBank AJ439563); **L. culinaris**, *Lens culinaris agglutinin* (Nº GenBank AJ318218); **WBA**, *Winged Bean agglutinin* (Nº GenBank U60765); **ECorL**, *Erythrina corallodendron lectin* (Nº GenBank X52782); **ConBR**, *Canavalia brasiliensis lectin* (Nº GenBank Y13904); **ConA**, Concanavalina A (Nº GenBank AF308777). Semelhanças entre as seqüências estão indicadas abaixo das seqüências alinhadas (* - resíduos idênticos, : - resíduos com caráter conservado, . - resíduos semi-conservados entre as seqüências). Uma seta indica o primeiro resíduo da camptosemina madura.

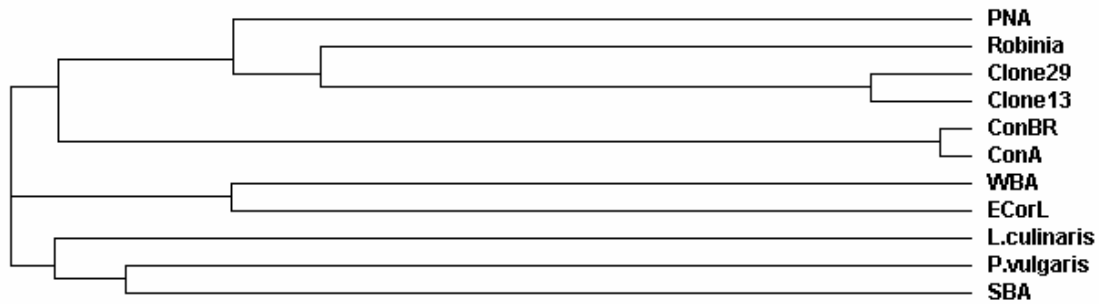


Figura 8.14 - Dendrograma construído com base nas similaridades entre as seqüências alinhadas. A similaridade entre as seqüências alinhadas foi utilizada na construção do dendrograma que situa as formas da camptosemina em um ramo à parte, este mais similar à lectina de *R. pseudocacia*, lectina tetramérica da casca de acácia-falsa que possui estrutura resolvida por difração de raios-x.

Com o alinhamento realizado, a hipótese de que a camptosemina deve possuir características semelhantes à lectina de *R. pseudocacia* foi corroborada. Além disto, a classificação da camptosemina como membro da família de lectinas de leguminosas fica comprovada.

Todas as lectinas de leguminosas, embora possuam estrutura primária relativamente variável, possuem um mesmo tipo de estruturas secundárias e terciárias, sendo classificadas como proteínas totalmente β , constituídas por três conjuntos de folhas- β antiparalelas interligadas por uma série de “loops” formando um rocambole- β típico e característico destas lectinas. Quanto à estrutura quaternária, lectinas de leguminosa podem ser encontradas na forma de monômeros, dímeros e tetrâmeros, sendo que os tetrâmeros são considerados “dímeros de dímeros”, ou seja, a associação de monômeros nas lectinas tetraméricas não obedece à simetria radial [119-122]. No caso da lectina de *R. pseudocacia*, sua estrutura foi resolvida a 1.80 Å e revela um tetrâmero formado por 2 dímeros cujos monômeros se associam por interação canônica tipo-II, X4 e outras interfaces incomuns que o tornam altamente estável. A estrutura

também foi resolvida a 2.05 Å em complexo com *N*-acetilgalactosamina, seu açúcar ligante [138].

Quanto à presença de duas formas para o cDNA da camptosemina, isto pode indicar a presença de isoformas protéicas, um fato comum entre lectinas de leguminosas [139, 140], incluindo a própria lectina da casca de *R. pseudocacia* [141], a mais semelhante à camptosemina. Neste caso, o oligômero poderia ser composto de composições diversas de subunidades monoméricas diferentes [142, 143] ou associações de um mesmo tipo de monômero [144]. A presença de subunidades monoméricas codificadas pelas duas versões de cDNA da camptosemina parece remota, visto que as formas protéicas preditas possuem pesos moleculares e principalmente pontos isoelétricos diferentes, e seriam identificáveis durante a cromatografia de troca iônica e focalização isoelétrica (dados não mostrados de Fernanda Aparecida Heleno Batista).

Uma outra forma de se explicar a presença das duas formas de cDNA, e ao mesmo tempo contemplar a ausência de duas formas protéicas seria pela produção em quantidades diferenciadas das versões previstas pelo cDNA, fato já relatado para outras lectinas de leguminosas como por instância a de *R. pseudocacia* [141, 145, 146].

Por outro lado, a presença de artefatos referentes à RT-PCR não pode ser totalmente descartada e possivelmente uma das formas então descritas para o cDNA da camptosemina poderia ser fruto da propagação de erros de amplificação ao longo dos ciclos de PCR. De qualquer forma, a informação obtida possibilita futuramente o desenho de novos conjuntos de oligonucleotídeos mais específicos para a verificação da existência de tais variantes de cDNA para a camptosemina.

8.4 - Estudos estruturais

Amostras da camptosemina purificada foram submetidas a uma série de análises espectroscópicas, com o objetivo de caracterizar o comportamento da molécula frente a parâmetros físicos como aumento de temperatura e mudança do pH. As análises foram feitas empregando dicroísmo circular (CD), técnica sensível a estruturas secundárias protéicas e fluorescência, que pode dar informações sobre a ambientação local de fluoróforos intrínsecos da proteína (resíduos de cadeia lateral aromática em geral e resíduos de triptofano de forma específica).

8.4.1 - Estabilidade térmica

Uma amostra da camptosemina a 0,2 mg/ml em tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0 foi submetida ao aquecimento de 10° C a 100° C. Medidas de CD foram registradas a cada 5° C, após uma incubação de 2 min. sob cada temperatura, como a média de 16 varreduras consecutivas através da solução (Figura 8.15).

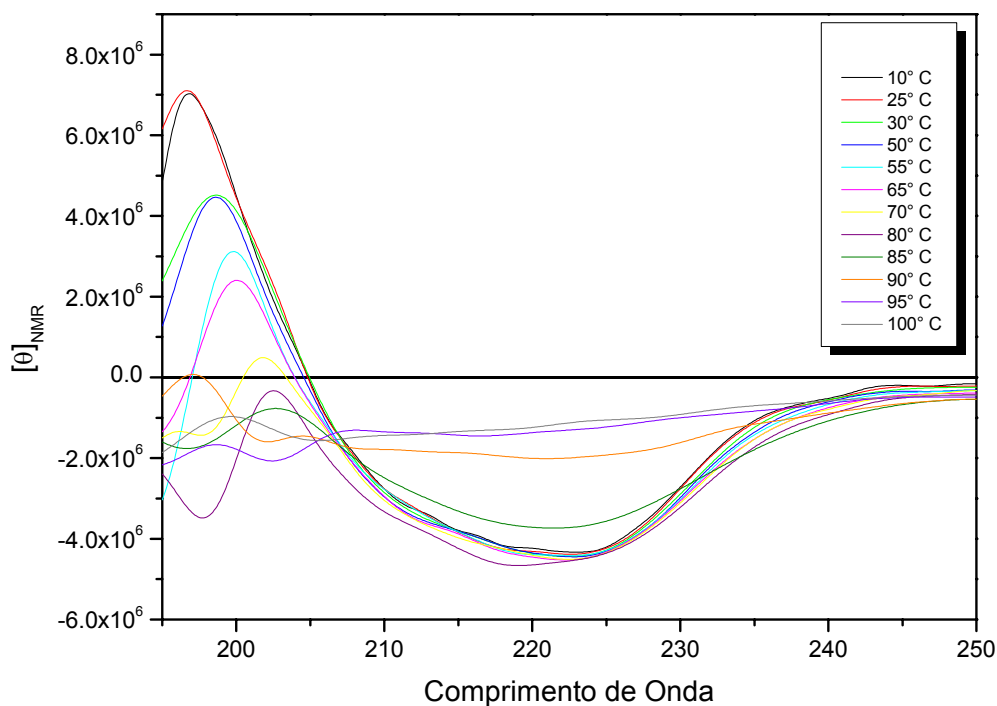


Figura 8.15 - Estabilidade térmica da estrutura secundária da camptosemina. Uma amostra da camptosemina a 0,22 mg/ml em Tris-HCl 20 mM pH 8,0 foi submetida à desnaturação térmica variando-se a temperatura de 10° C a 100° C sob divisões de 5 ° C. A cada 5° C a amostra foi incubada por 2 minutos na respectiva temperatura antes de ser medida. Todas as varreduras foram convertidas para elipticidade molar do resíduo médio. Apenas algumas das medidas estão demonstradas para melhor visualização.

A proteína possui um perfil característico de folhas- β , com uma banda negativa em torno dos 223 nm. Analisando-se o perfil ao longo da curva de aquecimento observa-se a diminuição de intensidade e deslocamento de uma banda positiva próxima aos 200 nm mantendo-se o restante do perfil espectroscópico basicamente inalterado até os 85° C, quando todo o espectro começa a sofrer uma diminuição geral na intensidade de suas bandas de CD. A região próxima aos 200 nm é susceptível a ruídos nas medidas e como o resto do espectro varia pouco, talvez não seja uma região adequada para se correlacionar o envelhecimento global da camptosemina. De acordo com esta banda aos 200 nm, existem 5 grupos de espectros semelhantes ao longo do aquecimento, compreendidos entre as temperaturas: 10-25° C, 30-50° C, 55-65° C, 70-80° C e 85-

100° C. Já a banda negativa aos 223 nm, característica de estruturas majoritariamente β como se espera para a camptosemina, sofre mudanças ao longo do aquecimento simultaneamente às mudanças generalizadas no espectro de CD. Assim sendo, esta banda foi monitorada para a construção de uma curva de desnaturação em função do aumento de temperatura. Para a construção da curva, os dados referentes às varreduras sob o comprimento de onda destacado foram normalizados e representados como porcentagem de desnaturação (Figura 8.16).

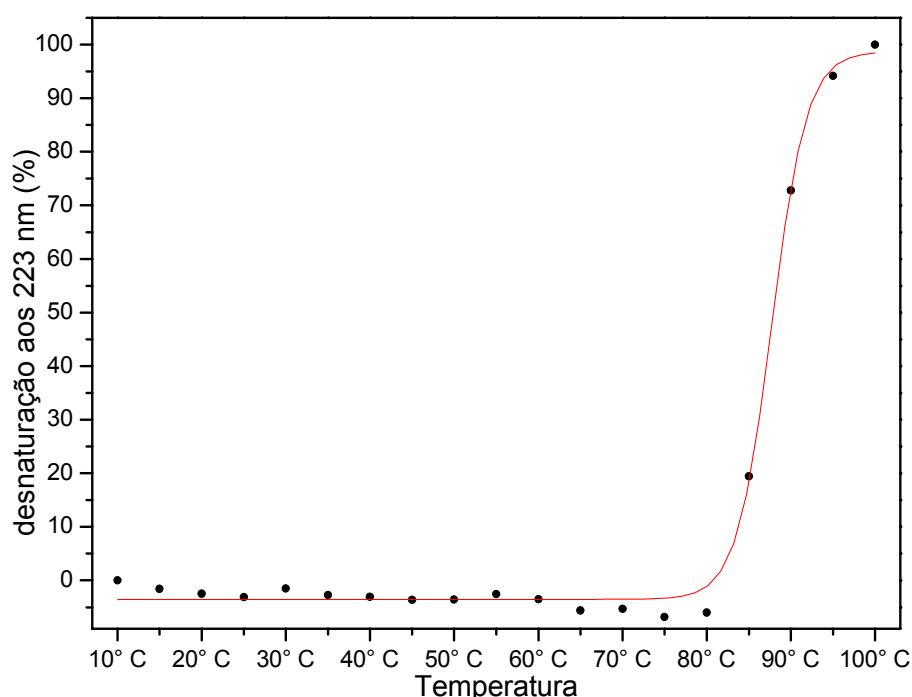


Figura 8.16 - Transição de fase de desenovelamento da camptosemina por aumento de temperatura ao CD. A banda negativa a 223 nm dos espectros de varredura de CD sob diferentes temperaturas foi analisada a cada temperatura e normalizada em função da porcentagem de desnaturação. Os pontos representam os valores obtidos e em vermelho a curva teórica ajustada para as medidas. Os gráficos revelam uma temperatura de “melting” de 87,73° C, supondo-se uma transição de apenas duas fases em que se supõe 100% de desnaturação aos 100° C.

A análise da curva obtida não indica a presença de intermediários estáveis ao longo da desnaturação térmica da camptosemina, pois é composta por apenas duas fases, uma onde a maior parte das moléculas está enovelada e outra onde está desnaturada. Assumindo-se 100% de desnaturação aos 100° C, a temperatura em que

50% das moléculas estão enoveladas e as restantes desnaturadas (temperatura de “*melting*” ou transição de fases) é estimada em 87,73° C para as condições medidas, uma temperatura extremamente alta, indicando uma molécula altamente estável. Ressalte-se aqui a suposição de que a molécula está na fase desenovelada aos 100° C, visto que foi o único ponto supostamente representativo desta situação. Talvez a camptosemina ainda se mantenha com certo grau de estruturação aos 100° C e nesta possibilidade, temperaturas mais altas ainda seriam necessárias para a completa desestruturação da camptosemina, isto devido a não observação de um platô representativo de medidas consecutivas da proteína totalmente desnaturada. Resultante disto, a temperatura de “*melting*” outrora determinada para camptosemina torna-se um parâmetro questionável visto a arbitrariedade na determinação da desnaturação térmica da proteína. Ainda assim, fato notável é a extrema estabilidade estrutural da camptosemina frente ao aumento de temperatura, que segundo as medidas de CD, indicam que sua estrutura secundária deve manter-se relativamente constante até os 80° C. Alguns dos espectros de CD ao longo do aquecimento foram desconvoluídos pelos programas do CDPro [89-92], utilizando-se do banco de dados de 56 proteínas nas temperaturas de 10° C até 85° C (Tabela 8.1). Acima desta temperatura, os programas SELCON3 e CDSSTR não foram capazes de chegar a uma solução, indicando que a camptosemina possui então um espectro de proteína desenovelada não presente no banco de dados e/ou sinal tão baixo que impossibilitou a obtenção de uma resposta. Nestas temperaturas foi então utilizado o banco de dados contendo 48 proteínas (43 solúveis + 5 desnaturadas) e desta forma foi possível a obtenção de respostas, embora o programa SELCON3 não tenha chegado ao final de seu algoritmo, obtendo-se então uma resposta parcial (<http://lamar.colostate.edu/~sreeram/CDPro/>). O algoritmo CLUSTER [92] identificou com “*score*” 4 a camptosemina como proteína toda β , como

o esperado. As médias entre as respostas obtidas pelos programas são apresentadas a seguir:

Temperatura \ Estrutura (%)	α	β	<i>Turn</i>	<i>Unrd.</i>
10° C	6,8	39,6	21,9	30,8
30° C	5,6	37,6	23,6	32,7
55° C	2,5	35,2	25,2	36,2
70° C	4,9	34,6	23,3	34,9
80° C	4,8	30,8	23,6	40,6
90° C	2,5	25,8	20,9	50,5
95° C	2,2	25,6	19,1	53,0
100° C	3,2	26,4	20,1	51,3

Tabela 8.1 - Desconvolução dos espectros de CD da camptosemina em diferentes temperaturas. Os espectros obtidos foram analisados com os programas do pacote CPro, SELCON3, CDSSTR e CONTINLL para a análise de frações de estruturas secundárias. α e β denotam a contribuição percentual média entre os três algoritmos usados na desconvolução em estruturas tipo alfa-hélice e folha-beta, respectivamente. *Unrd* indica as contribuições de estruturas não ordenadas.

A desconvolução dos espectros indica que se aumentando a temperatura de 10 a 55° C há conversão de elementos de estrutura secundária ordenada em elementos desordenados e do tipo “*Turn*”. Aos 70° C a camptosemina volta a se estruturar, assumindo um outro balanço entre estruturas secundárias ordenadas e desordenadas diferente do inicial. Desta temperatura em diante, a proteína vai perdendo estruturas do tipo hélice- α , folha- β e “*Turn*” e simultaneamente aumentando seu conteúdo de estruturas desordenadas até que cerca de 50% (aos 90° C) de se sua estrutura seja composta por estruturas desordenadas. Isto pode ser interpretado como oscilações na estrutura protéica entre as temperaturas de 10-80° C e desnaturação acima dos 80° C.

Sabe-se que a camptosemina em pH fisiológico se agrega na forma de um oligômero de forma que poderia se encontrar intermediários relativos à separação de suas subunidades, o que não foi possível pelo experimento. Talvez outras técnicas possam revelar a possível presença destes ou descartá-los como intermediários de

desenovelamento térmico. Assim sendo, a condição de aquecimento foi repetida agora sob análise da espectroscopia de fluorescência.

Amostras da camptosemina a 0,1 mg/ml em tampão acetato-borato-fosfato 20 mM pH 8,0 foram submetidas ao aquecimento sendo excitadas aos 280 nm (Figura 8.17 A) e 295 nm (Figura 8.17 B). A cada 5° C as amostras foram incubadas por 5 min. antes da varredura da intensidade de emissão na faixa de 300-450 nm.

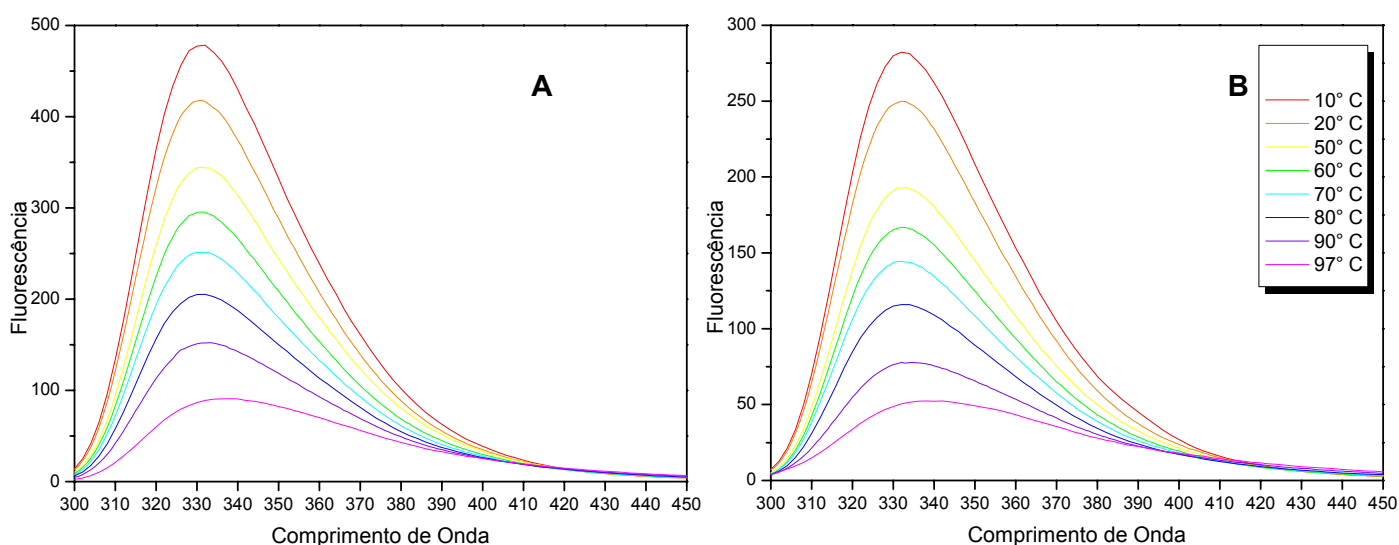


Figura 8.17 - Espectros de emissão de fluorescência ao longo da desnaturação térmica. Amostras da camptosemina a 0,1 mg/ml foram submetidas à análise por fluorescência estática de emissão ao longo de uma rampa de aquecimento. **A)** Emissão de fluorescência sob excitação em 280 nm; **B)** Emissão de fluorescência sob excitação em 295 nm. Cada varredura foi realizada após incubação por 5 min. na temperatura da medida. As temperaturas estão indicadas na legenda e obedecem aos mesmos padrões de cores em **A** e **B**. Apenas algumas das temperaturas medidas estão representadas.

Sob excitação em 295 nm, apenas os resíduos de triptofano exibem fluorescência e com base no comprimento do máximo de emissão da camptosemina nativa em torno dos 330 nm, estes resíduos devem estar inacessíveis ao solvente. Os espectros de emissão da camptosemina mostram uma diminuição na intensidade conforme o aumento de temperatura, com um deslocamento do comprimento de onda do máximo de emissão para os 340 nm sob as temperaturas mais altas. Tal deslocamento, sob excitação em 295 nm, pode ser relacionado com a exposição de resíduos de triptofano

ao solvente, decorrente do desenovelamento protéico. O mesmo é válido para os espectros obtidos sob excitação em 280 nm no qual a fluorescência é dada por todos os resíduos com cadeias laterais aromática. Como dois fatores diferentes variam ao longo da desnaturação (intensidade e máximo de emissão), seria interessante que a informação referente a mudanças no ambiente dos fluoróforos pudesse vir dos dois fatores. Assim, a primeira derivada das curvas de emissão obtidas, uma aproximação do centro de massa das curvas, que privilegia ambas intensidade e posição do máximo através da forma da curva, foi utilizada como parâmetro para a construção de curvas de desnaturação térmica (Figura 8.18).

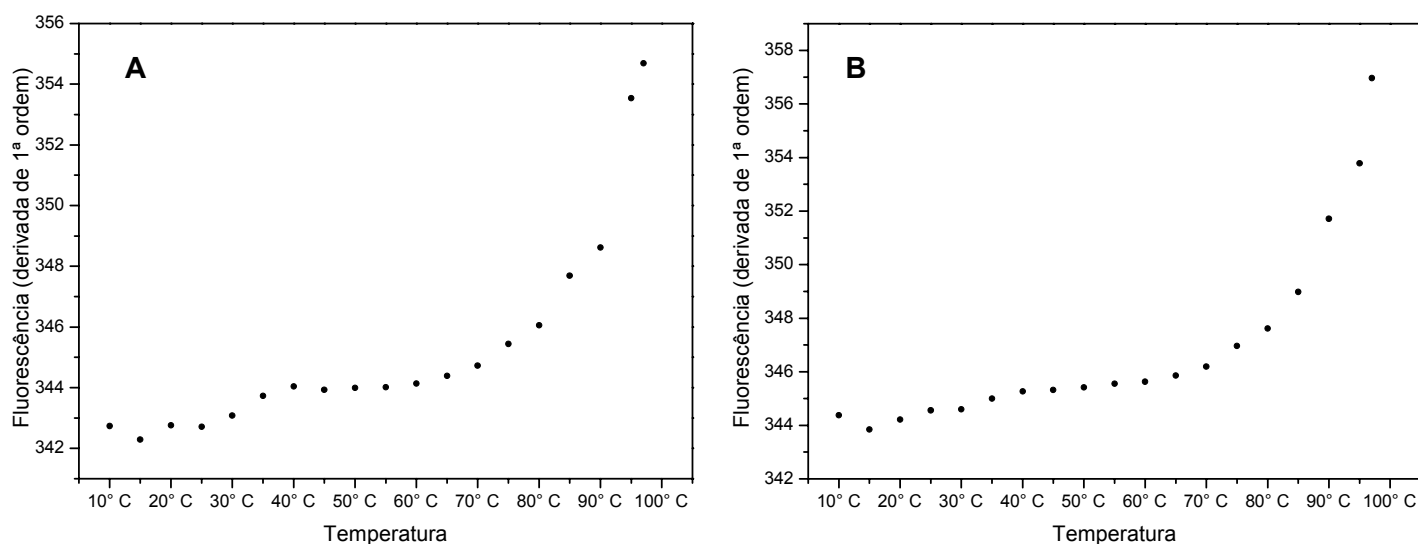


Figura 8.18 - Transição de fase de desenovelamento da camptosemina por aumento de temperatura examinada por emissão de fluorescência. As derivadas de primeira ordem dos espectros de emissão de fluorescência da camptosemina em função de variação de temperatura foram utilizadas para a construção de curvas de desnaturação. **A)** Dados provenientes de excitação da amostra em 280 nm; **B)** Dados obtidos sob excitação em 295 nm. O ponto respectivo à temperatura mais alta de ambos os gráficos equivale a medidas a 97° C, limite máximo de aquecimento do equipamento.

A análise dos dados obtidos sob ambas excitações revelam um comportamento muito semelhante das amostras, com uma relativa estabilidade até os 65° C, quando se inicia uma modificação mais significativa do perfil. Entretanto, a ambientação geral dos resíduos aromáticos (Figura 8.18 A) revela uma pequena transição em torno dos 30° C,

menos acentuada sob o ponto de vista dos resíduos de triptofano (Figura 8.18 B). Isto pode significar que resíduos aromáticos, mais amplamente distribuídos na proteína do que triptofanos estão em interfaces de interação entre monômeros da camptosemina e que a dada temperatura, certas interações são desfeitas, resultando em mudanças no ambiente destes resíduos. Já os resíduos de triptofanos, monitorados pela excitação em 295 nm, podem estar distribuídos fora destas interfaces, encerrados pelo enovelamento do monômero, de forma que seus ambientes médios não mudam na dada temperatura.

Os ensaios foram repetidos na presença de 10 mM de DTT, como agente redutor, com o objetivo de se verificar a possibilidade de pontes dissulfeto intra-cadeia (Figura 8.19).

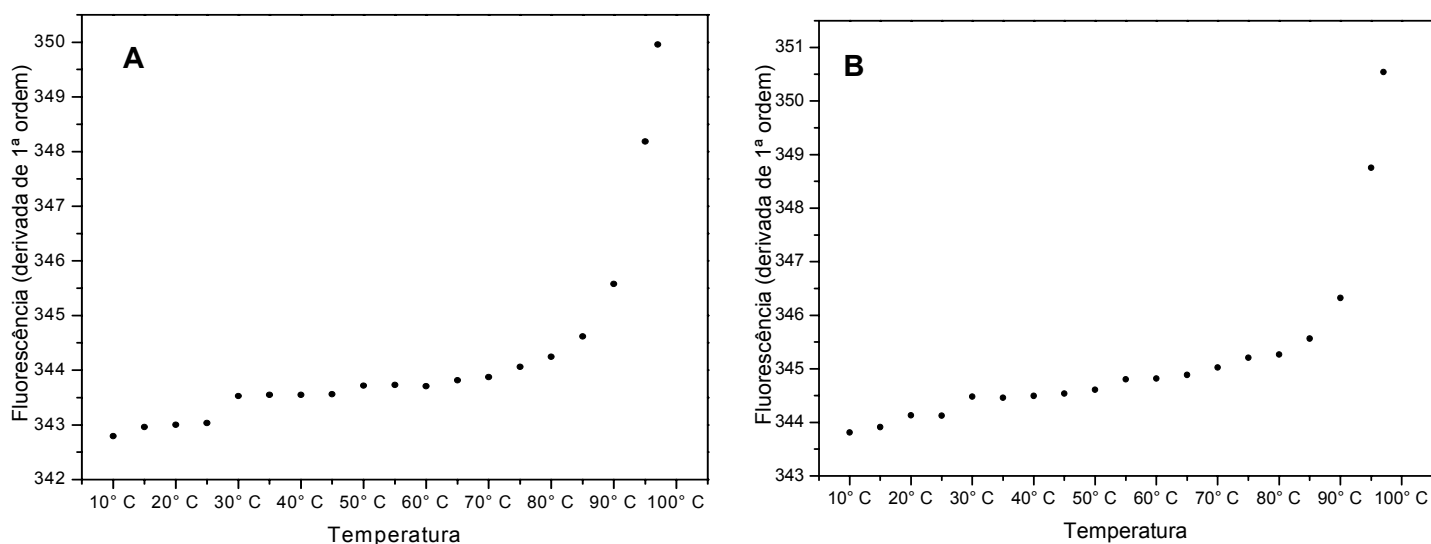


Figura 8.19 - Transição de fase de desenovelamento da camptosemina por aumento de temperatura examinada por emissão de fluorescência em ambiente redutor. As derivadas de primeira ordem dos espectros de emissão de fluorescência da camptosemina em função de variação de temperatura foram utilizadas para a construção de curvas de desnaturação. **A)** Dados provenientes de excitação da amostra em 280 nm; **B)** Dados obtidos sob excitação em 295 nm. O ponto respectivo à temperatura mais alta de ambos os gráficos equivale a medidas a 97° C, limite máximo de aquecimento do equipamento. O aquecimento foi realizado da mesma forma que anteriormente descrito, com a única diferença sendo a adição de 10 mM de DTT à solução.

Nos ensaios em ambiente redutor, foi encontrado o mesmo perfil geral descrito na ausência de DTT, de forma que a presença de pontes dissulfeto intra-cadeias foi descartada.

Um parâmetro a ser considerado diante das curvas obtidas, seria a correlação ou não do estado de oligomerização com alguma região de transição. A análise ao CD indica perda significativa de estrutura a partir dos 85° C, enquanto que a maior mudança no perfil de fluorescência ocorre de uma forma mais gradual sendo mais proeminente a partir dos 70° C. Talvez a camptosemina em sua forma nativa oligomérica possa se dissociar em subunidades de menor tamanho antes que haja a desnaturação de cada monômero, prevista para a faixa entre 85° C-100° C pelo dicroísmo circular. Para esta verificação, amostras da camptosemina foram submetidas ao aquecimento sob o modo de aquisição de dados de polarização de fluorescência, no qual se obtém leituras de anisotropia da solução protéica (Figura 8.20).

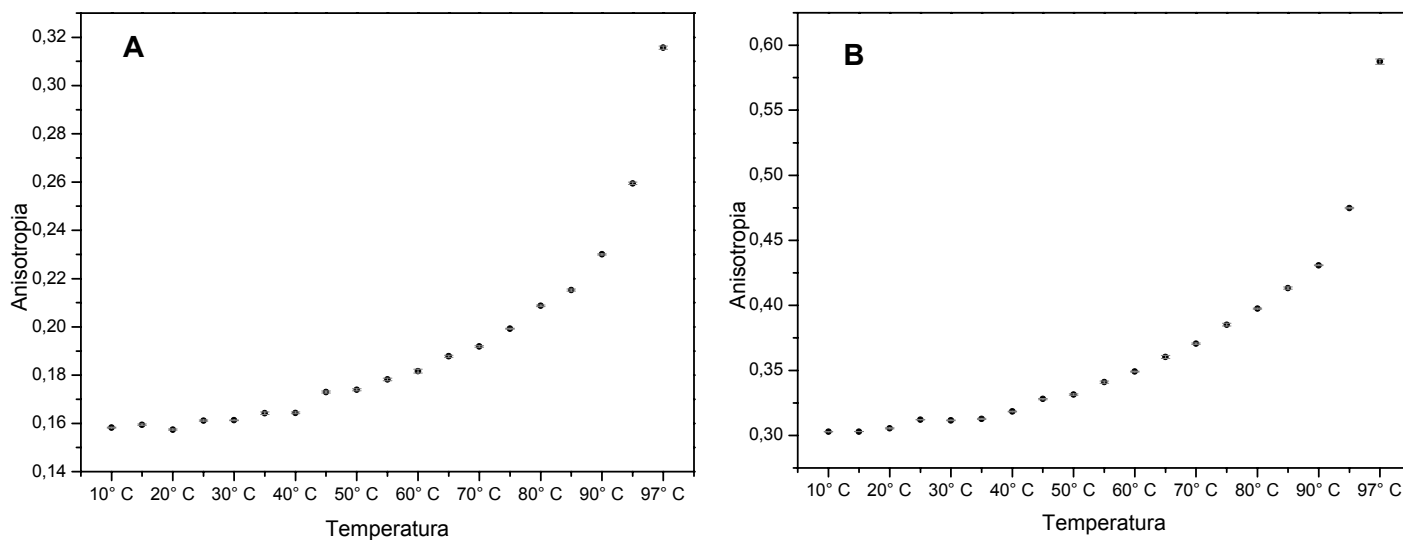


Figura 8.20 - Transição de fase de desenovelamento da camptosemina por aumento de temperatura examinada por fluorescência polarizada. A) Anisotropia proveniente de excitação da amostra por luz polarizada em 280 nm; **B)** Anisotropia proveniente de excitação da amostra por luz polarizada em 295 nm. O ponto respectivo à temperatura mais alta de ambos os gráficos equivale a medidas a 97° C. Todas as medidas são apresentadas como a média de 10 varreduras consecutivas das amostras. Barras de erro representam variações absolutas encontradas para cada conjunto de varreduras.

A anisotropia das soluções é inversamente proporcional ao tamanho das moléculas em solução, e tendo como base os resultados obtidos, há uma diminuição gradual no raio de giro da camptosemina em solução ao longo do aquecimento, tanto sob o ponto de vista da distribuição dos resíduos aromáticos, quanto em relação somente aos resíduos de triptofano. Isto significa que a transição medida pela fluorescência da camptosemina ao longo do aquecimento deve ser respectiva a um rearranjo de seus monômeros, com uma diminuição no tamanho de seu oligômero, culminando na desnaturação dos seus protômeros. Entretanto, o exame de anisotropia não identificou intermediários (dímeros ou trímeros, por exemplo) estáveis dentro de alguma faixa de temperatura, o que leva à hipótese de que a associação entre moléculas no oligômero é tão estável que a dissociação em seus monômeros por aquecimento só é possível com a desnaturação destes. Outra hipótese pode ser a de que a molécula preferencialmente oligomérica possa existir em equilíbrio dinâmico com outras associações de menor tamanho de forma que as medidas correspondem à anisotropia média destas moléculas em dada temperatura. De qualquer forma, os dados referentes à desnaturação térmica indicam a seguinte ordem de eventos: 10-30° C, oligômero nativo → 35-80° C, rearranjo dos protômeros com oscilações nos conteúdos de estrutura secundária e com diminuição do tamanho do oligômero (com liberação ou não de subunidades protéicas) → 85-100° C, desnaturação da proteína com possível dissociação total do oligômero em monômeros.

A PNA (*peanut agglutinin*), lectina de leguminosa homotetramérica, por exemplo, mantém sua estrutura oligomérica até os 50° C, se dissociando em monômeros ainda enovelados aos 56° C, e finalmente desenovelando-se totalmente aos 63° C [147]. A SBA (*soy bean agglutinin*) em pH fisiológico se mantém tetramérica dos 10-50° C, e em pH 1,9, se dissocia em monômeros estáveis dos 10-35° C [148]. Lectinas de

leguminosas são consideradas proteínas estáveis tanto sob o ponto de vista estrutural quanto funcional e a maioria delas se mantém ativa em temperaturas até os 50-55° C. A maioria destas lectinas é irreversivelmente inativada em temperaturas acima dos 60-65° C [138]. Entretanto, lectinas de leguminosas podem se mostrar como estruturas protéicas ainda mais resistentes, mantendo estáveis até os 75-85° C, como no caso da lectina de *Dolichos biflorus* [149].

8.4.2 - Mudanças estruturais em função do pH

A camptosemina foi examinada quanto a seu comportamento em diferentes valores de pH na faixa de 2-12. Amostras da camptosemina foram medidas por CD a 0,2 mg/ml em tampão acetato-borato-fosfato 20 mM ajustado para diferentes valores de pH (Figura 8.21).

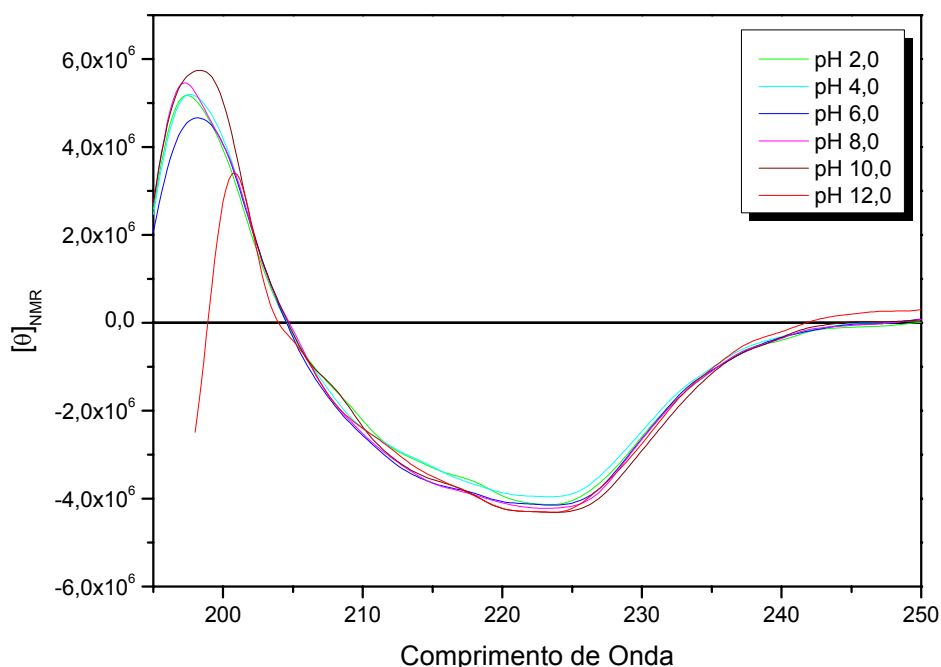


Figura 8.21 - Influência do pH no espectro de CD da camptosemina. Amostras da camptosemina (0,22 mg/ml) em tampão acetato-borato-fosfato 20 mM ajustado para diferentes valores de pH. Medidas foram realizadas em uma cubeta de 0,1 cm de caminho óptico à temperatura ambiente e registradas como uma média de 16 varreduras. Os valores de pH de cada medida estão indicados por linhas em cores diferentes. Sob pH 12,0 a medida foi reduzida ao intervalo de comprimento de onda de 250 nm a 198 nm por limitações do equipamento.

Os dados obtidos demonstram um espectro de CD essencialmente constante nos diferentes valores de pH, indicando que a estrutura secundária da camptosemina se mantém basicamente inalterada independente do pH da solução. Alguma mudança no espectro é detectada na região próxima aos 200 nm, entretanto esta região possui um conteúdo ruidoso e talvez não seja adequada para a análise. Análises por fluorescência poderiam ser mais sensíveis às possíveis mudanças na estrutura da camptosemina, ou então confirmar que a estrutura seja tão estável.

Amostras da camptosemina a 0,1 mg/ml em tampão acetato-borato-fosfato ajustado para os diferentes pHs (os mesmos utilizados nas medidas de CD) foram utilizadas para ensaios de emissão de fluorescência sob excitação em 295 nm (Figura 8.22).

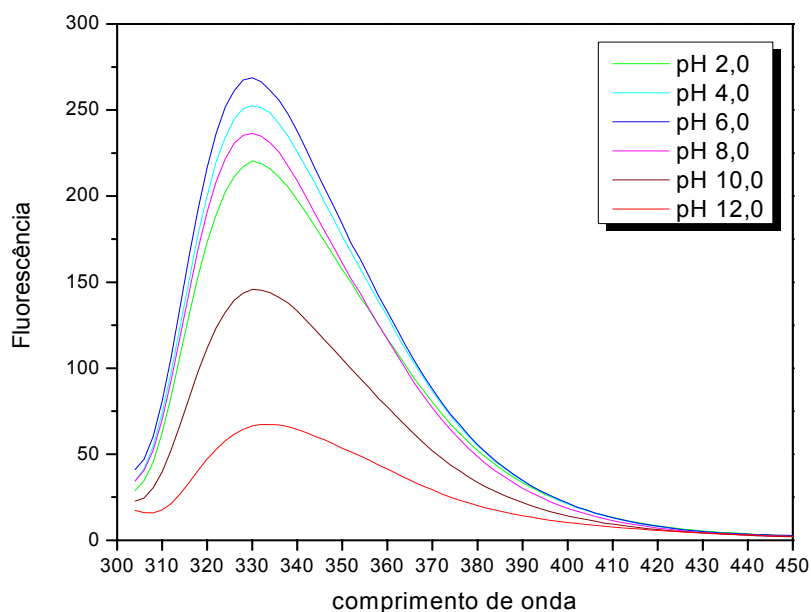


Figura 8.22 - Fluorescência estática da camptosemina sob diferentes pHs. Amostras da camptosemina a 0,1 mg/ml em tampão acetato-borato-fosfato 20 mM foram submetidas à fluorescência estática sob excitação em 295 nm. As medidas foram realizadas a temperatura ambiente em uma cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico.

A análise de emissão de fluorescência sob diferentes pHs revela um máximo de emissão em 330 nm para todos os espectros obtidos, com variação em sua intensidade de emissão dependendo do pH em que foi realizada a medida. O máximo de emissão em

330 nm indica que resíduos de triptofano devem estar em um ambiente não exposto ao solvente. Como não houve deslocamento no comprimento de onda do máximo de emissão, verifica-se que o ambiente nas vizinhanças de resíduos de triptofano não foi alterado com a exposição da molécula a diferentes pHs. Quanto às oscilações nas intensidades de emissão, estas não parecem demonstrar correlação apreciável com mudanças conformacionais, podendo neste caso ser atribuídas a efeitos de supressão associados a diferentes composições dos tampões. Em resumo, a camptosemina parece mostrar-se com estruturas secundárias e terciárias relativamente constantes em toda a faixa de pHs examinados. Entretanto, isto não significa que sua estrutura quaternária, ou seja, seu grau de oligomerização não possa ser afetado pela exposição aos diferentes pHs.

Lectinas de leguminosas oligoméricas ocorrem na natureza como estruturas diméricas ou tetraméricas e cuja estrutura quaternária pode ser modulada pelo pH da solução. Um exemplo para este controle de estado oligomérico é dado pela concanavalina A (ConA), que se mostra tetramérica em pHs acima de 7,0 e dimérica abaixo do pH 5,0, vindo a se dissociar totalmente em monômeros em 8M de uréia [150]. Entretanto os tetrâmeros da aglutinina de grão de soja (SBA) e a leuco-aglutinina de *P. vulgaris* (PHAL) não são dissociáveis por pH [151, 152]. Digno de nota é a extrema estabilidade da aglutinina de *R. pseudocacia*, a mais semelhante à camptosemina, que se mantém tetramérica na faixa de pH de 2-12 e sob uréia 8M ou mesmo cloreto de guanidina 6M, vindo a se dissociar em monômeros somente pela adição de SDS [138].

A atividade hemaglutinante destas proteínas está intimamente associada com o estado oligomérico nativo, pois cada monômero deste tipo de lectina possui um único sítio de ligação a carboidratos e desta forma, monômeros em solução não podem se ligar

a dois eritrócitos simultaneamente causando a hemaglutinação. Desta forma, lectinas de leguminosas são classificadas funcionalmente como hololectinas [116].

Uma forma de se examinar a influência do pH ambiental na sua oligomerização é através de medidas da anisotropia através de fluorescência polarizada. Amostras da camptosemina a 0,02 mg/ml em tampão 20 mM de acetato-borato-fosfato ajustado para diversos pHs foram submetidas à análise de anisotropia por fluorescência polarizada em 280 nm e 295 nm de excitação (Figura 8.23).

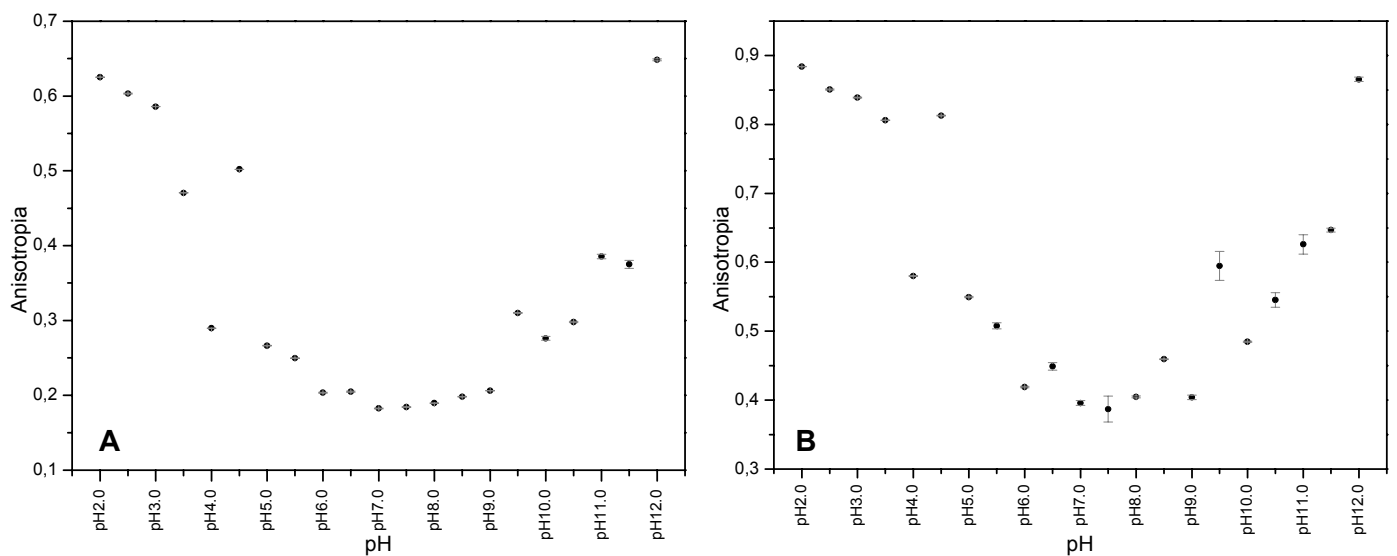


Figura 8.23 - Fluorescência anisotrópica em diferentes pHs. Amostras da camptosemina a 0,02 mg/ml em tampão acetato-borato-fosfato 20 mM foram submetidas à fluorescência de anisotropia sob excitação polarizada de 280 nm (A) e 295 nm (B). As medidas foram realizadas a temperatura ambiente em uma cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Cada medida é a representação média de 10 varreduras sobre a amostra. Barras de erro indicam as variações absolutas dentro de cada amostragem.

Os dados revelam que a camptosemina em solução possui populações de moléculas com graus de anisotropia diferentes dependendo do pH ambiental. Podem-se destacar dois grupos: um de anisotropia mais baixa compreendendo a faixa de pH 5-10 e outro de anisotropia mais alta presente nos pHs extremos (de 2,0 a 3,5 e em 12). Ambos os tipos possuindo alguma variação dentro de suas faixas, com populações de anisotropias intermediárias entre cada faixa. A variação em anisotropia é inversamente

proporcional ao raio da distribuição de resíduos fluorescentes por tipo molecular em percussão aleatória na solução [153, 154], e pode indicar rearranjos dos protômeros componentes do oligômero da camptosemina, ou seja, sua estrutura quaternária. Cada tipo anisotrópico relaciona-se com um tamanho de associação macromolecular e isto pode ser interpretado de diferentes formas. A camptosemina poderia se dissociar em estruturas menores (monômeros e dímeros, por exemplo) e cada tipo possuiria uma anisotropia típica, semelhante ao encontrado para a ConA [150]. Entretanto, os valores encontrados demonstram apenas duas classes predominantes de anisótropos, portanto parece pouco provável (embora não impossível) que a camptosemina possua mais de duas populações de formas de associação, assim como o encontrado para a SBA [148]. Em outra interpretação, a camptosemina possuindo apenas duas classes de oligomerização, poderia existir num equilíbrio dinâmico que seria controlável pelo pH da solução, de forma que as variações encontradas entre os dos tipos extremos de anisótropos seriam resultantes da leitura da anisotropia média dada pelas contribuições destas duas formas [148]. Estas classes poderiam ser tipos de oligômeros preferenciais, ou então rearranjos nas associações do oligômero nativo. Uma observação interessante que vale ressaltar é que os valores máximos de anisotropia associados à mudança de pH estão razoavelmente acima dos máximos de anisotropia obtidos pelas medidas associadas ao aumento de temperatura. Nota-se, entretanto que, os valores de anisotropia da população na faixa de pH 5-10 (Figura 8.23) são coincidentes com aqueles obtidos pelas medidas sob aumento de temperatura (Figura 8.20), de forma que estes devem retratar os mesmos tipos de organização estrutural. Isto poderia indicar também que aos 97° C não houve desnaturação completa da camptosemina.

Amostras da camptosemina nos diferentes pHs foram submetidas à análise por SDS-PAGE (Figura 8.24) após incubação por 30 min. a temperatura ambiente, na

tentativa de se distinguir os diferentes representantes das classes anisotrópicas previstas pela fluorescência polarizada.

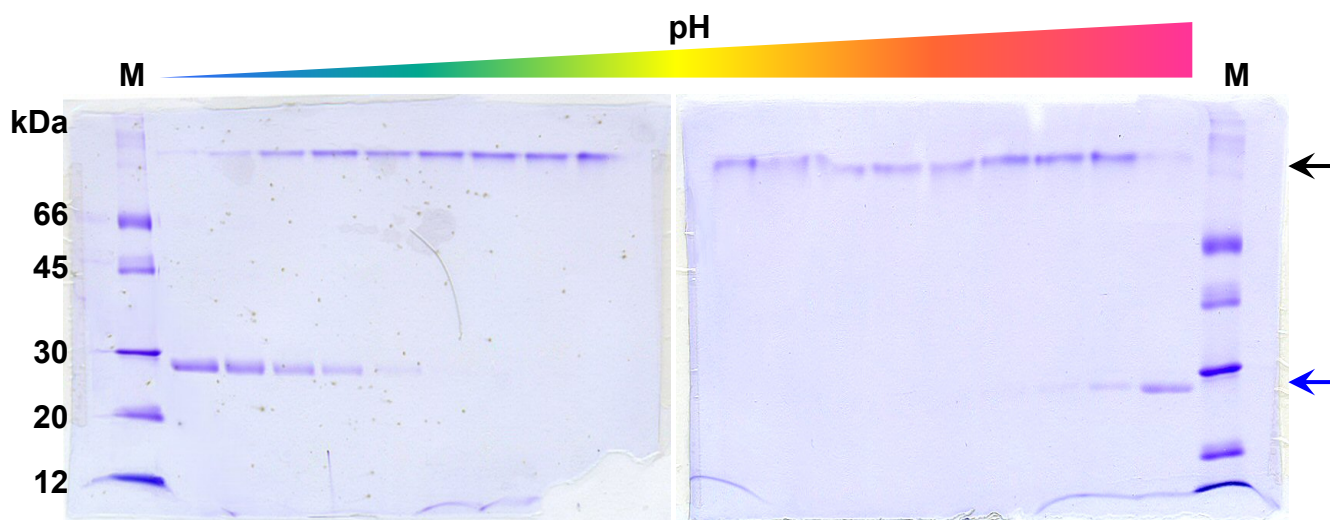


Figura 8.24 - Análise eletroforética da camptosemina em diferentes pHs. Amostras da camptosemina foram incubadas por 30 min. à temperatura ambiente em tampões acetato-borato-fosfato 20 mM ajustados em diferentes pHs. **M)** Padrões de massa molecular; À esquerda, amostras em pHs de 2,0-6,0 em subdivisões de 0,5 pH; À direita, amostras em pHs de 8,0-12,0 em subdivisões de 0,5 pH. A gradação de pHs é esquematizada acima, com pHs mais ácidos em cores mais frias e pHs mais alcalinos em cores mais quentes. Uma seta azul indica a banda respectiva à camptosemina monomérica e uma seta negra indica a camptosemina oligomérica.

A análise eletroforética da camptosemina em diversos pHs revela a proteína somente em duas classes de estrutura quaternária: o monômero em maior abundância nos pHs extremos, e o oligômero, como forma prioritária na faixa de pH intermediário. Os dados são concordantes com os obtidos pela análise anisotrópica (Figura 8.23) e indicam que as anisotropias intermediárias entre os dois grupos anisotrópicos principais devem ser resultado da anisotropia média entre moléculas com o grau de oligomerização nativo e monômeros da camptosemina. Entretanto, a existência de subespécies de oligomerização (dímero e trímeros, por exemplo) não pode ser totalmente descartada (embora pareça improvável), pois o comportamento eletroforético da camptosemina pode não ser exatamente o mesmo da proteína em solução. Assumindo-se a inexistência de outras subespécies de oligomerização (dímeros ou

trímeros) e correlacionando-se os valores de anisotropia da variação de pH (Figuras 8.23 e 8.24) com os encontrados para a variação de temperatura (Figuras 8.16, 8.17, 8.18 e 8.20), encontra-se que os valores encontrados no aquecimento são relativos a algum grau de oscilação do oligômero nativo, e não à dissociação deste em subunidades monoméricas. Tal oscilação pode ocorrer como observado no caso dos diferentes arranjos dos monômeros nos tetrâmeros de diferentes estruturas cristalográficas resolvidas para a ConA [125-128]. Assim, a variação de anisotropia relacionada com a diminuição de tamanho ao longo do aquecimento do oligômero não deve estar majoritariamente relacionada com a separação de monômeros. Entretanto, novamente isto é válido em se assumindo os dados referentes ao SDS-PAGE em pHs diferentes como um retrato fiel do comportamento da estrutura quaternária da camptosemina. Talvez, a eletroforese não seja capaz de detectar intermediários ou mesmo quantidades muito pequenas da camptosemina monomérica presente em equilíbrio com o oligômero da camptosemina em pH fisiológico. Mesmo que isto ocorra e não seja possível a visualização direta destas duas hipóteses nos experimentos realizados, é possível afirmar que a camptosemina se apresenta preferencialmente sob forma oligomérica na faixa de pH fisiológico. Além disto, devido à correlação destes resultados com a variação térmica, o oligômero da camptosemina mostra-se muito estável (Figura 8.25) e o monômero aparentemente mantém sua estrutura relativamente constante nos diversos pHs estudados (Figuras 8.21 e 8.22).

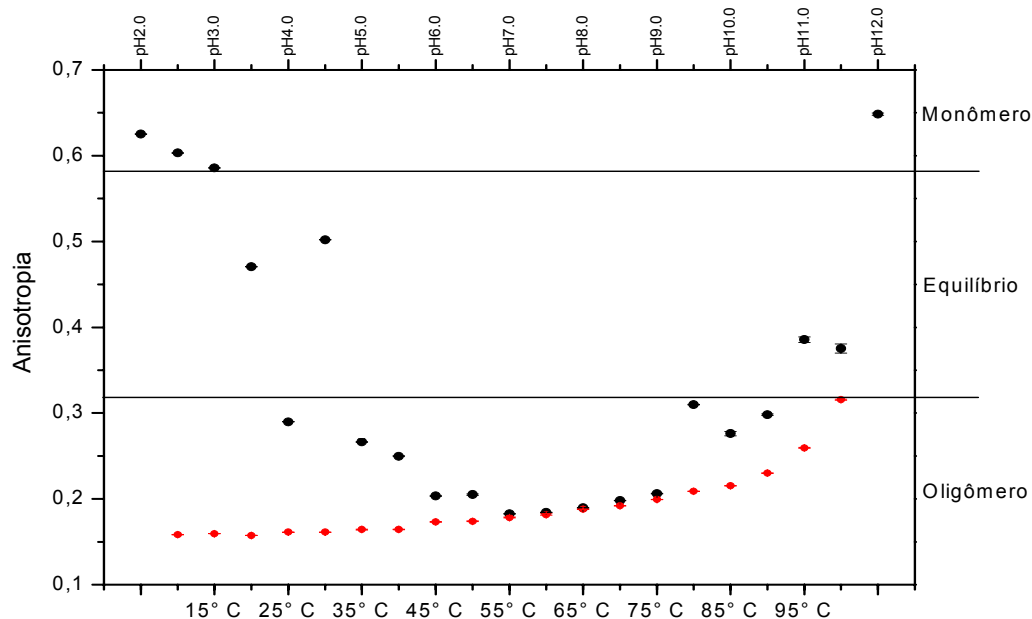


Figura 8.25 - Proposta de oligomerização analisada por anisotropia em 280 nm da camptosemina em função do pH (preto) e da temperatura (vermelho). O ponto referente a 97° C foi incluído na população primariamente oligomérica por não se equiparar em anisotropia ao monômero esperado. Um ponto referente ao pH 4,0 foi considerado como dado não confiável e foi eliminado.

Tomando o conjunto de dados obtidos o modelo acima foi construído usando como parâmetro a anisotropia das amostras por fluorescência polarizada em 280 nm. O ponto a 97° C foi incluído como pertencente à camptosemina oligomérica, pois a variação na anisotropia não foi comparável com o patamar de medidas de populações monomérica, como o esperado para a proteína completamente desnaturada. Por outro lado, análises ao CD indicam que a perda de estrutura secundária deve se iniciar em torno dos 85° C, (Figuras 8.15 e 8.16) possivelmente chegando a 100% de desnaturação aos 100° C (relembrando a observação de que não foi possível a determinação de um patamar referente a medidas da camptosemina desnaturada), temperatura na qual se esperaria total dissociação de moléculas da camptosemina desnaturada. O deslocamento no máximo de emissão de fluorescência só foi detectado em torno dos 95° C (Figura 8.17). Medidas de fluorescência aos 100° C não foram feitas devido a impossibilidades do equipamento, mas talvez nesta temperatura fosse possível a leitura de anisotropia esperada para o monômero. Ainda assim, desconsiderando leituras acima dos 85° C,

alguma oscilação no tamanho do oligômero foi constatada, sem contudo demonstrar grande variação no seu perfil de CD (Figura 8.15), que também é o mesmo tanto para oligômero quanto para o monômero (Figuras 8.21 e 8.24). Isto, somado à aparente ausência de dímeros e trímeros, leva a hipóteses sobre a origem desta oscilação abaixo dos 85° C. Em uma delas, a camptosemina deve manter-se em equilíbrio dinâmico, deslocado em favor do oligômero entre formas oligoméricas e monoméricas, como no caso da SBA [148], sendo a variação fruto da anisotropia média entre a quantidade de monômeros e oligômeros. Em outra hipótese, descartando a dissociação em monômeros na faixa considerada (coerente com a análise em SDS-PAGE) a pequena flutuação pode ser considerada resultante do rearranjo das unidades monoméricas dentro do oligômero, sem contudo dissociá-lo, como o observado para a ConA [120, 125-128]. Considerando-se estas duas hipóteses, uma não obrigatoriamente exclui a influência da outra podendo na verdade ser uma composição de rearranjos com dissociações sob equilíbrio.

Independente de qual situação explique a pequena variação da população de menor anisotropia, os resultados ainda demonstram claramente uma maior distância anisotrópica entre os tipos macromoleculares oligoméricos e monoméricos e a proximidade em seqüência primária com a lectina de *R. pseudocacia* reforça que a camptosemina nativa seja também um tetrâmero. Além disto, ao SDS-PAGE o oligômero não é comparável a um dímero e não há registro de outros tipos de associações oligoméricas para lectinas de leguminosas provenientes de plantas (existem proteínas semelhantes às lectinas de leguminosas pentaméricas como a pentraxina [122]).

Como a oligomerização da camptosemina é controlável pelo pH, é natural a suposição de que resíduos de aminoácidos com cadeias laterais protonáveis tenham um

papel importante na associação quaternária. Tendo isto em vista, pode-se prever a carga eletrostática global da proteína monomérica em diferentes pHs para tentar se correlacionar com os dados obtidos. Assim, as duas seqüências previstas para a camptosemina madura (Figura 8.11 e 8.13) foram submetidas à determinação de suas cargas eletrostáticas através do programa disponível “on-line”, “*Protein Calculator*” (Figura 8.26) (<http://www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc.html>).

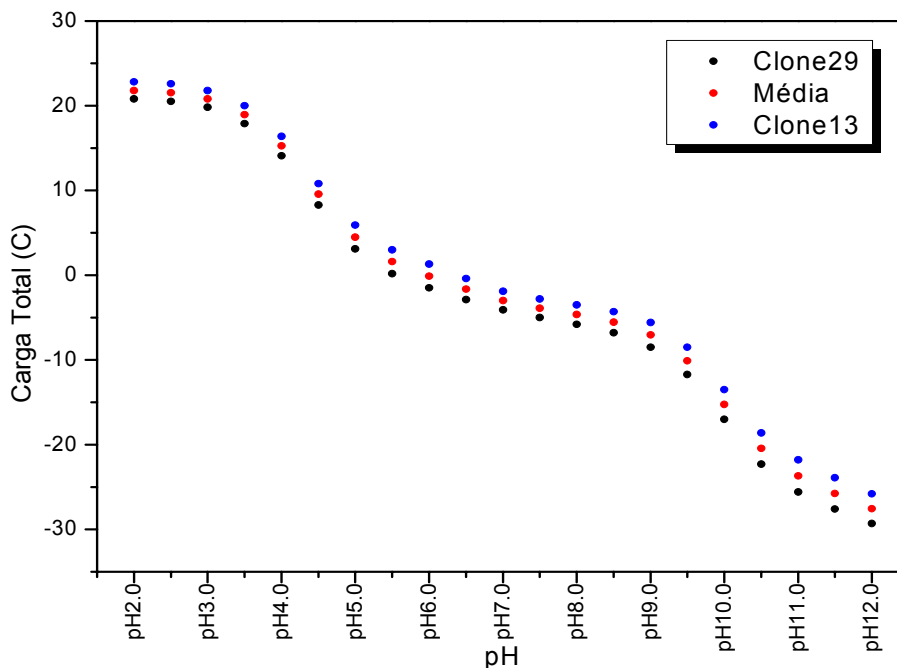


Figura 8.26 - Previsão da carga total do monômero da camptosemina em diferentes pHs. As seqüências primárias deduzidas dos clones da camptosemina foram submetidas à previsão de suas cargas eletrostáticas com o programa “*Protein Calculator*”. Em negro e azul, carga do monômero da camptosemina de acordo com o pH, previsões para os clones 29 e 13 respectivamente. Em vermelho a carga média entre as duas formas.

A análise revela que monômeros previstos para a camptosemina possuem 3 grupos de distribuições de carga ao longo do aumento de pH. O primeiro, com carga fortemente positiva, compreendendo a proteína nos pHs de 2,0-3,5, o segundo, relativamente neutro dentro dos pHs 5,5-9,0 e o terceiro grupo com carga negativa nos pHs 10,5-12,0. Esta distribuição de grupos de cargas parece ter uma boa correlação com os dados obtidos por anisotropia e SDS-PAGE, anteriormente demonstrados para a camptosemina em diferentes pHs. Nota-se também que as duas formas clonadas têm

previsões de comportamento muito semelhantes, sendo que a forma prevista pelo clone 29 é ligeiramente mais negativa que a forma do clone 13. As duas formas parecem diferenciar-se mais nos pHs alcalinos do que nos ácidos. Como a camptosemina nativa é oligomérica e a previsão das cargas foi feita com base nas seqüências dos monômeros, pode supor-se que um conjunto de interações nas interfaces de contato entre cada monômero do oligômero mantenha a estrutura nativa e que com a mudança de pH da solução, cada monômero assumiria cargas eletrostáticas iguais em grandeza e sinal. Esta carga poderia ser tamanha nos pHs extremos, que as interações nas interfaces monômero-monômero são sobrepujadas pela força de repulsão eletrostática entre os monômeros. Para visualizar esta hipótese, pode-se calcular a força de repulsão entre os monômeros (Figura 8.27) com base nas previsões da carga da camptosemina (Figura 8.26).

Com base na estrutura da lectina de *R. pseudocacia*, o oligômero possui as dimensões de 40 Å X 60 Å X 80 Å [138], o que indica que as dimensões do monômero devem ser cerca de 40 Å X 30 Å X 40 Å. Supondo-se um paralelepípedo de mesmas dimensões como modelo para a camptosemina monomérica, tem-se que a maior distância entre os centros de dois destes modelos, ainda possuindo um ponto em comum, é de cerca de 64 Å. Esta situação é análoga a dois monômeros o mais distantes possível entre si, mas ainda interagindo, ou seja, o último estágio da proteína oligomérica antes de sua dissociação em monômeros. Representando-se a carga monomérica da camptosemina como uma carga puntiforme distante de outro monômero em 64 Å, pode se calcular a força de repulsão entre os dois monômeros pela equação de Coulomb, $F = k \frac{|q_1||q_2|}{r^2}$, em que F é a força, em Newton (N); k , a constante de Coulomb, em $\text{N}\cdot\text{m}^2/\text{C}^2$; q_1 e q_2 , as cargas, em coulombs (C); e r , a distância entre as

cargas em metros (m). A constante de Coulomb no vácuo é aproximadamente $9 \cdot 10^9$ $\text{N} \cdot \text{m}^2 / \text{C}^2$ [155].

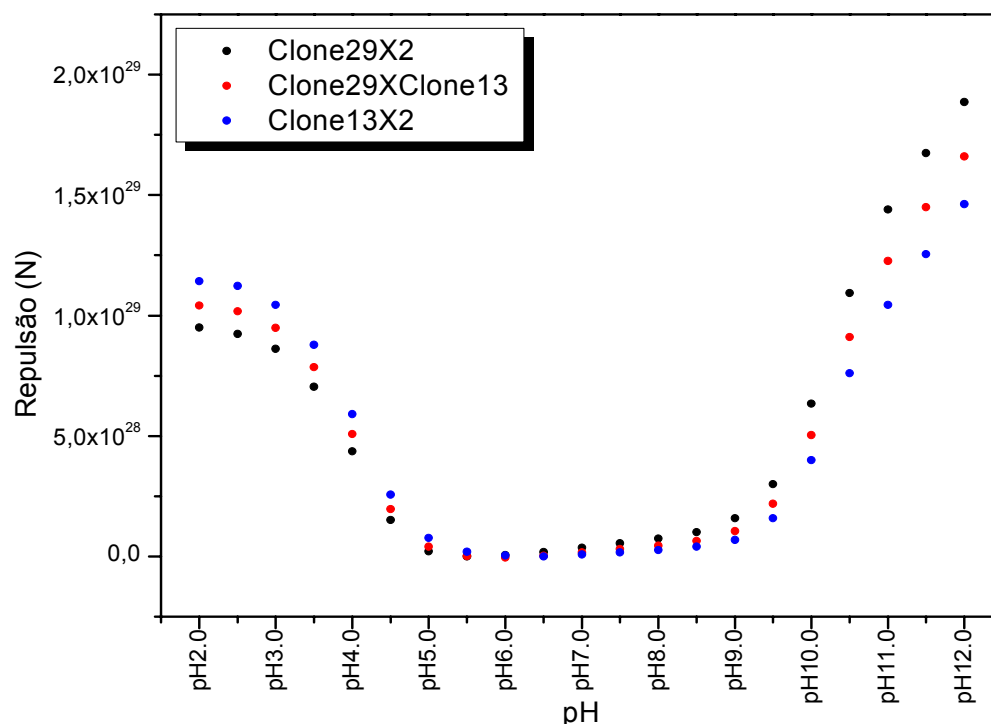


Figura 8.27 - Previsão da força de repulsão da camptosemina em diferentes pHs. As cargas eletrostáticas previstas para as seqüências primárias da camptosemina foram utilizadas para a previsão da força de repulsão entre dois monômeros a 64 Å de distância. Em negro, a repulsão prevista para dois monômeros com seqüência igual à deduzida a partir do clone 29. Em azul a repulsão entre dois monômeros deduzidos a partir do clone 13. Em vermelho, a repulsão entre um monômero do tipo clone 29 e outro tipo clone 13.

A análise das forças de repulsão previstas para a camptosemina sob diversos pHs revela uma faixa de repulsão muito próxima a zero entre os pHs 4,5-9,5, faixa na qual foi demonstrada a camptosemina em seu estado oligomérico. Acima e abaixo desta faixa a repulsão entre os monômeros aumenta acentuadamente até cerca de $1,0 \times 10^{29}$ N em pHs ácidos e $1,5 \times 10^{29}$ N em pHs alcalinos, faixas em que foram constatadas a dissociação da camptosemina em seus monômeros. A diferença de repulsão entre combinações diferentes de monômeros previstos para a camptosemina é relativamente pequena e aumenta nos pHs extremos. Os dados modelados possuem boa correlação com os experimentais (Figuras 8.23 e 8.24) sugerindo que a repulsão entre seus

monômeros constituintes deve ser um importante fator na dissociação da camptosemina nativa em subunidades monoméricas.

Conclusões

9 - Conclusões

9.1 - Cadeia B da pulchellina recombinante

- ✓ O aumento de escala de produção da rPBC foi obtido e o processo de reenovelamento resulta em uma proteína biologicamente ativa;
- ✓ A rPBC é estável dentro de uma estreita faixa de pH fisiológico e muito sensível a mudanças de temperatura;
- ✓ Foi demonstrada a interação da rPBC com células leucêmicas da linhagem K-562 através de suas propriedades lectínicas;
- ✓ A rPBC é rapidamente endocitada e (possivelmente através da via de transporte retrógrado) atinge o complexo de Golgi em células K-562;
- ✓ *In vivo* a rPBC demonstra funcionar da mesma forma que a cadeia B da toxina nativa sendo imprescindível para a elevada atividade da toxina.

9.2 - Camptosemina

- ✓ A clonagem por RT-PCR baseada no seqüenciamento *N*-terminal da camptosemina revelou duas possíveis isoformas para a camptosemina. O RACE 5' indica a presença de um peptídeo sinal que deve ser removido na proteína madura;
- ✓ A camptosemina é extremamente resistente a mudanças de temperatura e o monômero mantém sua estrutura por uma ampla faixa de pHs;
- ✓ A oligomerização da camptosemina pode ser controlada por pH, exibindo monômeros nos pHs mais ácidos e mais alcalinos e possivelmente tetrâmeros na faixa fisiológica. Não foram detectados dímeros ou trímeros;
- ✓ A camptosemina promove a adesão de células MDA-MB-231, indicando uma forte interação com tais células.

Referências Bibliográficas

10 - Referências Bibliográficas

- [1] Stillmark, H., (1888). Über ricin, ein giftiges Fermenta us den Samen von *Ricinus comm.* L und einigen anderen Euphorbiaceen, *Thesis*, Dorpat.
- [2] Franz, H., (1988). The ricin story. *Adv. Lectin Res.*, **1**: 10-25.
- [3] Kobert, R., (1913). Beiträge zur Kenntnis der vegetabilischen Hämagglutinine. *Die Landwirtschaftlichen Versuchs-Stationen* **70**: 97-151.
- [4] Hellin, H., (1891). Der giftige Eiweisskörper Abrin und seine Wirkung auf das Blut, *Thesis*, Dorpat.
- [5] Ehrlich, P., (1891a). Experimentelle Untersuchungen über Immunität I. Ueber Ricin. *Dtsch. Méd. Wochenschr.*, **17**: 976-979.
- [6] Ehrlich, P., (1891b). Experimentelle Untersuchungen über Immunität I. Ueber Abrin. *Dtsch. Méd. Wochenschr.*, **17**: 1218-1219.
- [7] Dirheimer, G., Haas, F., Metais, P., (1968). Hépatonephrite expérimentale provoquée par la ricine. *Hepatonephrites toxiques. Mason et cie*, 45-50, Paris.
- [8] Lin, J-Y., Kao, W-Y., Tserng, K-Y., Chen, C-C., Tung, T-C., (1970). Effect of crystalline abrin on the biosynthesis of protein, RNA and DNA in experimental tumors. *Cancer Res.*, **30**: 2431-2433.
- [9] Lin, J-Y, Liu, K., Chen, C-C., Tung, T-C., (1971). Effect of crystalline ricin on the biosynthesis of protein, RNA and DNA in experimental tumors. *Cancer Res.*, **31**: 921-924.
- [10] Olsnes, S. & Pihl, A., (1972a). Ricin - a potent inhibitor of protein synthesis. *FEBS Lett.*, **20**: 327-329.
- [11] Olsnes, S. & Pihl, A., (1972b). Inhibition of peptide chain elongation. *Nature*, **238**: 459-461.
- [12] Olsnes, S. & Pihl, A., (1973a). Isolation and properties of abrin: a toxic protein inhibiting protein synthesis. Evidence for different biological functions of its two constituent peptide chains. *Eur. J. Biochem.*, **35**: 179-185.
- [13] Olsnes, S. & Pihl, A., (1973b). Different biological properties of the two constituent chains of ricin, a toxic protein inhibiting protein. *Biochemistry*, **12**: 3121-3126.
- [14] Olsnes, S., Heirberg, R., Pihl, A., (1973). Inactivation of eukaryotic ribosomes by the toxic plant proteins abrin and ricin. *Eur. J. Biochem.*, **88**: 7-15.
- [15] Montanaro, L., Sperti, S., Stirpe, F., (1973). Inhibition by ricin of protein synthesis *in vitro*. Ribosomes as the target of the toxin. *Biochem. J.*, **136**: 677-683.
- [16] Sperti, S., Montanaro, L., Mattioli, A., Stirpe, E., (1973). Inhibition by ricin of protein synthesis *in vitro*: 60 S ribosomomal subunit as the target of the toxin. *Biochem. J.*, **136**: 813-815.

- [17] Olsne, S., Fernandez-Puentes, C., Carrasco, L., Vazquez, D., (1975). Ribosome inactivation by the toxic lectins abrin and ricin. Kinetics of the enzymatic activity of the toxin A-chains. *Eur. J. Biochem.*, **60**: 281-288.
- [18] Endo, Y. & Tsurugi, K., (1987). RNA *N*-glycosidase activity of ricin A-chain. Mechanism of action of the toxic lectin ricin on eukaryotic ribosomes. *J. Biol. Chem.*, **262**: 8128-8130.
- [19] Endo, Y., Mitsui, K., Motizuki, M., Tsurugi, K., (1987). The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. The site and the characteristics of the modification in the 28 S ribosomal RNA caused by the toxins. *J. Biol. Chem.*, **262**: 5908-5912.
- [20] Endo, Y., Chan, Y. L., Lin, A., Tsurugi, K., Wool, I. G., (1988a). The cytotoxins alpha-sarcin and ricin retain their specificity when tested on a synthetic oligoribonucleotide (35-mer) that mimics a region of 28 S ribosomal ribonucleic acid. *J. Biol. Chem.*, **263**: 7917-7920.
- [21] Endo, Y., Gluck, A., Wool, I. G., (1991). Ribosomal RNA identity elements for ricin A-chain recognition and catalysis. *J. Mol. Biol.*, **221**: 193-207.
- [22] Eiklid, K., Olsnes, S., Pihl., (1980). Entry of lethal doses of abrin, ricin and modeccin into the cytosol of HeLa cells. *Exp. Cell Res.*, **126**: 321-326.
- [23] Barbirei, L., Battelli, M. G., Stirpe, F., (1993). Ribosome inactivating proteins from plants. *Biochim. Biophys. Acta*, **1154**: 237-282.
- [24] Walsh, T. A., Morgan, A. E., Hey, T. D., (1991). Characterization and molecular cloning of a proenzyme form of a ribosome-inactivating protein from maize. Novel mechanism of proenzyme activation by proteolytic removal of a 2.8-kilodalton internal peptide segment. *J. Biol. Chem.*, **266**: 23422-23427.
- [25] Hey, T. D., Hartley, M., Walsh, T. A., (1995). Maize ribosome-inactivating protein (b-32). Homologs in related species, effects on maize ribosomes, and modulation of activity by pro-peptide deletions. *Plant Physiol.*, **107**: 1323-1332.
- [26] Nielsen, K. & Boston, R. S., (2001). Ribosome-Inactivating Proteins: A Plant Perspective. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.*, **53**: 785-816.
- [27] Bass, H. W., Webster, C., O'Brian, G. R., Roberts, J. K. M., Boston, R. S., (1992). A maize ribosome-inactivating protein is controlled by the transcriptional activator Opaque-2. *Plant Cell*, **4**: 225-234.
- [28] Chaudhry, B., Mueller-Uri, F., Cameron-Mills, V., Gough, S., Simpson, D., Skriver, K., Mundy, J., (1994). The barley 60 kDa jasmonate-induced protein (JIP60) is a novel ribosome-inactivating protein. *Plant J.*, **6(6)**: 815-824.
- [29] Reinbothe, S., Reinbothe, C., Lehmann, J., Becker, W., Apel, K., Parthier, B., (1994). JIP60, a methyl jasmonate-induced ribosome-inactivating protein involved in plant stress reactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 7012-7016.
- [30] Xu, H. & Liu, W. Y. (2004). Cinnamomin - a versatile type II ribosome-inactivating protein. *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, **36(3)**: 169-176.

- [31] Richardson, P. T., Westby, M., Roberts, L. M., Gould, J. H., Colman, A., Lord, J. M., (1989). Recombinant proricin binds galactose but does not depurinate 28 S ribosomal RNA. *FEBS Lett.*, **255**: 15-20.
- [32] Funatsu, G., Kimura, M., Funatsu, M., (1979). Primary structure of the A-chain of ricin D. *Agric. Biol. Chem.*, **43**: 2221-2224.
- [33] Butterworth, A., G. & Lord, J. M., (1993). Ricin and *Ricinus communis* agglutinin subunits are all derived from a single-size polypeptide precursor. *Eur. J. Biochem.*, **137**: 57-65.
- [34] Wood, K. A., Lord, J. M., Wawrzynczak, E. J., Piatak, M., (1991). Preproabrin: genomic cloning, characterization and the expression of the A-chain in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.*, **198**: 723-732.
- [35] Rutenber, E. & Robertus, J. D., (1991). Structure of ricin B-chain at 2.5 Å resolution. *Proteins*, **10(3)**: 260-269.
- [36] Tahirov, T. H., Lu, T. H., Liaw, Y. L., Chem, Y. L., Lin, J. Y., (1995). Crystal structure of abrin-a at 2.14 Å. *J. Mol. Biol.*, **250(3)**: 354-367.
- [37] Rutenber, E., Ready, M., Robertus, J. D., (1987). Structure and evolution of ricin B chain. *Nature*, **326**: 624-626.
- [38] Sphyris, N., Lord, J. M., Wales, R., Roberts, L. M., (1995). Mutational analysis of the *Ricinus* lectin B-chains. Galactose-binding activity of the 2 gamma subdomain of *Ricinus communis* agglutinin B-chain. *J. Biol. Chem.*, **270**: 20292-20297.
- [39] Murzin, A. G., Lesk, A. M., Chotia, C., (1992). β -trefoil fold. Patterns of structure and sequence in the Kunitz inhibitors, interleukins 1 β , and 1 α and fibroblast growth factors. *J. Mol. Biol.*, **223**: 531-543.
- [40] Mosinger, M., (1951). Sur les réactions neuroendocriniennes et génitales dans l'intoxication par ricine. *Cont. Rend. Soc. Bio.*, **145**: 412-415.
- [41] Reddy, V. V. & Sirsi, M., (1969). Effects of *Abrus precatorius* L. on experimental tumors. *Cancer Res.*, **29**: 1447-1451.
- [42] Fodstad, O., Kvalheim, G., Godal, A., Lotsberg, J., Aamdal, S., Host, H., Pihl, A., (1984). Phase I study of the plant protein ricin. *Cancer Res.*, **44**: 862-865.
- [43] Olsnes, S. & Pihl, A., (1981). Chimeric toxins. *Pharmacol. Ther.*, **15(3)**: 355-381.
- [44] Olsnes, S., (1981). Directing toxins to cancer cells. *Nature*, **290(5802)**, 84.
- [45] Frankel, A. E., (1998). Clinical applications of immunotoxins. *Current topics in Microbiology and Immunology*, Springer, Berlin.
- [46] Brinkmann, U. & Pastan, I., (1994). Immunotoxins against cancer. *Biochim. Biophys. Acta*, **1198**: 27-45.
- [47] Pennell, C. A. & Erickson, H. A., (2002). Designing immunotoxins for cancer therapy. *Immunologic Res.*, **25**: 177-191.

- [48] Olsnes, S., Sandvig, K., Petersen, O. W., van Deurs, B., (1989). Immunotoxins - entry into cells and mechanisms of action. *Immunol. Today*, **10**: 291-295.
- [49] Tonevitsky, A. G., Agapov, I. I., Shamshiev, A. T., Temyakov, D. E., Pohl, P., Kirpichnikov, M. P., (1996) Immunotoxins containing A-chain of mistletoe lectin I are more active than immunotoxins with ricin A-chain. *FEBS Lett.*, **392**: 166-168.
- [50] Lord, J. M., Roberts, L. M., Robertus, J. D., (1994). Ricin: structure, mode of action, and some current applications. *FASEB J.*, **8**: 201-208.
- [51] Van Damme, E. J. M., Hao, Q., Barre, A., Vandenbussche, F., Desmyter, S., Rougé, P., Peumans, W., J., Chen, Y., (2002). Ribosome-inactivating proteins: a family of plant proteins that do more than inactivate ribosomes. *Crit. Rev. Plant Sci.*, **20(5)**: 395-465.
- [52] Battelli, M. G., (2004). Cytotoxicity and toxicity to animals and humans of ribosome-inactivating proteins. *Mini-Rev. Med. Chem.*, **4**: 513-521.
- [53] Girbés, T., Ferreras, J. M., Arias, F. J., Munõz, R., Iglesias, R., Jimenez, P., Rojo, M. A., Arias, Y., Perez, Y., Benitez, J., Sanchez, D., Gayoso, M. J., (2003). Non-toxic type 2 ribosome-inactivating proteins (RIPs) from *Sambucus*: occurrence, cellular and molecular activities and potential uses. *Cell Mol. Biol.*, **49(4)**: 537-545.
- [54] Svinth, M., Steighardt, J., Hernandez, R., Suh, J. K., Kelly, C., Day, P., Lord, J. M., Girbés, T., Robertus, J. D., (1998). Differences in cytotoxicity of native and engineered RIPs can be used to assess their ability to reach the cytoplasm. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **249**: 637-642.
- [55] Sandvig, K. & van Deurs, B., (1996). Endocytosis, intracellular transport, and cytotoxic action of Shiga toxin and ricin. *Physiol. Rev.*, **76**: 949-966.
- [56] Skilleter, D. N., Paine, A. J., Stirpe, F., (1981). A comparison of the accumulation of ricin by hepatic parenchymal and non-parenchymal cells and its inhibition of protein synthesis. *Biochim. Biophys. Acta*, **677**: 495-500.
- [57] Simmons, B. M., Stahl, P. D., Russell, J. H., (1986). Mannose receptor-mediated uptake of ricin toxin and ricin A chain by macrophages: multiple intracellular pathways for A chain translocation. *J. Biol. Chem.*, **261**: 7912-7920.
- [58] Magnusson, S., Kjekken, R., Berg, T., (1993). Characterization of two distinct pathways of endocytosis of ricin by rat liver endothelial cells. *Exp. Cell Res.*, **205**: 118-125.
- [59] Sandvig, K. & Olsnes, S., (1979). Effect of temperature on the uptake, excretion and degradation of abrin and ricin by HeLa cells. *Exp. Cell Res.*, **121**: 15-25.
- [60] Maxfield, F. R. & McGraw, T. E., (2004). Endocytic recycling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **5**: 121-132.
- [61] van Deurs, B., Sandvig, K., Petersen, O. W., Olsnes, S., Simon, K., Griffiths, G. (1988). Estimation of the amount of internalized ricin that reaches the trans-Golgi network. *J. Cell. Biol.*, **106**: 253-267.

- [62] Sandvig, K. & van Deurs, B., (2002). Membrane traffic exploited by protein toxins. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.*, **18**: 1-14.
- [63] Olsnes, S., Haylett, T., Refsnes, K., (1978). Purification and characterization of the highly toxic lectin modeccin. *J. Biol. Chem.*, **253**: 5069-5073.
- [64] Hughes, R. C. & Gardas, A., (1976). Phenotypic reversion of ricin-resistant hamster fibroblasts to a sensitive state after coating with glycolipid receptors. *Nature*, **264**: 63-66.
- [65] Day, P. J., Owens, S. R., Wesche, J., Olsnes, S., Roberts, L. M., Lord, J. M., (2001). An interaction between ricin and calreticulin that may have implications for toxin trafficking. *J. Biol. Chem.*, **276**: 7102-7208.
- [66] Youle, R. J., Murray, G. J., Neville, D. M. Jr., (1981). Studies on the galactose-binding site of ricin and the hybrid toxin Man6P-ricin. *Cell*, **23**: 551-559.
- [67] Wales, R., Roberts, L. M., Lord, J. M., (1993). Addition of an endoplasmic reticulum retrieval sequence to ricin A-chain significantly increases its cytotoxicity to mammalian cells. *J. Biol. Chem.*, **268**: 23986-23990.
- [68] Tagge, E., Chandler, J., Tang, B. L., Hong, W. J., Willingham, M. C., Frankel, A., (1996). Cytotoxicity of KDEL-terminated ricin toxins correlates with distribution of the KDEL receptor in the Golgi. *J. Histochem. Cytochem.*, **44**: 159-165.
- [69] Wesche, J., Rapak, A., Olsnes, S., (1999). Dependence of ricin toxicity on the translocation of the toxin A-chain from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *J. Biol. Chem.*, **274**: 34443-34449.
- [70] Turton, K., Chaddock, J. A., Acharya, K. R., (2002). Botulinum and tetanus neurotoxins: structure, function and therapeutic utility. *Trend. Biochem. Sci.*, **27**: 552-558.
- [71] Lewis, M. S. & Youle, R. J., (1986). Ricin subunit association. Thermodynamics and the role of the disulfide bond in toxicity. *J. Biol. Chem.*, **261**: 11571-11577.
- [72] Wright, H. T. & Robertus, J. D., (1987). The intersubunit disulfide bridge of ricin is essential for cytotoxicity. *Arch. Biochem. Biophys.*, **256**: 280-284.
- [73] Spooner, R. A., Watson, P. D., Marsden, C. J., Smith, D. C., Moore, K. A. H., Cook, J. P., Lord, J. M., Roberts, L. M. (2004). Protein disulphide-isomerase reduces ricin to its A and B chains in the endoplasmic reticulum. *Biochem. J.*, **383**: 285-293.
- [74] Lord, J. M. & Roberts, L. M., (1998). Toxin entry: retrograde transport through the secretory pathway. *J. Cell Bio.*, **140**: 733-736.
- [75] Falsnes, P. O. & Sandvig, K., (2000). Penetration of protein toxins into cells. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **12**: 407-413.
- [76] Hartley, M. R. & Lord, J. M., (2004). Cytotoxic ribosome-inactivating lectins from plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1701**: 1-14.

- [77] Tsai, B., Ye, Y., Rapoport, T. A., (2002). Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **3**: 246-255.
- [78] Ramos, M. V., Mota, D. M., Teixeira, C. R., Cavada, B. S., Moreira, R. A., (1998). Isolation and partial characterisation of highly toxic lectins from *Abrus pulchellus* seeds. *Toxicon*, **36(3)**: 477-484.
- [79] Mota, D. M., (1997). Pulchelininas, lectinas Galactose-específicas, de sementes de *Abrus pulchellus*: purificação e estudos de propriedades químicas e biológicas, *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Ceará.
- [80] Ramos, M. V., (1993). Isolamento e Caracterização parcial da Isolectinas com Atividades Tóxica e Hemaglutinante de Sementes de *Abrus pulchellus* subespécie tenuiflorus. *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Ceará.
- [81] Ramos, M. V., Teixeira, C. R., Bomfim, L. R., Madeira, S. V. F., Moreira, R. A., (1999). The Carbohydrate-binding Specificity of a Highly Toxic protein from *Abrus pulchellus* Seeds. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **94(2)**: 185-188.
- [82] Silva, A. L., Goto, L. S., Dinarte A. R., Hansen, D., Moreira, R. A., Beltramini, L. M., Araújo, A. P. U., (2005). Pulchellin, a highly toxic type 2 ribosome-inactivating protein from *Abrus pulchellus*: Cloning heterologous expression of A-chain and structural studies, *FEBS J.*, **272(5)**: 1201-1210.
- [83] Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller W., Lipman, D. J., (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, **25**: 3389-3402.
- [84] Goto, L. S., Beltramini, L. M., Moraes, D. I., Moreira, R. A., Araújo, A. P. U., (2003). *Abrus pulchellus* type-2 RIP, pulchellin: heterologous expression and refolding of the sugar-binding B chain. *Protein Expr Purif.*, **31 (1)**: 12-18.
- [85] Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struthl, K., (1995). Short Protocols in molecular biology. *Ed. John Wiley & Sons Inc.*, 3^a ed. USA.
- [86] Laemmli, U. K., (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.
- [87] Chen, Y. H. & Yang, J. T., (1971). A new approach to the calculation of secondary structures of globular proteins by optical rotatory dispersion and circular dichroism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **44**: 1285-1291.
- [88] Sreerama, N., Venyaminov, S. Y., Woody, R. W., (1999). Estimation of the number of alpha-helical and beta-strand segments in proteins using CD spectroscopy. *Protein Science*, **8**: 370-380.
- [89] Sreerama, N. & Woody, R. W., (2000). Estimation of protein secondary structure from CD spectra: Comparison of CONTIN, SELCON and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal. Biochem.*, **282**: 252-260.
- [90] Sreerama, N. & Woody, R. W., (2004). On the analysis of membrane protein circular dichroism spectra. *Protein Science*, **13**: 100-112.

- [91] Sreerama, N. & Woody, R. W., (2004). Computation and Analysis of protein circular dichroism spectra *Methods Enzymol.*, **383**: 318.
- [92] Sreerama, N., Venyaminov, S. Y., Woody, R. W., (2001). Analysis of protein CD spectra with a reference protein set based on tertiary structure class. *Anal. Biochem.*, **299**: 271-274.
- [93] Middelberg, A., P., (2002). Preparative protein refolding. *Trends Biotechnol.*, **20(10)**: 437-443.
- [94] Clark, E. D. B., (2001). Protein refolding for industrial processes. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **12(2)**: 202-207.
- [95] Maachupalli-Reddy, J., Kelley, B. D., De Bernardez Clark, E., (1997). Effect of inclusion body contaminants on the oxidative renaturation of hen egg white lysozyme. *Biotechnol. Prog.*, **13(2)**: 144-150.
- [96] Tsumoto, K., Ejima, D., Kumagai, I., Arakawa, T., (2003). Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expr. Purif.*, **28(1)**: 1-8.
- [97] Sakono, M., Kawashima, Y. M., Ichinose, H., Maruyama, T., Kamiya, N., Goto, M. (2004). Direct refolding of inclusion bodies using reversed micelles. *Biotechnol. Prog.*, **20(6)**: 1783-1787.
- [98] Goto, M., Hashimoto, Y., Fujita, T., Ono, T., Furusaki, S., (2000). Important parameters affecting efficiency of protein refolding by reversed micelles. *Biotechnol. Prog.*, **16**: 1079-1085.
- [99] Londrigan, S. L., Hewish, M. J., Thomson, M. J., Sanders, G. M., Mustafa, H., Coulson, B. S., (2000). Growth of rotaviruses in continuous human and monkey cell lines that vary in their expression of integrins. *Journal of General Virology*, **81**: 2203-2213.
- [100] Houston, L. L. & Dooley, T. P., (1982). Binding of two molecules of 4-methylumbelliferyl galactose or 4-methylumbelliferyl N-acetylgalactosamine to the B chains of ricin and *Ricinus communis* agglutinin and to purified ricin B chain. *J. Biol. Chem.*, **257(8)**: 4147-4151.
- [101] Wales, R., Richardson, P. T., Roberts, L. M., Woodland, H. R., Lord, J. M., (1991). Mutational analysis of the galactose binding ability of recombinant ricin B chain. *J. Biol. Chem.*, **266**: 19172-19179.
- [102] Yamasaki, N., Hatakeyama, T., Funatsu, G., (1985). Ricin D-saccharide interaction as studied by ultraviolet difference spectroscopy. *J. Biochem.*, **98(6)**: 1555-1560.
- [103] Hatakeyama, T., Yamasaki, N., Funatsu, G., (1986). Identification of the tryptophan residue located at the low-affinity saccharide binding site of ricin D. *J. Biochem.*, **100(3)**: 781-788.
- [104] Ganguly, D. & Mukhopadhyay, C., (2006). Binding diversity of the two binding sites of Ricin B lectin. *Biopolymers*, **83(1)**: 83-94.

- [105] Wang, B. Z., Zou, W. G., Liu, W. Y., Liu, X. Y., (2006). The lower cytotoxicity of cinnamomin (a type II RIP) is due to its B-chain. *Arch. Biochem. Biophys.*, **451(1)**: 91-96.
- [106] Griffith, K. J., Chan, E. K., Lung, C. C., Hamel, J. C., Guo, X., Miyachi, K., Fritzler, M. J., (1997). Molecular cloning of a novel 97-kd Golgi complex autoantigen associated with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum.*, **40**: 1693-1702.
- [107] Boyd, W. C., & Shapleigh, E., (1954). Specific precipitation activity of plant agglutinins (lectins). *Science*, **119**: 419.
- [108] Van Damme, E. J., Lannoo, N., Fouquaert, E., Peumans, W. J., (2004a). The identification of inducible cytoplasmic/nuclear carbohydrate-binding proteins urges to develop novel concepts about the role of plant lectins. *Glycoconjugate J.*, **20**: 449-460.
- [109] Van Damme, E. J. M., Peumans, W. J., Barre, A., Rougé, P., (1998). Plant Lectins: A Composite of Several Distinct Families of Structurally and Evolutionary Related Proteins with Diverse Biological Roles. *Crit. Rev. Plant Sci.*, **17(6)**: 575-692.
- [110] Peumans, W. J., Zhang, W., Barre, A., Houles Astoul, C., Balint-Kurti P. J., Rovira, P., Rouge, P., May, G. D., Van Leuven, F., TruffaBachi, P., Van Damme, E. J., (2000). Fruit-specific lectins from banana and plantain. *Planta*. **211(4)**: 546-554.
- [111] Van Damme, E. J., Barre, A., Rougé, P., Peumans, W. J., (2004b). Cytoplasmic/nuclear plant lectins: a new story. *Trends Plant Sci.*, **9(10)**: 484-489.
- [112] Sharon, N. & Lis, H., (2004). History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, **14(11)**: 53-62.
- [113] Rüdiger, H., (1998). Plant lectins - more than just tools for glycoscientists: occurrence, structure, and possible functions of plant lectins. *Acta Anat. (Basel)*, **161(1-4)**: 130-152.
- [114] Lis, H & Sharon, N., (1998). Lectins: Carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chemical Reviews*, **98(2)**: 637-674.
- [115] Pratap, J. V., Jeyaprakash, A. A., Rani, P. G., Sekar, K., Surolia, A., Vijayan, M., (2002). Crystal structures of artocarpin, a *Moraceae* lectin with mannose specificity, and its complex with methyl-alpha-D-mannose: implications to the generation of carbohydrate specificity. *J. Mol. Biol.*, **317(2)**: 237-247.
- [116] Peumans, W. J. & Van Damme, E. J. M., (1995). Lectins as plant defence proteins. *Plant Physiol.*, **109**: 347-352.
- [117] Van Damme, E. J. M., Briké, T., Winter, H. C., Van Leuven, F., Goldstein, I. J., Peumans, W. J., (1996). Molecular cloning of two different mannose-binding lectins from tulip bulbs. *Eur. J. Biochem.*, **236(2)**: 419-427.
- [118] Murdock, L. L. & Shade, R. E., (2002). Lectins and protease inhibitors as plant defenses against insects. *J. Agric. Food Chem.*, **50(22)**: 6605-11.

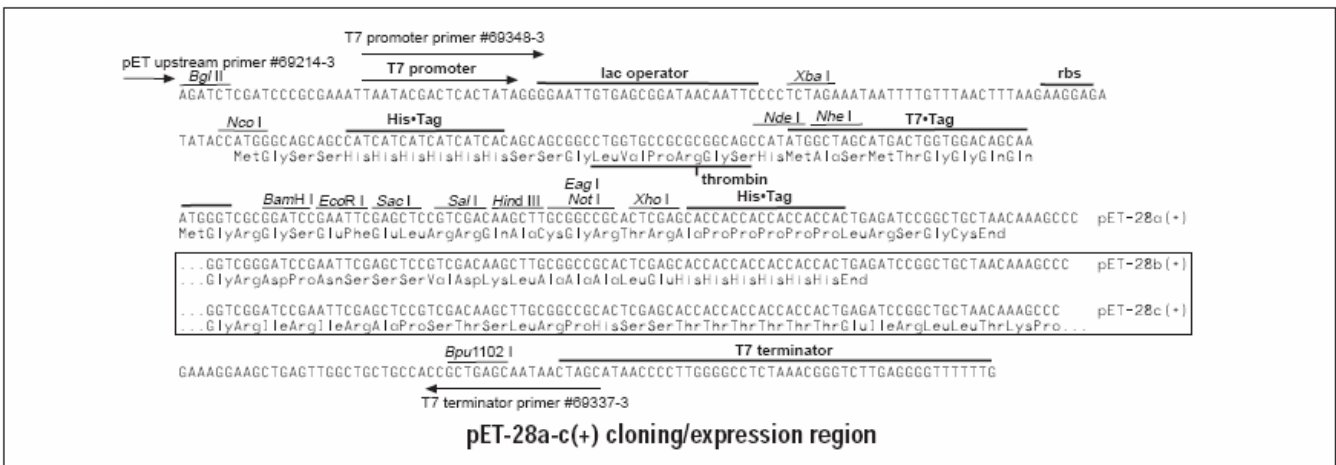
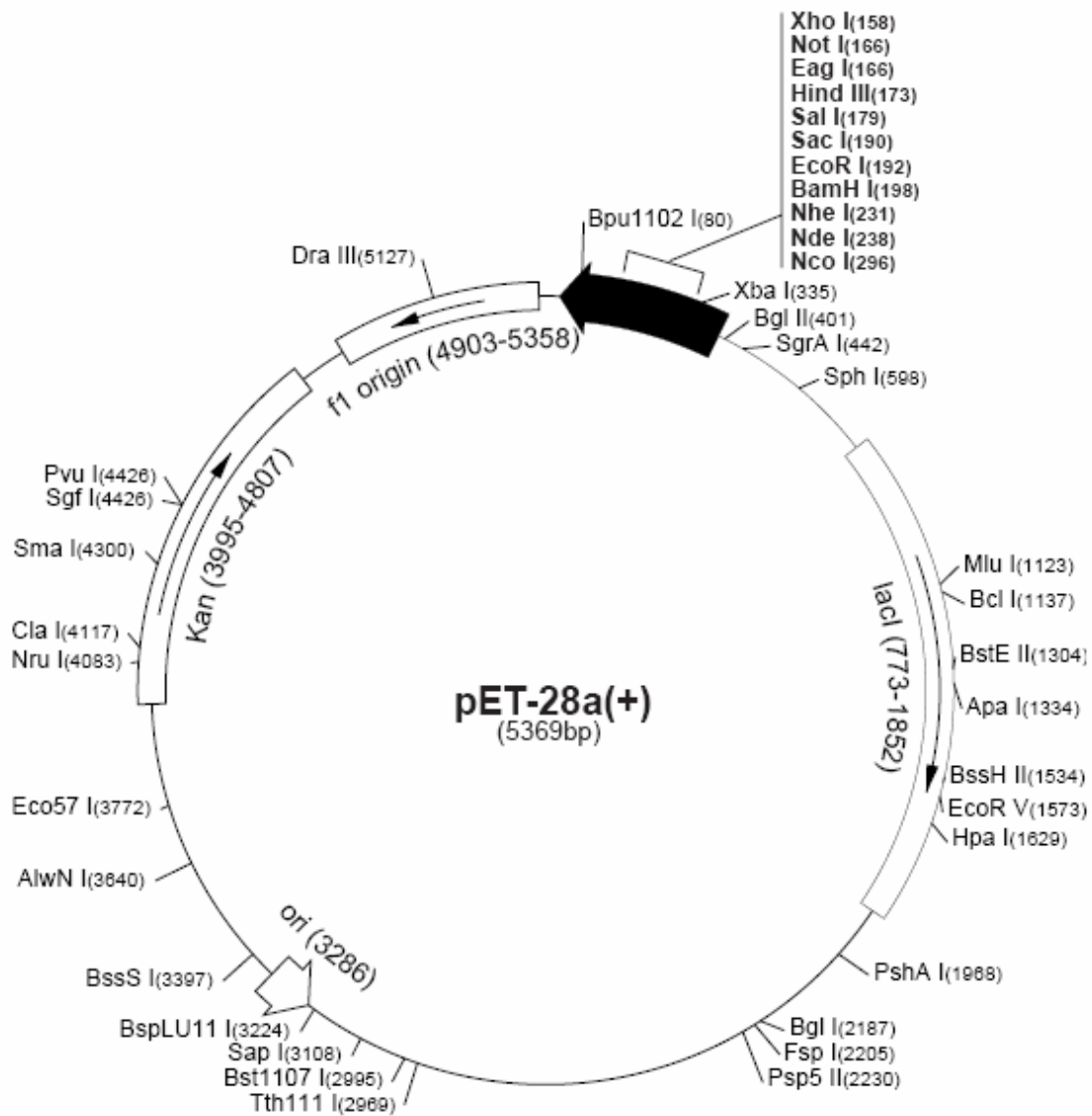
- [119]Manoj, N. & Suguna, K., (2001). Signature of quaternary structure in the sequences of legume lectins. *Protein Eng.*, **14(10)**: 735-745.
- [120]Loris, R., Hamelryck, T., Bouckaert, J., Wyns, L., (1998). Legume lectin structure. *Biochim. Biophys. Acta*, **1383(1)**: 9-36.
- [121]Vijayan, M. & Chandra, N., (1999). Lectins. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **9(6)**: 707-714.
- [122]Brinda, K. V., Mitra, N., Surolia, A., Vishveshwara, S., (2004). Determinants of quaternary association in legume lectins. *Protein Sci.*, **13(7)**: 1735-1749.
- [123]Jones, S. & Thornton, J. M., (1995). Protein-protein interactions: a review of protein dimer structures. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **63(1)**: 31-65.
- [124]Hardman, K. D. & Ainsworth, C. F., (1972). Structure of concanavalin A at 2.4-Å resolution. *Biochemistry*, **11(26)**: 4910-4919.
- [125]Naismith, J. H., Habash, J., Harrop, S., Helliwell, J. R., Hunter, W. N., Wan, T. C., Weisgerber, S., Kalb, A. J., Yariv, J., (1993). Refined structure of cadmium-substituted concanavalin A at 2.0 Å resolution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **49(Pt 6)**: 561-571. *Erratum in: Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, (1994). **50(Pt 2)**: 236.
- [126]Loris, R., Maes, D., Poortmans, F., Wyns, L., Bouckaert, J., (1996). A structure of the complex between concanavalin A and methyl-3,6-di-O-(alpha-D-mannopyranosyl)-alpha-D-mannopyranoside reveals two binding modes. *J. Biol. Chem.*, **271(48)**: 30614-30618.
- [127]Kanellopoulos, P. N., Tucker, P. A., Pavlou, K., Agianian, B., Hamodrakas, S. J., (1996). A Triclinic Crystal Form of the Lectin Concanavalin A. *J. Struct. Biol.*, **117(1)**: 16-23.
- [128]Sanz-Aparicio, J., Hermoso, J., Grangeiro, T. B., Calvete, J. J., Cavada, B. S., (1997). The crystal structure of *Canavalia brasiliensis* lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct biological properties from Concanavalin A. *FEBS Lett.*, **405(1)**: 114-118.
- [129]Lehr, C. M., (2000). Lectin-mediated drug delivery: The second generation of bioadhesives. *J. of Controlled Release*, **65**: 19-29.
- [130]Zhang, D.-L., Liu, S.-G., Yan, L.-F., Li, L.-J., Huang, G.-S., Fang, F.-D., Xia, G.-T., He, X.-Y., Gao, B.-X., Bai, X.-H., Wang, W., Ding, P.-G., (2001). Carcinogenesis or tumorigenicity testing of animal cell Lines for vaccine preparation by colony formation on soft agar and by agglutination under plant lectins. *Cell Biology Intern.*, **25(10)**: 997-1002.
- [131]Nowell, P. C., (1960). Phytohemagglutinin: An initiator of mitosis in culture of animal and human leukocytes. *Cancer Res.*, **20**: 462-466.
- [132]Aub, J. C., Sanford, B. H., Cote, M. N., (1965). Studies on reactivity of tumor and normal cells to a wheat germ agglutinin. *PNAS. USA*, **54**: 396-399.
- [133]Polhill, R. M. & Raven, P. H., (1981). Advances in Legume Systematics, *Kew: Royal Botanic Gardens*, Vol.1.

- [134] Queiroz, L. P., (1999). Sistemática e filogenia do gênero *Camptosema* W.J.Hook & Arn. (Leguminosae: Papilionoideae: Phaseoleae). *Tese*, Universidade de São Paulo.
- [135] Sanger, F., Coulson, A. R., Hong, G. F., Hill, D. F., Petersen, G. B., (1977). DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**: 5463-5467.
- [136] Bertioli, D., (1997). Rapid amplification of cDNA ends. *Methods Mol. Biol.*, **67**: 233-238.
- [137] Higgins, D., Thompson, J., Gibson, T., Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson T. J., (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, **22**: 4673-4680.
- [138] Rabijns, A., Verboven, C., Rougé, P., Barre, A., Van Damme, E. J., Peumans, W. J., De Ranter, C. J., (2001). Structure of a legume lectin from the bark of *Robinia pseudoacacia* and its complex with N-acetylgalactosamine. *Proteins*, **44(4)**: 470-478.
- [139] Leavitt, R. D., Feldsted, R. L., Bachur, N. R., (1977). Biological and biochemical properties of *Phaseolus vulgaris* isolectins. *J. Biol. Chem.*, **252**: 2961-2966.
- [140] Van Damme, E. J. M., Goldstein, I. J., Vercammen, G., Vuylsteke, J., Peumans, W. J., (1992). Lectins of members of the *Amaryllidaceae* are encoded by multigene families which show extensive homology. *Plant Physiol.*, **86**: 245-252.
- [141] Van Damme, E. J., Barre, A., Smeets, K., Torrekens, S., Van Leuven, F., Rougé, P., Peumans, W. J., (1995). The bark of *Robinia pseudoacacia* contains a complex mixture of lectins. Characterization of the proteins and the cDNA clones. *Plant Physiol.*, **107(3)**: 833-843.
- [142] Horejsi, V., Haskovec, C., Kocourek, K., (1978). Studies on lectins. XXXVIII. Isolation and characterization of the lectin from black locust bark (*Robinia pseudoacacia* L.). *Biochim. Biophys. Acta*, **525**: 98-104.
- [143] Feldsted, R. L., Egorin, M. J., Leavitt, R. D., Bachur, N. R., (1977). Recombination of subunits of *Phaseolus vulgaris* isolectins. *J. Biol. Chem.*, **252**: 2967-2971.
- [144] Tazaki, K. & Yoshida, K., (1992). The bark lectin from *Robinia pseudoacacia*: Purification and partial characterization. *Plant Cell Physiol.*, **33**: 125-129.
- [145] Nsimba-Lubaki, M. & Peumans, W. J., (1986). Seasonal fluctuations of lectins in barks of elderberry (*Sambucus nigra*) and black locust (*Robinia pseudoacacia*). *Plant Physiol.*, **80(3)**: 747-751.
- [146] Yoshida, K., Baba, K., Yamamoto, N., Tazaki, K., (1994). Cloning of a lectin cDNA and seasonal changes in levels of the lectin and its mRNA in the inner bark of *Robinia pseudoacacia*. *Plant Mol. Biol.*, **25(5)**: 845-853.

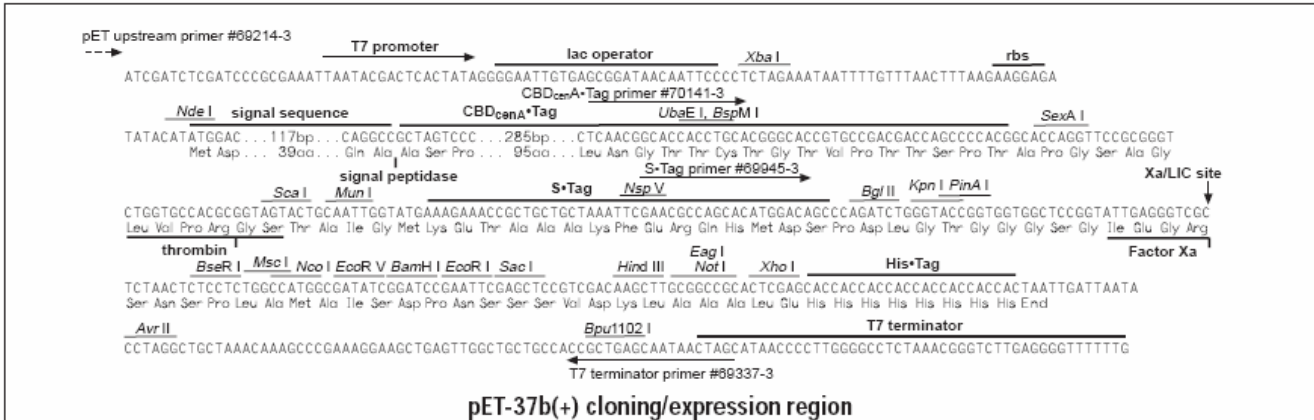
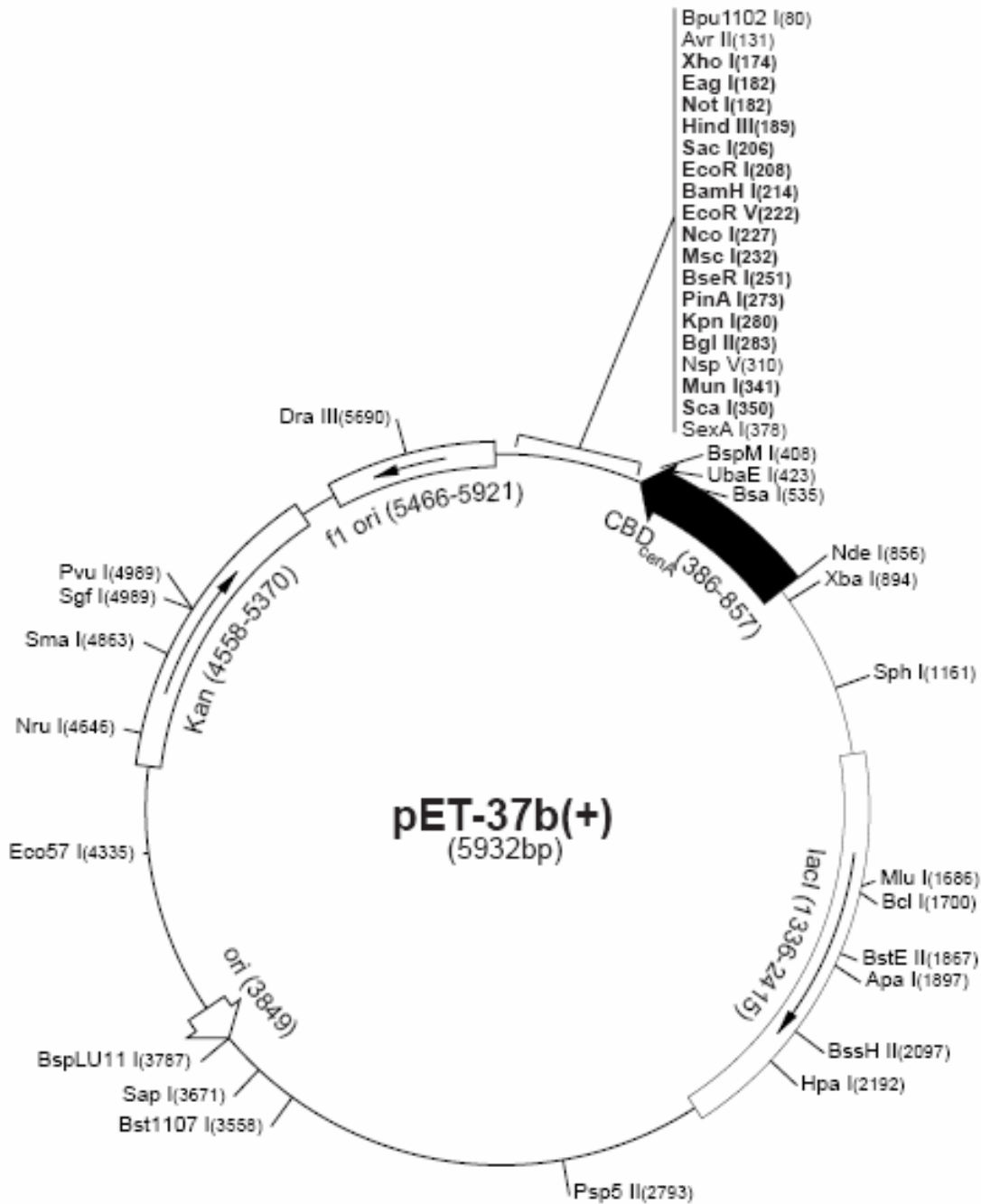
- [147] Reddy, G. B., Bharadwaj, S., Surolia, A., (1999). Thermal stability and mode of oligomerization of the tetrameric peanut agglutinin: a differential scanning calorimetry study. *Biochemistry*, **38(14)**: 4464-4470.
- [148] Sinha, S. & Surolia, A., (2005). Oligomerization endows enormous stability to soybean agglutinin: a comparison of the stability of monomer and tetramer of soybean agglutinin. *Biophys. J.*, **88(6)**: 4243-4251.
- [149] Roopashree, S., Singh, S. A., Gowda, L. R., Rao, A. G., (2006). Dual-function protein in plant defence: seed lectin from *Dolichos biflorus* (horse gram) exhibits lipoxigenase activity. *Biochem J.*, **395(3)**: 629-639.
- [150] McCubbin, W. D. & Kay, C. M., (1971). Molecular weight studies on concanavalin A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **44(1)**: 101-109.
- [151] Dessen, A., Gupta, D., Sabesan, S., Brewer, C. F., Sacchettini, J. C., (1995). X-ray crystal structure of the soybean agglutinin cross-linked with a biantennary analog of the blood group I carbohydrate antigen. *Biochemistry*, **34(15)**: 4933-4942.
- [152] Hamelryck, T. W., Dao-Thi, M. H., Poortmans, F., Chrispeels, M. J., Wyns, L., Loris, R., (1996). The crystallographic structure of phytohemagglutinin-L. *J. Biol. Chem.*, **271(34)**: 20479-20485.
- [153] Steiner, R. F., (1991). Fluorescence anisotropy: theory and applications. *in* Topics in Fluorescence Spectroscopy. Vol. 2. Principles. Lakowicz, J. R. (Ed.) *Plenum Press, New York*.
- [154] Jameson, D. M. & Seifried, S. E., (1999). Quantification of protein-protein interactions using fluorescence polarization. *Methods*, **19**: 222-233.
- [155] Gillmor, C. S., (1971). Charles Augustin Coulomb : Physics and Engineering in Eighteenth Century France. *Princeton, N.J.*

Anexos

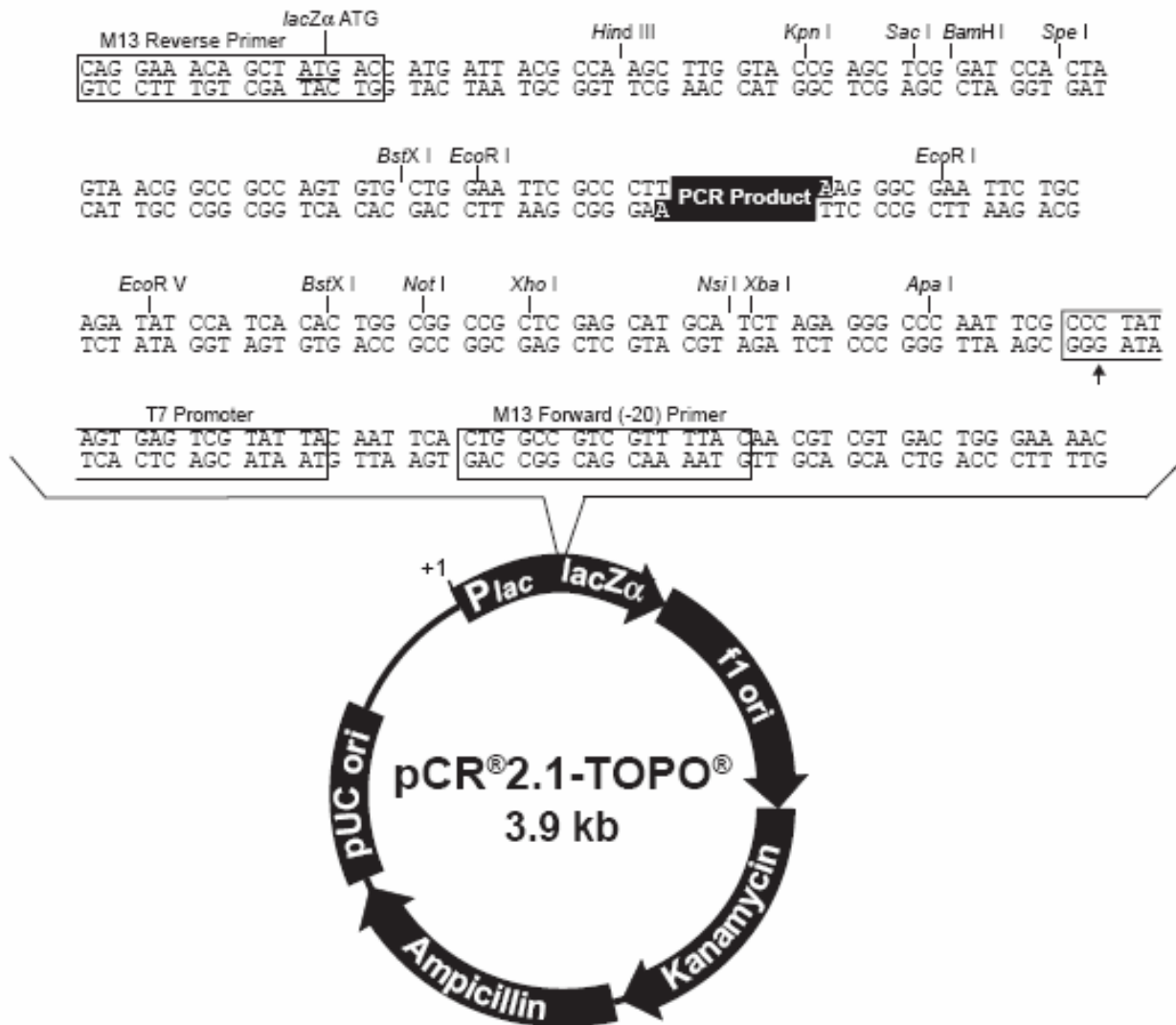
Mapa do vetor de expressão pET28a (Novagen)



Mapa do vetor de expressão pET37b+ (Novagen).

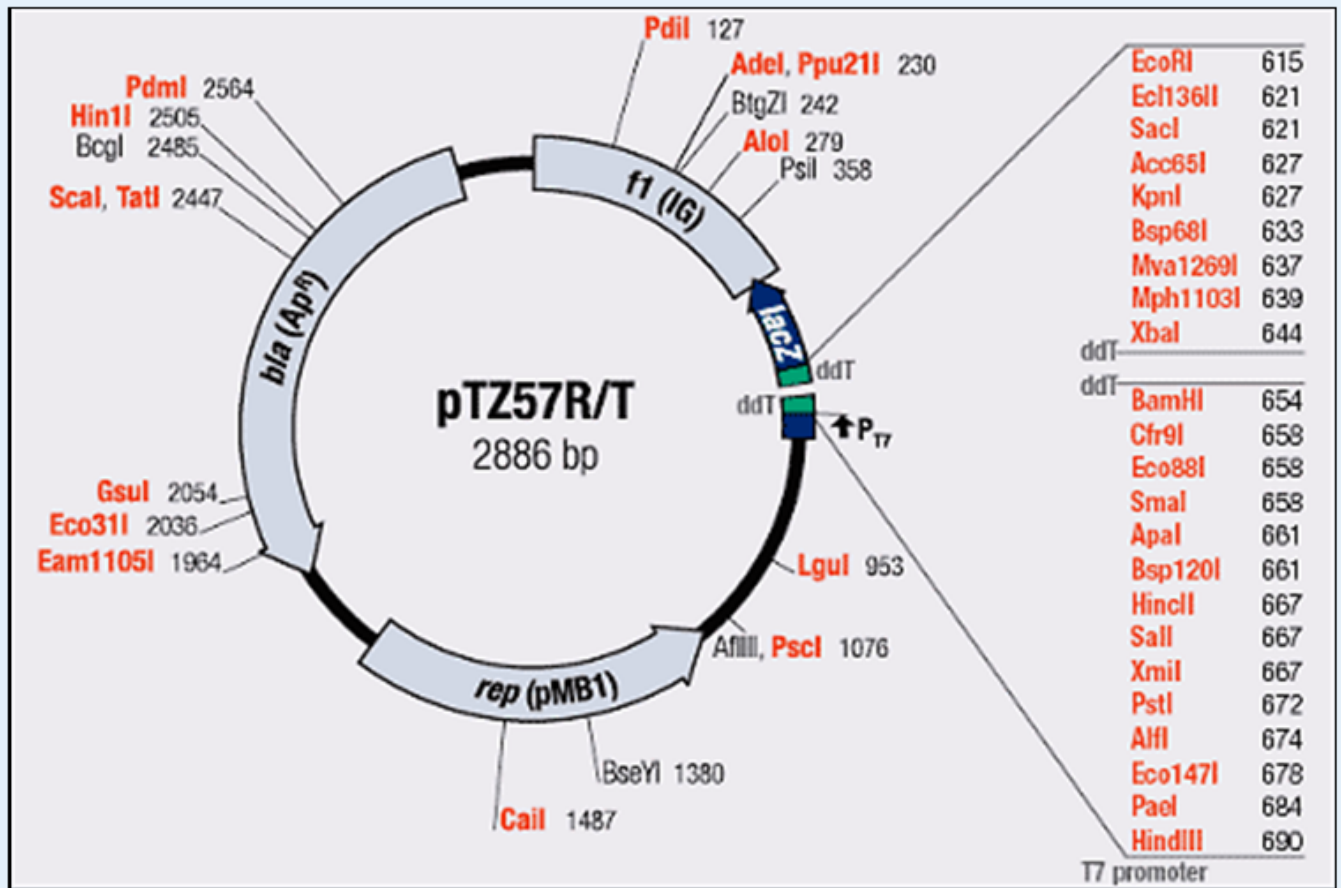


Mapa do vetor de clonagem pCR 2.1 (Invitrogen).



Comments for pCR[®]2.1-TOPO[®]
3931 nucleotides

Mapa do vetor pTZ57R/T (Fermentas).





ACADEMIC
PRESS

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Protein Expression and Purification 31 (2003) 12–18

Protein
Expression
& Purification

www.elsevier.com/locate/yprep

Abrus pulchellus type-2 RIP, pulchellin: heterologous expression and refolding of the sugar-binding B chain

Leandro Seiji Goto,^{a,b} Leila M. Beltramini,^b Derminda I. de Moraes,^b Renato A. Moreira,^c and Ana Paula U. de Araújo^{a,b,*}

^a Programa de Pós-graduação em Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brazil

^b Departamento de Física e Informática, Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, Av. Trabalhador São-carlense, 400, CEP 13566-590, São Carlos, SP, Brazil

^c Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

Received 17 April 2002, and in revised form 24 March 2003

Abstract

Abrus pulchellus type-2 RIP, or pulchellin, is a heterodimeric glycoprotein found in *A. pulchellus* seeds. These chimerolectins, like all type-2 RIPs, are characterized as highly toxic proteins with enzymatic and lectin properties performed by two separate polypeptide subunits. Intending to obtain pure and homogeneous protein for structural and biological studies, the *A. pulchellus* type-2 RIP lectin subunit or pulchellin binding chain encoding gene fragment (PBC) was cloned. Oligonucleotides based on the sequence homologies between other RIPs like abrin and ricin were synthesized and used to amplify the complete PBC from *A. pulchellus* genomic DNA. The amplification product was inserted into plasmid pET28a to express the recombinant PBC (rPBC) in *Escherichia coli* BL21(DE3). The rPBC was expressed as inclusion bodies that were recovered and denatured in a buffer containing urea. Repeated dialysis rounds against the oxidation buffer, which presented the redox pair cysteine–cystine, D-galactose, and decreasing urea concentrations, conducted the protein refolding. The refolding process of rPBC was successfully confirmed by biological assays and circular dichroism.

© 2003 Elsevier Science (USA). All rights reserved.

Keywords: Plant lectin; *Abrus*; Refolding; Type-2 RIP

Progress made in structural analysis and molecular cloning of lectin genes has provided means to group them into seven major families of evolutionarily related proteins [1], one of them the family of type-2 ribosome-inactivating proteins (type-2 RIPs), in which are included plant toxins like ricin, from *Ricinus communis* [2] and abrin, from *Abrus precatorius* [3]. All type-2 RIPs are made up of heterodimeric protomers consisting of disulfide bridge-linked A (active) and B (binding) chains. By endocytosis, promoted upon B chain binding at glycan receptors on the surface of intact cells, A chain may be delivered to the cytosol and thus, inactivate ribosomes [1]. The A chain catalyzes the removal of a specific adenine residue from a highly conserved loop on the large subunit of the ribosomal RNA, thus inducing a conformational change that prevents the binding of EF2

(elongation factor 2) to the ribosome, resulting in cell death due to arrest of protein synthesis [4,5].

The type-2 RIPs B chain properties have potential use as a drug delivery shuttle as shown in the previous literature reports, with the transport of a potent antitumor chimerical trypsin inhibitor into living cells [6], their use as human lymphocyte stimulator [7] and as toxin-antibody conjugates targeted against tumor cells [8,9]. Promotion of RIP-induced cell death through multiple pathways may have important therapeutic implications for RIP-based immunotoxins [10]. The RIPs also display a variety of biological roles such as antiviral [11] and antifungal [12] activities for example. Ricin and abrin A-chains (enzymatic domain) immunotoxins exhibit selective anti-tumor effects in animal tumor models [13,14]. In addition, recent studies have shown that some RIPs might exhibit strong anti-HIV (human immunodeficiency virus) activity [15,16].

* Corresponding author. Fax: +55-16-271-5381.

E-mail address: anapaula@ifsc.usp.br (A.P.U. de Araújo).

Recently, a novel lectin from *Abrus pulchellus tenuiflorus* (Leguminosae, Papilionoideae), named pulchellin, has been described as a highly toxic type-2 RIP-like protein isolated from the seeds, which binds to D-galactose (D-Gal) and D-Gal glycoconjugate moieties, agglutinates human and rabbit erythrocytes, and kills mice and microcrustaceans at very low concentrations [17]. Intending to produce the *A. pulchellus* type-2 RIP B chain (PBC) in large amounts and homogeneous form, here is reported the genomic cloning of this D-Gal binding lectin from *A. pulchellus* seeds. After cloning, recombinant expression in prokaryotic cells was achieved as inclusion bodies, and the recovery of recombinant B chain (rPBC) in a soluble and biologically active form was reached after denaturation of rPBC insoluble inclusion bodies followed by a refolding protocol. Thus, rPBC is now available to biotechnological use in screening, as well as to investigations of the molecular mechanisms involved in its binding processes to cell glycoreceptors.

Materials and methods

Materials

pET28a plasmid vector was purchased from Novagen. Oligonucleotides were supplied by Gibco-BRL. Restriction endonucleases and DNA ladders were from Promega. PCR reagents were obtained from BioLabs. Isopropyl thio- β -D-galactopyranoside (IPTG) was from Sigma and urea from Merck. All other chemicals were analytical grade.

Isolation of plant DNA

Genomic DNA was isolated from fresh leaf tissue of *A. pulchellus* using the cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) DNA extraction protocol [18].

Cloning and engineering of expression plasmid

The whole type 2-RIP gene from *A. pulchellus* has previously been amplified using degenerated oligonucleotides. These were designed based on amino acid residues sequence conservations along the abrin and ricin genes, which encode related type-2 RIPs in distinct plant families. This PCR product was cloned and sequenced in our laboratory facilities (unpublished data). DNA sequencing has shown high homology between *A. pulchellus* type-2 RIP and the other RIPs, abrin, and ricin. Based on this information new oligonucleotide sets were then synthesized to amplify the binding chain gene fragment from *A. pulchellus* (PBC—GenBank Accession No. AY093704) by PCR. An *Nco*I restriction site (underlined), a translation Met start, and an additional

framing Gly codons were included in the forward oligonucleotide pucB/*Nco*I (5'CATGCCATGG GCTCAGAGACGTGCGATCCTTTTGAACC3'). To the reverse oligo pucB/*Not*I (5' TAAGAA TGCGGCCGCTTAAACAAAGTAAGCCATATT TG 3') was added a *Not*I restriction site (underlined). Briefly, the amplification was carried out in a 50 μ l reaction volume containing about 625 ng genomic DNA, 100 pmol of each primer, 0.2 mM dNTPs, and 2 U of *Deep Vent* DNA polymerase (Biolabs) in the PCR buffer recommended by the enzyme manufacturer. PCR was performed with the genomic DNA of *A. pulchellus* as template for 25 cycles (94 °C for 1 min, 55 °C for 1.5 min, and 72 °C for 1 min) followed by 7-min extension at 72 °C in a PTC-100 thermocycler (MJ Research). Both amplified fragment and pET28a (Novagen) plasmid vector were digested with *Nco*I and *Not*I endonucleases and purified. Such digestion resulted in cohesive sticky ends able to directionally insert ligation, which was performed by T4 DNA ligase reaction. *E. coli* DH5 α cells CaCl₂ competent were transformed with the recombinant plasmids by heat shock treatment [19].

Sequencing

Plasmids were sequenced [20] in an ABI Prism 377 automated DNA sequencer (Perkin–Elmer) following the manufacturer's protocol. The whole fragment was sequenced and submitted to *BLAST* script data bank search [21] which, as expected, returned highest sequence identity to abrin, a supposed closely related lectin, further confirming *A. pulchellus* type-2 RIP B chain gene fragment cloning into pET28a. The new plasmid construct was named pPBC and the predicted protein sequence was aligned [22] to abrin-a and ricin B chains for identity analysis.

Protein expression

The expression plasmid pPBC was used to transform CaCl₂ competent *E. coli* BL21(DE3) strain. The transformed cells BL21(DE3)pPBC were grown at 37 °C in Luria–Bertani medium supplemented with kanamycin (50 μ g/ml) up to a cell density absorbance of OD_{600 nm} = 0.4–0.6. Once this density was reached, the expression of recombinant protein was induced with 0.4 mM IPTG and carried out for 4 h at 37 °C. Cell aliquots were collected by centrifugation and analyzed by 15% SDS–PAGE [23]. The remaining cells were resuspended in phosphate buffer saline (PBS), pH 7.4, disrupted either by sonication or by the freezing–thawing technique and the cell lysate was centrifuged at 20,000g. At this point both pellet and supernatant were submitted to SDS–PAGE for solubility analysis of the recombinant *A. pulchellus* type-2 RIP B chain (rPBC).

Recovery of rPBC inclusion bodies

Cells from 1 liter of culture were harvested (yielding ~2 g cell mass) and resuspended in 50 ml PBS plus 1% of Triton X-100. The cells were disrupted by sonication pulses of 30 s or by freezing–thawing for five times. The cell lysate was centrifuged at 20,000g, at 4 °C, yielding a pellet of about 0.08 g containing the insoluble cell fractions and inclusion bodies. These were exhaustively washed with PBS 1% Triton X-100 to remove adsorbed proteins and submitted to a refolding protocol.

Refolding of rPBC

The refolding process was developed according to a modified protocol of a previously described method [24]. After the recovery of rPBC inclusion bodies, the insoluble protein was dissolved in 100 ml of the solubilization buffer (6 M urea, 100 mM NaCl, and 10 mM Tris–HCl, pH 8.5). The same volume of reduction buffer containing 10 mM DTT in 50 mM Tris–HCl, pH 8.5, was added to the sample and the mixture was incubated at room temperature for 30 min. The solution was then diluted again with the oxidation buffer (3 M urea, 5 mM cysteine, 1 mM cystine, 5 mM D-Gal, and 50 mM Tris–HCl, pH 8.5) and dialyzed against the same buffer except that urea concentration was decreased by half in each round. During this process, the dialysis buffer was changed every 12 h. After the complete removal of urea, the solution was concentrated by dialo-filtration in a Centriprep 10 apparatus (Amicon). As a negative control of the refolding an experiment skipping the oxidation step was performed. Circular dichroism (CD) measurements and hemagglutinating activity were used to check the refolding.

CD measurements

CD spectra were recorded with a Jasco J-715 spectropolarimeter over a wavelength range of 195–250 nm. Measurements on rPBC were made in quartz cuvettes of 1-mm path length, recorded as an average of 32 scans. CD spectra were measured in protein solutions of about 0.08 mg/ml in 10 mM Tris–HCl, pH 8.5. CD spectra were obtained in millidegrees and converted to molar ellipticity. Secondary structure fractions were calculated from deconvolution of the CD spectra using the programs *Contin* and *Selcon 3* [25,26] employing a database of 42 proteins.

Size exclusion chromatography

Size exclusion chromatography (SEC) was performed on an Äkta Explorer 10 System (Amersham Pharmacia Biotech) using a pre-packed Superdex 75 HR 10/30 column (Pharmacia) equilibrated with 3 volumes of PBS

or PBS D-Gal. Samples resulting from the refolding process were loaded onto the pre-washed column and eluted with the same buffer, the flow was of 0.5 ml/min, and fractions of 1 ml were collected. The elution was monitored by absorbance at 280 nm. The fractions were pooled, concentrated, and submitted to SDS–PAGE, hemagglutinating activity, and CD measurements.

Hemagglutinating activity

Hemagglutination activity was measured on microagglutination plates using a 2% suspension of human erythrocytes (O group), with an initial protein concentration of 0.08 mg/ml. The rPBC samples were dialyzed against PBS and PBS containing 0.1 M D-galactose before the hemagglutination test. The extent of agglutination of a series of 1:2 dilutions was monitored visually after leaving microplates at room temperature for 30 min. The activity was expressed as the minimum amount of protein still promoting a visible agglutination.

Results and discussion

Cloning and protein expression

Type-2 RIPs are, as described in the literature, composed of two polypeptide chains, one with RIP activity (A-chain) and the other with carbohydrate-binding lectin chain (B-chain) [3,27]. These chains are linked through a disulfide bond [3,27]. The whole gene coding for type-2 RIP from *A. pulchellus* was previously cloned as described in methods, and has shown high homologies with other RIPs like abrin and ricin genes. A fragment from this gene, coding for the B chain (PBC), was amplified by PCR from genomic DNA of *A. pulchellus* originating a product of approximately 800 bp. The delimitation of the B chain in the gene sequence was based on the amino acid sequence alignment of other related type-2 RIPs [28] and the N-terminal sequence of the native B-chain previously obtained (Moreira et al., unpublished data).

The amplified fragment was then cloned into pE T28a expression vector. The deduced amino acid sequence predicted for heterologous gene expression showed an expected high identity to the abrin-a (81%) and to ricin (58%) B chains sequences. The alignment of the abrin-a B chain amino acid sequence and rPBC (Fig. 1) shows that the nine cysteine residues present in abrin share the same positions in the deduced primary sequence of rPBC. This suggests the occurrence of four intrachain disulfide bonds as observed in the abrin structure and the first cysteine residue should be involved in the interchain disulfide bridge [29]. Also by homology to abrin B chain, positional sharing of

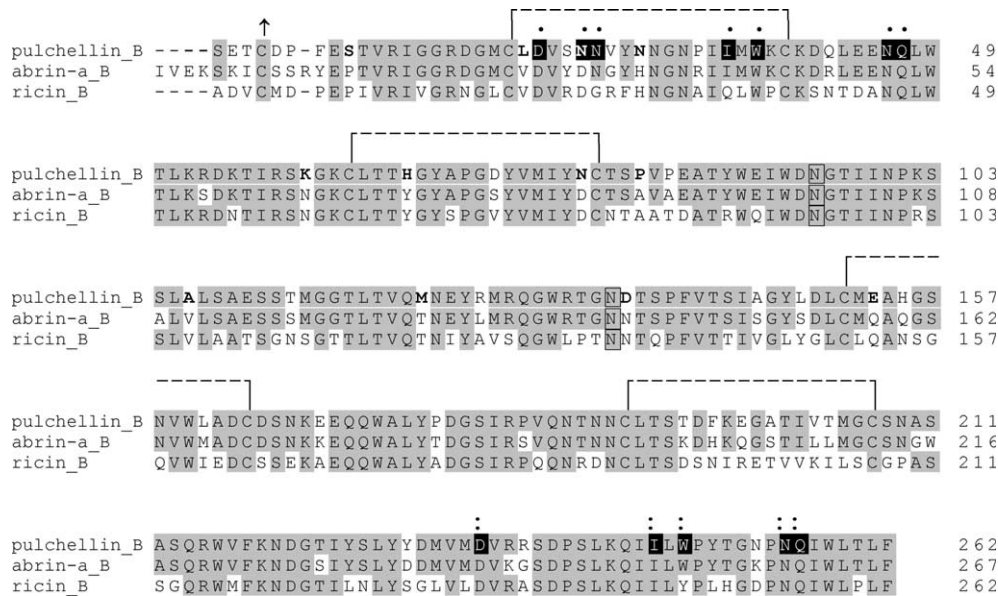


Fig. 1. Deduced amino acid sequence of pulchellin B chain aligned to abrin-a and ricin B chains. Conserved amino acids are highlighted in gray, not conserved residues are boldfaced. Covalent disulfide bonds are shown as dashed lines. Two glycosylation sites were predicted by homology to abrin B chain and are indicated as boxed residues. Black back grounded residues denote likely pulchellin B chain residues involved in potential sugar-binding sites; the first one is indicated as ● and the second as ●●, predicted by homology to abrin B chain. The first cysteine residue (indicated as ↑), also by homology, should be involved in an interchain disulfide bond.

conserved residues involved in two distinct glycosylation sites and two sugar-binding sites (Fig. 1) support the prediction of them in the rPBC. The observed N-glycosylation sites found in the three-dimensional structure of abrin-a B chain [29] are residues Asn100 and Asn140. Analyzing pulchellin B chain amino acid sequence by means of a bioinformatic tool [30] four potential glycosylation sites were found, but only two of them are conserved to the glycosylated residues identified in abrin-a B chain, which are the Asn95 and Asn135 in rPBC.

Analyzing the abrin-a B-chain 3D structure, we verify that residues Asp27, Asp30, Asn31, and Asn51 make hydrogen-bond interactions with the bound sugar [29]. In the rPBC Asp22, Asn25, Asn26, and Asn46 residues occupy, respectively, the equivalent positions, thus these residues must be involved in pulchellin sugar-binding site (Fig. 1). Recently, Soler and co-workers [31] defined two homologous carbohydrate binding sites shared in Mistletoe Lectin I, ricin-d, and abrin-a B chains as Asp23, Gln36, Trp38, Asn47, and Gln48 and Asp236, Ile248, Tyr250, Asn257, Gln258 for Mistletoe Lectin I; Asp22, Gln35, Trp37, Asn46, and Gln47 and Asp234, Ile246, Tyr248, Asn255, and Gln256 for ricin-d; and Asp27, Ile40, Trp42, Asn51, and Gln52 and Asp239, Ile251, Trp253, Asn260, and Gln261 for abrin-a. Based on those observations and our sequence alignment results, we suggest that the Asp22, Asn25, Asn26, Ile35, Trp37, Asn46, and Gln47 and Asp234, Ile246, Trp248, Asn255, and Gln256 residues in rPBC correspond to the two potential sugar binding sites.

The amino acid sequence alignment (Fig. 1) showed that there are substitutions of some residues conserved when compared to abrin and ricin. The alignment among several of the obtained clones indicated the existence of protein isoforms. Preliminary observations that native pulchellin [17] submitted to isoelectrical focussing showed microheterogeneity confirmed our results. Once the sequences were confirmed, one of the clones was chosen (pPBC) for further experiments. Its sequence encodes a mature 264 residues protein of predicted molecular weight around 29.8 kDa, a theoretical isoelectric point at pH 4.9 and an extinction coefficient calculated at $E(\text{rPBC}) = 72260$ [32]. This plasmid was used to transform *E. coli* BL21(DE3) cells that carry a genomic DNA integrated copy of the T7 RNA polymerase gene under expression control of the inducible lacUV5 promoter [33]. The transformed cells, *E. coli* BL21(DE3)pPBC, were induced by addition of IPTG at 37 °C, reaching the production of a major protein band of about 30 kDa within 4 h. SDS-PAGE showed the total insolubility of the new expressed protein (Fig. 2A). Induction at lower temperatures, protein co-expression with chaperones GroESL and thioredoxin [34], as well as the expression as a fusion with thioredoxin in ORIGAMI (Novagen) bacterial host lacking both thioredoxin reductase and glutathione reductase [35], did not increase the solubility of the expressed protein (data not shown). Eukaryotic proteins, especially those whose structures are stabilized by disulfide bonds like rPBC, are frequently produced in *E. coli* as insoluble aggregates or inclusion bodies. Production of

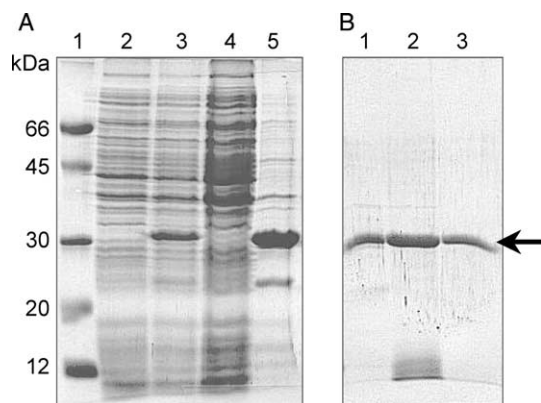


Fig. 2. (A) SDS-PAGE of the rPBC expression. Lane 1, molecular weight markers; lane 2, BL21(DE3)pPBC prior to induction; lanes 3–5, BL21(DE3)pPBC after 4 h of 0.4 mM IPTG induction at 37 °C; lane 3, total cell proteins; lane 4, soluble cell extract in PBS, pH 7.4; and lane 5, insoluble cell extract in PBS, pH 7.4, which contains the rPBC. (B) rPBC refolding and purification. Lane 1, denatured rPBC inclusion bodies recovered in PBS 1% (v/v) Triton X-100, pH 7.4, from the insoluble fraction of BL21(DE3)pPBC cells; lane 2, refolded rPBC prior to SEC; and lane 3, refolded rPBC after SEC elution. The arrow shows the rPBC expression band.

a protein as inclusion bodies can offer the advantage of easy purification. Cell lysis in the presence of a mild detergent such as Triton X-100 can allow the isolation of inclusion bodies from the other cell components [36]. We used PBS with 1% Triton X-100 for efficient recovery of inclusion bodies from the cell lysate. These inclusion bodies containing the rPBC were denatured in 6 M urea (Fig. 2A) and submitted to the refolding process.

Refolding process

After inclusion bodies solubilization (around 0.08 mg/ml), an equal volume of a buffer containing DTT was added to the sample. These conditions promoted the complete solubilization of the rPBC and simultaneously decreased the concentration of denaturing agent to 3 M. An oxidizing buffer containing the redox-pair cysteine-cysteine and D-Gal was added to the solution. In this mixture, cysteine residues were blocked preventing the intra and inter-chain disulfide bonds misformation. Dialysis rounds of 12 h were performed as described in Materials and methods, and the refolding process was monitored by CD measurements. The refolded rPBC was concentrated by dialo-filtration and submitted to the size exclusion chromatography (SEC) on a Superdex 75 column equilibrated and eluted with PBS and PBS + D-Gal (Fig. 3). The figure shows a major peak around 30 kDa (eluted with PBS + D-Gal) and another smaller than 12 kDa when eluted in PBS without D-Gal. This delay, previously described for the native pulchellin, was shown to happen due to rPBC lectin properties interactions with the polysaccharide column matrix.

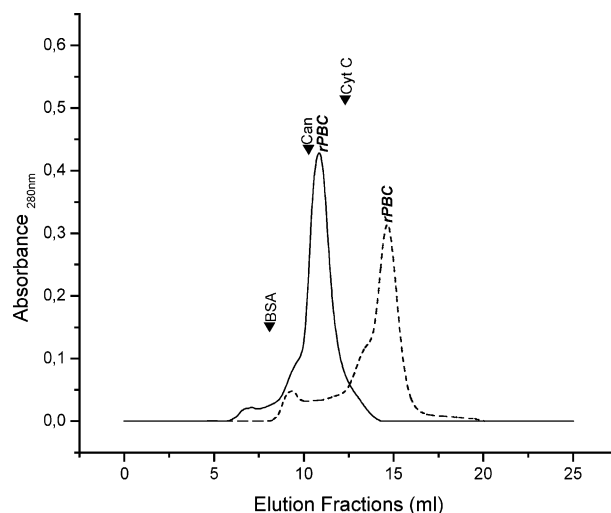


Fig. 3. Size exclusion chromatography of rPBC on the Superdex 75. The positions of the molecular weight markers are indicated as ▼: BSA, bovine serum albumin, 66 kDa; Can, carbonic anhydrase, 30 kDa; and Cyt *c*, cytochrome *c* 12.4 kDa. Straight and dashed lines show the elution of rPBC in PBS + 0.1 M D-Gal and PBS without D-Gal, respectively.

The yield from refolding process after SEC was of 3.71 mg rPBC, corresponding to 45% from the total denatured protein, 8.24 mg (Table 1). SDS-PAGE showed the purified rPBC as a band of about 30 kDa, confirming the SEC results (Fig. 2B, lane 3). The major contaminants present in the refolded sample prior to SEC (Fig. 2B, lane 2) were excluded by the gel filtration and could be found in the latest fractions of the major peak.

Circular dichroism measurements and agglutination of human erythrocytes were used to monitor protein folding.

The major peak from SEC of rPBC was submitted to CD measurements and to the determination of biological activity. The CD spectrum shape of refolded rPBC showed one maximum band at 231 nm (typical of the proteins that contain disulfide bonds), two minima at 214 and 206 nm, and a negative to positive crossover at 199 nm (Fig. 4). This spectrum shows that rPBC

Table 1

The rPBC purification yield calculated from inclusion bodies after solubilization, refolding process after SEC

Step	Total yield
Cells harvesting	2 g ^a
Isolation of inclusion bodies	80 mg ^a
rPBC solubilized	8.24 mg
Refolded purified rPBC	3.71 mg

The cells were collected from 1 liter of culture. Protein concentration was calculated from predicted extinction coefficient calculated at $E(\text{rPBC}) = 72260$.

^a Wet weight of the recovered after centrifugation.

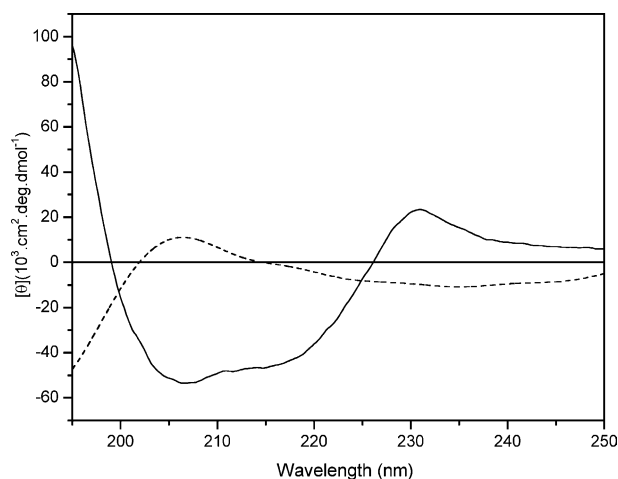


Fig. 4. Circular dichroism spectra of rPBC. Both refolded rPBC (straight line) and denatured rPBC (dashed line) spectra were obtained from rPBC at a concentration of 0.08 mg/ml in 10 mM Tris-HCl, pH 8.5. Measurements were performed using quartz cuvettes of 1-mm path length and recorded from 195 to 250 nm as the average of 32 scans at 25 °C.

assumed its secondary structure and is compatible with a correct protein fold.

The CD spectra were also used to calculate the contributions of typical secondary structures present in rPBC. The *Contin* and *Selcon 3* programs [25,26] showed that the β -sheet was the predominant component, and that there were about 10% of helix and 30% of unordered structures. The helix fraction probably expresses a 3_{10} helix content similar to the one observed for the B chain structure of abrin from *A. precatorius* [29].

Native pulchellin from *A. pulchellus* seeds has been previously described as a highly toxic type-2 RIP-like protein that presents hemagglutinating activity due to D-Gal binding sites within its B chain [37]. Similar to abrin [29], the rPBC structure should consist of two domains, each one comprising of one sugar-binding site. The agglutination of erythrocytes and the inhibition of hemagglutination by D-Gal confirmed the presence of at least two D-Gal binding sites within rPBC.

rPBC was submitted to immunodetection using anti-*A. pulchellus* toxins antibodies which were able to recognize the recombinant protein (data not shown). Ramos et al. describe that antibodies anti-*A. pulchellus* toxins fully recognized *A. pulchellus* toxins, however only partial recognition was observed for *A. precatorius* toxin fraction, indicating that they are not related by immunochemical properties, although type-2 RIPs share many chemical, structural, and functional features [17]. In this sense, it is further supported that *A. pulchellus* type-2 RIP B chain cloning and recombinant expression were fulfilled.

When the refolding process was carried out in the absence of D-Gal, the protein did not present hemagglutinating activity and the CD spectrum was typical of

unfolded protein. The successful refolding process has been described in the ligand presence that may interact with the protein, stabilizing its structure in an entropically favorable refolding way [38]. Also, this process is compatible with the nucleation-condensation model proposed for protein folding [38–40]. Thus, it is supported that the sugar-binding sites provide a nucleus in the refolding process.

Despite the absence of glycosylation in the recombinant protein, there have been contradictory reports regarding whether the glycosylation is essential for lectin function [41–43]. The ability to bind D-Gal was preserved in the refolded rPBC demonstrating that the lack of glycans in this case did not prevent the carbohydrate binding function.

In conclusion, the cloning, expression, and refolding of the rPBC were effectively established, and furthermore, rPBC refolding only happened in the presence of the binding sugar. Thus, rPBC is now available for biotechnological use in screening and investigations of molecular mechanisms involved in the cell surface binding processes.

Acknowledgments

This work was supported by grants from FAPESP (Brazilian Agency). L.S. Goto has a fellowship from CAPES. The authors are grateful to Dr. Glaucius Oliva for reviewing the manuscript.

References

- [1] E.J.M. Van Damme, W.J. Peumans, A. Barre, P. Rougé, Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles, *Crit. Rev. Plant Sci.* 17 (6) (1998) 575–692.
- [2] S. Olsnes, A. Pihl, Different biological properties of the two constituent peptide chains of ricin, a toxic protein inhibiting protein synthesis, *Biochemistry* 31; 12 (16) (1973) 3121–3126.
- [3] S. Olsnes, A. Pihl, Isolation and properties of abrin: a toxic protein inhibiting protein synthesis: evidence for different biological functions of its two constituent-peptide chains, *Eur. J. Biochem.* 35 (1) (1973) 179–185.
- [4] Y. Endo, K. Mitsui, M. Motizuki, K. Tsurungi, The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes: the site and the characteristics of the modification in 28S ribosomal RNA caused by the toxins, *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 5908–5912.
- [5] L. Barbieri, P. Valbonesi, P. Gorini, A. Pession, F. Stirpe, Polynucleotide adenosine glycosidase activity of saporin-L1: effect on DNA, RNA and poly(A), *Biochem. J.* 319 (1996) 507–513.
- [6] J.Y. Lin, Y.S. Hsieh, S.C. Chu, Chimeric protein: abrin B chain-trypsin inhibitor conjugate as a new antitumor agent, *Biochem. Int.* 19 (2) (1989) 313–323.
- [7] O. Closs, E. Saltvedt, S. Olsnes, Stimulation of human lymphocytes by galactose-specific abrus and ricinus lectins, *J. Immunol.* 115 (4) (1975) 1045–1048.

- [8] A.E. Frankel, T. Fu, C. Burbage, E. Tagge, B. Harris, Lectin-deficient ricin intoxicates cells bearing the D-mannose receptor, *Carbohydr. Res.* 300 (1997) 251–258.
- [9] I. Pastan, L.H. Pai, U. Brinkmann, D. FitzGerald, Recombinant immunotoxins, *Breast Cancer Res. Treatment* 38 (1) (1996) 3–9.
- [10] K. Nielsen, R.S. Boston, Ribosome-inactivating proteins: a plant perspective, *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 52 (2001) 785–816.
- [11] J.M. Vivanco, M. Querci, L.F. Salazar, Antiviral and antiviral activity of MAP-containing extracts from *Mirabilis jalapa* roots, *Plant Dis.* 83 (12) (1999) 1116–1121.
- [12] C.P. Selitrennikoff, Antifungal proteins, *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (7) (2001) 2883–2894.
- [13] P.E. Thorpe, D.C. Blakey, A.N.F. Brown, P.P. Knowles, R.E. Knyba, P.M. Wallace, G.J. Watson, E.J. Wawrzynczak, Comparison of 2 anti-thy 1.1-Abrin A-chain immunotoxins prepared with different cross-linking agents-antitumor effects, in vivo Fate, and tumor-cell mutants, *J. Natl. Cancer Inst.* 79 (5) (1987) 1101–1112.
- [14] R.J. Kreitman, I. Pastan, Immunotoxins for targeted cancer therapy advanced, *Drug Deliv. Rev.* 31 (1–2) (1998) 53–88.
- [15] J.M. Zarling, P.A. Maran, D. Haffar, J. Sias, D.D. Richman, C.A. Spina, D.A. Myers, J.A. Kuebelbeck, F.M. Uckum, Inhibition of HIV replication by pokeweed antiviral protein targeted CD4⁺ cells by monoclonal antibodies, *Nature* 347 (1990) 92–95.
- [16] T.K. Au, R.A. Collins, T.L. Lam, T.B. Ng, W.P. Fong, D.C.C. Wan, The plant ribosome inactivating proteins luffin and saporin are potent inhibitors of HIV-1 integrase, *FEBS Lett.* 471 (2000) 169–172.
- [17] M.V. Ramos, D.M. Mota, C.R. Teixeira, B.S. Cavada, R.A. Moreira, Isolation and partial characterisation of highly toxic lectins from *Abrus pulchellus* seeds, *Toxicon* 36 (3) (1998) 477–484.
- [18] S.L. Dellaporta, J. Wood, J.B. Hicks, A plant DNA miniprep: version II, *Plant Mol. Biol. Rep.* 1 (4) (1983) 19.
- [19] F. Ausubel et al., Introduction of plasmid DNA into cells, in: *Short Protocols in Molecular Biology*, third ed., John Wiley, USA, 1995, pp. 1.21–1.22.
- [20] F. Sanger, A.R. Coulson, G.F. Hong, D.F. Hill, G.B. Petersen, DNA sequencing with chain-termination inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (1977) 5463–5467.
- [21] S.F. Altschul, T.L. Madden, A.A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D.J. Lipman, Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res.* 25 (1997) 3389–3402.
- [22] J.D. Thompson, T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, D.G. Higgins, The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools, *Nucleic Acids Res.* 24 (1997) 4876–4882.
- [23] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [24] M. Itoh, K. Masuda, Y. Ito, T. Akizawa, M. Yoshida, K. Imai, Y. Akada, H. Sato, M. Seiki, Purification and refolding of recombinant human proMMP-7 (pro-Matrilysin) expressed in *Escherichia coli* and its characterization, *J. Biochem.* 119 (1996) 667–673.
- [25] N. Sreerama, R.W. Woody, Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of Contin, Selcon, and CDSSTR methods with an expanded reference set, *Anal. Biochem.* 287 (2000) 252–260.
- [26] N. Sreerama, S.Y. Venyaminov, R.W. Woody, Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: inclusion of denatured proteins with native proteins in the analysis, *Anal. Biochem.* 287 (2000) 243–251.
- [27] S. Olsnes, A. Pihl, Toxic lectins and related proteins, in: P.C. Cohen, S. Van Heyningen (Eds.), *Molecular Action of Toxins and Viruses*, vol. 2, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, 1982, pp. 51–105.
- [28] K.A. Wood, J.M. Lord, E.J. Wawrzynczak, M. Piatak, Prepro-abrin: genomic cloning, characterisation and the expression of the A-chain in *Escherichia coli*, *Eur. J. Biochem.* 198 (3) (1991) 723–732.
- [29] T.H. Tahirou, T.H. Lu, Y.C. Liaw, Y.L. Chen, J.Y. Lin, Crystal structure of abrin at 2.14 Å, *J. Mol. Biol.* 250 (1995) 354–367.
- [30] A. Bairoch, PROSITE: a dictionary of protein sites and patterns, in: *EMBL Biocomputing Technical Document 4*, EMBL, Heidelberg, Germany, 1990.
- [31] M.H. Soler, S. Stoeva, W. Voelter, Complete amino acid sequence of the B chain of mistletoe lectin I, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 246 (1998) 596–601.
- [32] S.C. Gill, P.H. von Hippel, Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data, *Anal. Biochem.* 182 (2) (1989) 319–326.
- [33] F.W. Studier, B.A. Moffatt, Use of bacteriophage T7 polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes, *J. Mol. Biol.* 189 (1986) 113–130.
- [34] T. Yasukawa, C. Kanei-Ishii, T. Maekawa, J. Fujimoto, T. Yamamoto, S. Ishii, Increase of solubility of foreign proteins in *Escherichia coli* by coproduction of the bacterial thioredoxin, *J. Biol. Chem.* 270 (43) (1995) 25328–25331.
- [35] F. Åslund, P. Bessette, G. Georgiou, J. Beckwith, Efficient production of disulfide bonded proteins in the cytoplasm in “oxidizing” mutants of *E. coli*, *Innovations* 10 (2000) 11–12.
- [36] J. Futami, Y. Tsushima, H. Tada, M. Seno, H. Yamada, Convenient and efficient in vitro folding of disulfide-containing globular protein from crude bacterial inclusion bodies, *J. Biochem. (Tokyo)* 127 (3) (2000) 435–441.
- [37] M.V. Ramos, C.R. Teixeira, L.R. Bomfim, S.V.F. Madeira, R.A. Moreira, The carbohydrate-binding specificity of a highly toxic protein from *Abrus pulchellus* seeds, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 94 (2) (1999) 185–188.
- [38] A.R. Fersht, Nucleation mechanisms in protein folding, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7 (1997) 3–9.
- [39] C.B. Anfinsen, Principles that govern the folding of protein chains, *Science* 181 (4096) (1973) 181–223.
- [40] P.T. Campana, D.I. Moraes, A.C. Monteiro-Moreira, L.M. Beltramini, Unfolding and refolding studies of frutalin, a tetrameric D-galactose binding lectin, *Eur. J. Biochem.* 269 (3) (2002) 753–758.
- [41] P.T. Richardson, K. Hussain, H.R. Woodland, J.M. Lord, L.M. Roberts, The effects of N-glycosylation on the lectin activity of recombinant ricin B chain, *Carbohydr. Res.* 213 (1991) 19–25.
- [42] A. Tonevitsky, A. Toptygin, I. Agapov, U. Pfueller, A. Frankel, Renaturated ricin toxin B chain made in *Escherichia coli* is soluble, stable, and biologically active, *Biochem. Mol. Biol. Int.* 32 (6) (1994) 1139–1146.
- [43] I. Everts, C. Villmann, M. Hollmann, N-Glycosylation is not a prerequisite for glutamate receptor function but is essential for lectin modulation, *Mol. Pharmacol.* 52 (5) (1997) 861–873.

Pulchellin, a highly toxic type 2 ribosome-inactivating protein from *Abrus pulchellus*

Cloning, heterologous expression of A-chain and structural studies

André L. C. Silva¹, Leandro S. Goto¹, Anemari R. Dinarte², Daiane Hansen³, Renato A. Moreira⁴, Leila M. Beltramini¹ and Ana P. U. Araújo¹

¹ Centro de Biotecnologia Molecular Estrutural, Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, Brazil

² Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, Brazil

³ Universidade Federal de São Paulo-EPM, Brazil

⁴ Universidade Federal do Ceará, Brazil

Keywords

abrin; lectin; ribosome-inactivating protein; RNA *N*-glycosidase

Correspondence

A. P. U. Araújo, Grupo de Biofísica Molecular e Espectroscopia, Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, Caixa Postal 369, CEP 13560-970, São Carlos, SP, Brazil
E-mail: anapaula@if.sc.usp.br

(Received 15 October 2004, revised 6 December 2004, accepted 5 January 2005)

doi:10.1111/j.1742-4658.2005.04545.x

Pulchellin is a type 2 ribosome-inactivating protein isolated from seeds of the *Abrus pulchellus tenuiflorus* plant. This study aims to obtain active and homogeneous protein for structural and biological studies that will clarify the functional aspects of this toxin. The DNA fragment encoding pulchellin A-chain was cloned and inserted into pGEX-5X to express the recombinant pulchellin A-chain (rPAC) as a fusion protein in *Escherichia coli*. The deduced amino acid sequence analyses of the rPAC presented a high sequential identity (> 86%) with the A-chain of abrin-c. The ability of the rPAC to depurinate rRNA in yeast ribosome was also demonstrated *in vitro*. In order to validate the toxic activity we promoted the *in vitro* association of the rPAC with the recombinant pulchellin binding chain (rPBC). Both chains were incubated in the presence of a reduced/oxidized system, yielding an active heterodimer (rPAB). The rPAB showed an apparent molecular mass of ≈ 60 kDa, similar to the native pulchellin. The toxic activities of the rPAB and native pulchellin were compared by intraperitoneal injection of different dilutions into mice. The rPAB was able to kill 50% of the tested mice with doses of $45 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Our results indicated that the heterodimer showed toxic activity and a conformational pattern similar to pulchellin. In addition, rPAC produced in this heterologous system might be useful for the preparation of immunoconjugates with potential as a therapeutic agent.

Ribosome-inactivating proteins (RIPs; EC 3.2.2.22) are RNA *N*-glycosidases that depurinate the major ribosomal RNA (rRNA), thus damaging ribosomes and arresting protein synthesis [1]. RIPs are found predominantly in higher plants, but are also present in algae [2], fungi [3] and bacteria [4]. They vary greatly in their physical properties and cellular effects [5]. Based on the structural properties and their corresponding genes, RIPs have been classified as types 1, 2 and 3 [6].

Type 2 RIPs, like ricin and abrin, are highly toxic heterodimeric proteins that consist of a polypeptide with RIP activity (A-chain) linked to a galactose-binding lectin (B-chain) via a disulfide bond [7]. The A-chain is the catalytic subunit that exhibits rRNA *N*-glycosidase activity by removing a specific adenine residue from a conserved loop (ricin/sarcin loop) of the largest RNA in the ribosome [8]. This modification induces a conformational change that prevents binding

Abbreviations

CD, circular dichroism; GST, glutathione S-transferase; LD₅₀, median lethal dose; PAC, pulchellin A-chain; RIP, ribosome-inactivating protein; rPAB, recombinant pulchellin heterodimer; rPAC, recombinant pulchellin A-chain; rPBC, recombinant pulchellin B-chain.

of elongation factor 2 (EF2) to the ribosome, resulting in cell death due to protein synthesis arrest [9]. The B-chain has lectin properties, preferentially binding to galactosyl-terminated glycoproteins on the surface of eukaryotic cells leading to endocytosis. It also facilitates A-chain penetration of the lipid bilayer and entrance into the cytosol [10]. Despite toxic activity, one group of type 2 RIPs is much less toxic to cells and animals, but shares structural and enzymatic properties with highly toxic RIPs. This group has been named nontoxic type 2 RIPs [11].

There has been considerable interest in RIPs due to their potential role in the development of therapeutic agents. Perhaps the most promising approach to applying RIPs in therapy is the use of immunotoxins in which the toxic A-chain is linked to antibodies directed toward specific cells [12,13]. Several immunotoxins derived from RIPs have been made and assayed against specific target cells *in vitro* and *in vivo* [14,15]. In addition, RIPs also display antiviral [16], antibacterial [17] and antifungal [18] activities. The apparent defense role against pathogens also extends to insect pests [19,20].

Abrus pulchellus tenuiflorus (Leguminosae-Papilionoideae) seeds contain a highly toxic protein named pulchellin. Pulchellin is a type 2 RIP that exhibits specificity for galactose and galactose-containing structures, agglutinates human and rabbit erythrocytes, and kills mice and the microcrustacean *Artemia salina* at very low concentrations [21]. Here we report the cloning of pulchellin A-chain (PAC), its cDNA characterization, expression of recombinant toxic A-chain (rPAC) in *Escherichia coli*, and the *in vitro* association of the rPAC and recombinant pulchellin binding chain (rPBC) [22], which produces an active heterodimer. We also performed structural studies of the recombinant proteins using circular dichroism spectroscopy.

The cloning process will enable the production of soluble and active homogeneous protein, which is desirable to the study of its use in immunotherapy. Comparison of the primary sequences of type 2 RIPs and their structural characterization will clarify small differences that significantly change the cytotoxicity of such proteins, making them more appropriate for therapeutic use.

Results

Isolation and cloning of the pulchellin A-chain gene fragment

Clones of several RIP-2 toxins, such as ricin and abrin have been obtained in other laboratories and shown to

belong to a multigene family. Also, as with other plant lectin genes, these genes contain no introns [30–32]. Thus, our initial cloning strategy was based on the assumption that a similar situation also occurs in pulchellin from *A. pulchellus* based on its phylogenetic closeness to abrin.

Using degenerated primers, it was possible to amplify the fragment corresponding to the A-chain (active) and part of the B-chain (binding). After PCR, the amplified product was ≈ 970 bp, as predicted based on taxonomic proximity exhibited between pulchellin and abrin. The genomic sequence obtained was submitted to homology search using BLAST software, which gave a nucleotide identity of 84% to abrin-c A-chain precursor from *Abrus precatorius*.

Based on the cloned sequence, specific primers were designed to obtain 5'-end sequence information via 5' RACE. As expected, this amplification product revealed a band around 450 bp with a high identity to the preproabrin gene of *A. precatorius*.

Taken together, the results of genomic cloning and 5' RACE, indicated a 34-amino acid N-terminal leader peptide, 251 residues corresponding to pulchellin A-chain and a small linker peptide (14 residues) joining the A- and B-chains. As it was found that the Glu-Asp-Arg-Pro-Ile N-terminal sequence of native pulchellin A-chain after the amino acid sequence is very similar to that reported for the N-terminus of the abrin-c A-chain, it was possible to define the first amino acid of the mature PAC. Comparing the amino acid sequences with that of the abrin-c A-chain precursor from *A. precatorius*, similarities of 88, 86 and 93%, were found, respectively, for each region. The presence of both leader and linker peptides, as other type 2 RIPs, is strong evidence that pulchellin is also synthesized as a single chain precursor.

The N-terminal leader sequence directs the immature precursor to the endoplasmic reticulum [33] and the linker peptide has been reported as a signal leading the toxin to the vacuoles [34]. Both the N-terminal leader and linker peptide are post-translationally excised resulting in an active toxin comprising two mature subunits. The overall sequence homology of the pulchellin linker peptide is high, differing in only one amino acid residue among 14 present on the abrin-c linker, possibly suggesting the same biological roles for the sequences.

Expression, purification and characterization of the recombinant pulchellin A-chain

From *A. pulchellus* genomic DNA, the fragment encoding the mature PAC was amplified by PCR using a

new set of primers giving rise to a product of ≈ 850 bp. The deduced amino acid sequence of this gene fragment showed a high identity to abrin-c (86%), abrin-a (78%) and ricin (38%) A-chain sequences (Fig. 1). The PAC sequence encodes a mature protein with a predicted molecular mass of around 29 kDa and a theoretical isoelectric point of 5.5. Alignment of the deduced amino acid sequences shows that all residues involved in the active site as described for abrin-a, abrin-c and ricin are conserved in the sequence reported here. Recent analyses of the crystal structures of ricin, trichosanthin, pokeweed antiviral protein, momordin and abrin-a indicate that the overall architecture of the active site cleft remains constant in all these proteins [10,35]. In addition, the sequence of PAC presented only one cysteine residue that should be involved in the interchain disulfide bridge.

The DNA fragment encoding PAC was inserted into a pGEX 5X-1 vector (Amersham-Pharmacia) to express the recombinant A-chain as a protein fusion with glutathione *S*-transferase (GST). *Escherichia coli*

AD 202 harboring pGEX-rPAC was used to produce soluble recombinant fusion protein with the predicted molecular mass (≈ 60 kDa) (Fig. 2A). The fusion protein was purified from the cell lysate by affinity chromatography on a glutathione-Sepharose column. After elution, the fusion protein was submitted to Factor Xa cleavage for 16 h, at 12 °C. Free recombinant pulchellin A-chain (rPAC) was purified in an additional chromatographic step in a Mono-Q ion-exchange column. The yield of the rPAC soluble protein was of $\approx 3 \text{ mg L}^{-1}$ of the Luria-Bertani media culture. The rPAC was homogeneous upon analysis on 15% SDS/PAGE, with an apparent molecular mass of 29 kDa (Fig. 2B). The rPAC was also submitted to immunodetection using polyclonal antibodies (anti-native pulchellin), which recognized the recombinant protein (Fig. 2C).

RNA *N*-glycosidase activity of the rPAC

An RNA depurination test was used to confirm the *in vitro* enzymatic activity of rPAC. Figure 3 shows an

abrin-c A	----QDQVIKFTTEGATSQSYKQFIEALRQLRTG--GLIHDIPVLPDPTTVEERNRYITV	54
rPAC	----EDRPIEFTEGATSQSYKQFIEALRASLTD--RLIHGIPVLRDPTTVEERNRYITV	54
abrin-a A	----EDRPIKFSTEGATSQSYKQFIEALRERLRG--GLIHDIPVLPDPTTLQERNRYITV	54
RTA	IFPKQYPIINFITTAGATVQS YTNFIRAVRGRLLTTGADVRHEIPVLPNRVGLPINQRFILV	60
*		
Abrin-c A	ELNSERESIEVGIDVINAYVVAYRAGSQSYFLR---DAPASASTYLFPPTQ-RYSLRFD	110
rPAC	ELNSERESIQVGIDVINAYVVAYRAGTQSYFLR---DAPRYASTYLFTDTQ-QHSLRFD	110
Abrin-a A	ELNSDTESEIEVGIDVINAYVVAYRAGTQSYFLR---DAPSSADYLFDTGTD-QHSLPFY	110
RTA	ELSNHAELS VTLALD VINAYVVG YRAGNSAYF FHPDNQEDAEA ITHLFTDVQNRYTFAFG	120
* * * * *		
abrin-c A	GSYGDLERWHT-REEISLG---LQALTHAISFLRSGANDDEEKARTLIVIIQMA SEEAR	167
rPAC	GSYSDLQRWAQQSREQISLG---LQALTHAISFLHSGTNDREAHMTIIVIIQMA SEEAR	167
abrin-a A	GTYGDLERWAHQSRQ QIPLG---LQALTHGISFFRSGGNDNEEKARTLIVIIQMV AEAAR	167
RTA	GNYDRLEQLAGNLRNIELGNGP LEEAISALY YYSTGGTQLPTLARSFI ICIQMI SEEAR	180
** *		
abrin-c A	YRYISNRVGVSI RTGTAFQDPAMLS LENNWDNLSGGVQQSVQDTFPNNVILSSINRQPV	227
rPAC	YRYISNRVGVSI RTSTAFQDPAMLS LENNWDNLSGGVQQSVQDTFPNNVILSSINRQPV	227
abrin-a A	FRYISNRVVRVSIQGTAFQPDAA M I S LENNWDNLSRGVQESVQDTFPNQVTLTNIRNEPV	227
RTA	FQYIEGEMRTRIRYNRRSAPDPSVIT LENSWGRLSTAI QESNQ GAFASPIQLQRRNGSKF	240
↓		
abrin-c A	VVDLSHSPTVAVLALMLFVCNPPN----	251
rPAC	VVDLSHSPTLAVLALMLFVCNPPN----	251
abrin-a A	IVDLSHSPTVAVLALMLFVCNPPN----	251
RTA	SVYDVS-ILLPIIALM VYRCAPPPSSQF	267

Fig. 1. Deduced amino acid sequence of recombinant pulchellin A-chain (rPAC) aligned to abrin-a, abrin-c and ricin (RTA) A-chains. Conserved amino acids are highlighted in gray. rPAC residues involved in the potential active site cleft, as predicted by homology to RTA, abrin-a and abrin-c A-chains, are bold and indicated by *. The cysteine residue (indicated by ↓), also due to homology, should be involved in an interchain disulfide bond.

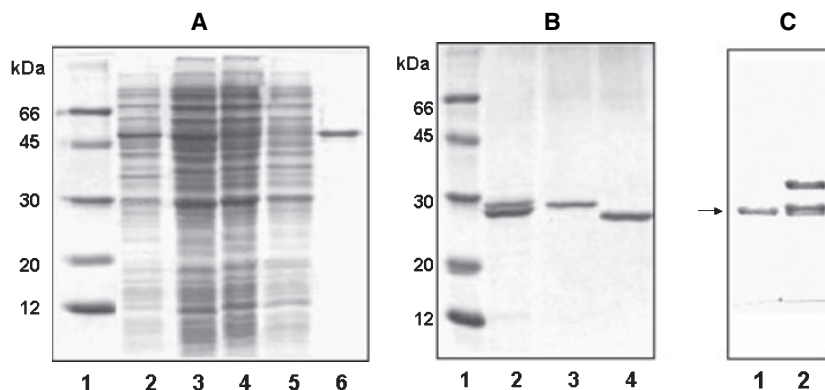


Fig. 2. (A) A-chain expression analysis in SDS/PAGE, 15%. Lane 1, molecular mass marker; lanes 2 and 3, total proteins from *E. coli* AD 202-pGEX-rPAC not induced and induced by 0.4 mM isopropyl thio- β -D-galactopyranoside, respectively; lane 4, soluble fraction from cellular lysates after sonication; lane 5, insoluble fraction; lane 6, fusion protein (A-chain plus GST) eluted from affinity resin. (B) rPAC purification analysis in SDS/PAGE, 15%. Lane 1, molecular mass marker; lane 2, fusion protein (GST + PAC) after Factor Xa cleavage; lane 3, samples eluted from the major peak of the Mono-Q, corresponding to the rPAC; lane 4, fraction eluted corresponding to GST. (C) Western blot analysis using rabbit polyclonal antibodies against native pulchellin. Lane 1, rPAC; lane 2, native pulchellin.

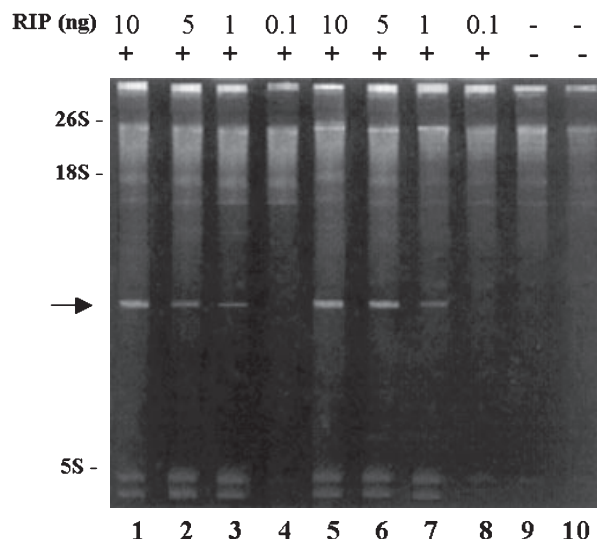


Fig. 3. *N*-glycosidase activities of rPAC and native pulchellin. Yeast ribosomes (20 μ g) were incubated with different amounts (10, 5, 1 and 0.1 ng) of rPAC and native pulchellin for 1 h at 25 $^{\circ}$ C. The rRNAs were extracted and treated with 1 M aniline-acetic for 4 min at 60 $^{\circ}$ C. Samples were analyzed by denaturing agarose-formamide gel electrophoresis and staining with ethidium bromide. Yeast ribosomes samples treated with rPAC (lanes 1–4), native pulchellin (lanes 5–8) and without treatment (negative control) (lanes 9–10) are shown. The arrow indicates the position of the small RNA fragment released upon aniline treatment of rRNA. +, presence of aniline treatment; -, absence of aniline treatment.

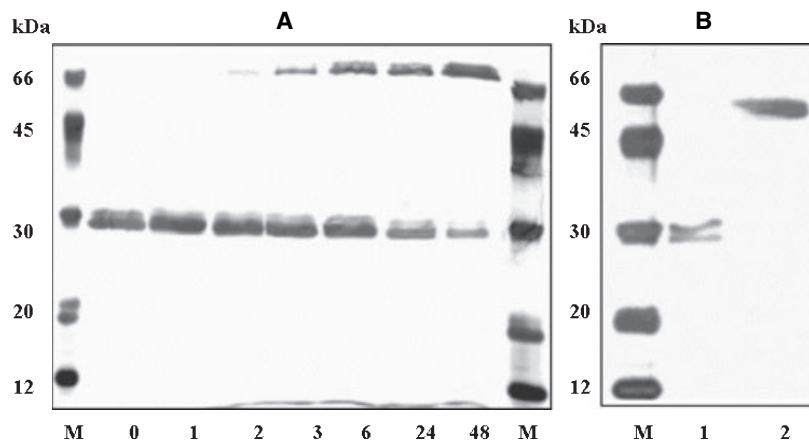
ethidium bromide-stained electrophoresis gel of aniline-treated yeast ribosomal RNA incubated with different amounts of rPAC and native pulchellin (as positive control). Aniline treatment of rRNA from

yeast ribosomes incubated with RIP at 10, 5 and 1 ng released a fragment of \approx 370 nucleotides. In contrast, incubation of ribosome with 0.1 ng did not result in depurination. The depurination assay performed in the absence of rPAC or native pulchellin also failed to generate the RNA fragment. Taken together, these results suggest that the rPAC possesses RNA *N*-glycosidase activity just like the native pulchellin.

***In vitro* association of rPAC and rPBC**

In an attempt to check the toxic activity of the rPAC *in vivo*, a protocol was used to obtain a functional heterodimer (named rPAB). The *in vitro* association of the two pulchellin subunits (expressed separately) was achieved by using an oxidized/reduced system as described in Experimental procedures. rPBC, obtained after the refolding process [22], and rPAC were pooled and incubated in 50 mM Tris/HCl buffer 100 mM NaCl, pH 8.0. Formation of the active rPAB heterodimer could be detected after 2 h incubation (Fig. 4A). At 4 $^{\circ}$ C, a plateau of recombinant heterodimer formation was reached \approx 48 h after the onset of the experiment. The yield of the rPAB association process was 0.2 mg, corresponding to 20% of the total theoretically obtainable heterodimer. After association, the protein was loaded into a CentriPrep (30 000 cut-off, Millipore) and dialyfiltrated against the incubation buffer to separate the heterodimer from free rPAC and rPBC. Figure 4(B) shows the purity of the rPAB heterodimer after dialyfiltration, under reducing (lane 1) and non-reducing (lane 2) conditions in SDS/PAGE silver-stained. An apparent molecular mass of \approx 59 kDa for

Fig. 4. *In vitro* association of rPAC with rPBC. (A) rPAC was incubated with rPBC in the presence of a reduced/oxidized cysteine system at 4 °C for 48 h. The reaction products were analyzed using 15% SDS/PAGE and were silver-stained. Lane M, protein marker; numbered lanes correspond to incubation times. rPAB heterodimer appears as an additional band of ≈ 60 kDa after 2 h incubation (lanes 2–48). (B) rPAB heterodimer after dialfiltration, under reducing (lane 1) and nonreducing (lane 2) conditions.



the heterodimer is expected because the molecular masses of rPAC and rPBC, are ≈ 29.2 and 29.8 kDa [22], respectively. The native pulchellin has an apparent molecular mass of 60 kDa [21] due to the native glycosylation process [36].

Circular dichroism and biological activity of the rPAB heterodimer

Circular dichroism (CD) measurements and biological tests were used to investigate the similarity between the native pulchellin and the rPAB heterodimer. Figure 5 shows the far-UV CD spectra of rPAC, rPBC, rPAB and native pulchellin. CD analyses for the rPAC

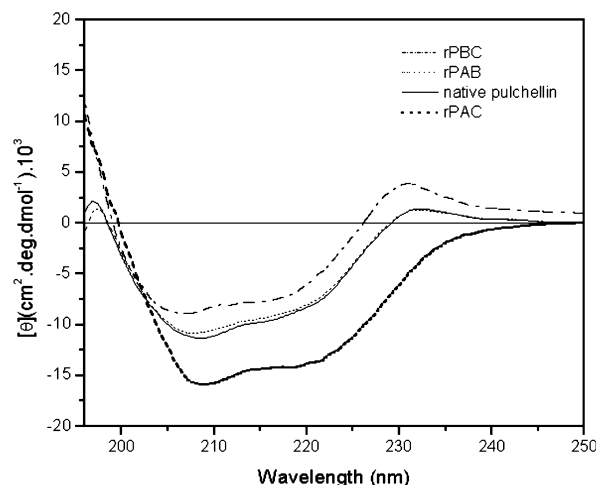


Fig. 5. CD spectra of recombinant pulchellin A-chain (rPAC), recombinant pulchellin B-chain (rPBC), recombinant pulchellin (rPAB) and native pulchellin. Spectra were obtained from each protein at a concentration of $0.3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ in 20 mM Tris/HCl, pH 8.0. Measurements were performed using quartz cuvettes of 1 mm path length and recorded from 195 to 250 nm as the average of 16 scans at 25 °C.

sample showed a protein profile with predominance of α -helical elements [37]: two negative bands at 222 and 208 nm and a positive peak at 196 nm. The CD spectrum shape of refolded rPBC showed one maximum band at 231 nm, two minima at 214 and 206 nm, and a negative to positive crossover at 199 nm. This spectrum showed that the β -sheet was the predominant component present in rPBC secondary structure. When compared, both native pulchellin and rPAB heterodimer presented very similar CD spectra.

The biological activity of the rPAB heterodimer in terms of lethal dose (LD_{50}) values is given in Fig. 6. After 48 h, the rPAB was able to kill 50% of mice tested with a dose of $45 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, which was a little less toxic than the lethal dose found for native pulchellin

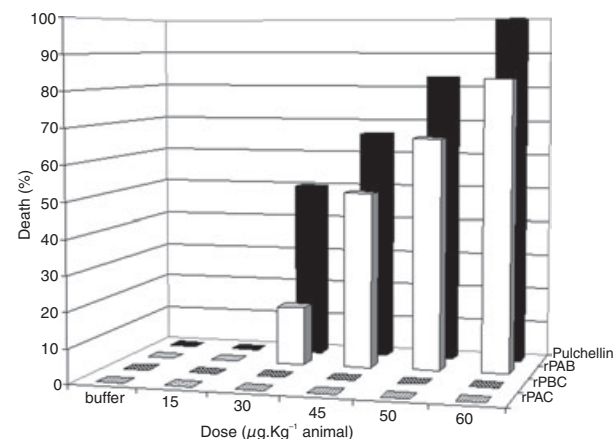


Fig. 6. Lethal activity determined by intraperitoneal injection in mice using different concentrations of recombinant pulchellin A-chain (rPAC), recombinant pulchellin B-chain (rPBC), recombinant pulchellin (rPAB) and native pulchellin (as positive control). The buffers of each protein were used as negative controls. Groups of six animals and different doses of each protein were prepared. Each group represented a dose and the toxic effects were determined after 48 h.

(30 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$). Sublethal doses also lead to animal death some days later until the end of experiments. Although this value is higher than found for other similar toxins [38], the toxic effects observed agree with those induced by type 2 RIPs. The structural and biological properties determined for the rPAB heterodimer showed that this protein presents similar behavior to that of the native pulchellin.

Discussion

Pulchellin, a type 2 RIP isolated from *A. pulchellus* seed, is a potent plant toxin, similar to abrin and ricin. Cloning of the coding gene from pulchellin A-chain will greatly facilitate the understanding of the protein structure and function, and lay a solid foundation for its application. This study reports the cloning and characterization of the A-chain gene that encodes the toxic chain of pulchellin.

rPAC was expressed in a soluble form, preserving its structure and biological activity. Its DNA sequence has very high identity with (93.0%) and a similar size to (251 bp) abrin-c A-chain [39]. The molecular mass of rPAC (29 kDa) is consistent with that reported for native pulchellin A-chain [21]. rPAC was found to be highly homologous to other type 2 RIPs [30,40]. As shown in Fig. 2, rPAC shows a high sequence homology to A-chains from abrins. In the four RIPs listed, there is one conserved cysteine residue close to the C-terminal of the A-chains, which allows formation of one interchain bond with another conserved cysteine residue in their respective B-chains. The active RNA *N*-glycosidase sites of abrin-a, abrin-c and ricin are composed of five invariant residues (Tyr74, Tyr113, Glu164, Arg167 and Trp198 in abrin-a and abrin-c, and Tyr115, Tyr158, Glu212, Arg215 and Trp246 in ricin) and another five conserved residues (Asn72, Arg124, Gln160, Glu195 and Asn196 in abrin-a and abrin-c and Asn78, Arg134, Gln172, Glu208 and Asn209 in ricin) [30,35]. The alignment of amino acid sequences shows that all residues involved in the active site cleft of abrin-a, abrin-c and ricin are totally conserved in the rPAC sequence.

The *N*-glycosidase activity assays showed that rPAC was enzymatically active. RIP-mediated depurination of the large ribosomal subunit RNA results in a susceptibility of the RNA sugar-phosphate backbone to hydrolysis at the depurination site, which leads to the release of a small fragment of 130–400 nucleotides from the 3'-end of the rRNA [41,42]. This fragment is diagnostic of RIP-catalyzed depurination and is readily observed following agarose-formamide gel electrophoresis [43]. rPAC (1 ng) was able to cleave the

N-glycosidic bond of yeast rRNA, releasing an RNA fragment of ≈ 370 nucleotides after treatment with aniline, as did native pulchellin. Thus, this activity can be attributed to conserved residues that form the active site of RNA *N*-glycosidase in rPAC. Stirpe *et al.* [44] showed that a fragment of ≈ 400 nucleotides arises from removal of A3024 in yeast 26S rRNA when incubated with ricin.

Using the intraperitoneal toxicity test to compare the potency and activity of rPAB heterodimer and native pulchellin, no significant differences between the recombinant heterodimer and native protein were found. Neither rPAC nor rPBC had a toxic effect on mice in the dosage range used. Thus, it is clear that *in vivo* poisoning occurs only if the whole heterodimeric protein (rPAB) is administered. This activity was expected because the CD results show that rPAB has the same CD profile and consequently, has a secondary structure fold similar to the native pulchellin. Our results are in accordance those of with Eck *et al.* [45], who compared the toxic activities of single chains from plant mistletoe lectin (pML) with the recombinant mistletoe lectin heterodimer (rML), concluding that both lectin and rRNA *N*-glycosidase activities are prerequisites for cytotoxic effect on target cells.

In addition, our results also suggest that glycosylation is not essential for heterodimer internalization because the rPAB heterodimer is derived from biosynthesis in *E. coli* (therefore it is not glycosylated) and showed toxicity similar to that of native pulchellin. In fact, the absence of glycosylation has advantages when using the A-chains in immunotoxins. For example, deglycosylated ricin A-chain (dgA) immunotoxins greatly reduced the levels of nonspecific uptake by the liver and concomitantly increased tumor-specific localization [46,47].

Regarding the therapeutic use of immunotoxins, an important consideration for immunoconjugate assembly is the nature of the linkage between antibody and RIP [47]. A disulfide bridge is usually thought to be essential for maximal cytotoxicity. Most type 1 RIPs do not have any free cysteine residues [48], which implies the need for modification of both antibody and RIP with chemical agents to produce the disulfide bond. Fortunately, rPAC has one free cysteine located in the C-terminal region and can directly form a disulfide bond with an activated antibody thiol group via a disulfide-exchange reaction. Therefore, rPAC is easily produced in a heterologous system and it might be useful for the preparation of immunoconjugates with great potential as a chemotherapeutic agent for the treatment of cancer [11,47,49] and AIDS [50,51].

Experimental procedures

Materials

E. coli DH5- α (Promega, Madison, WI, USA) was used for plasmid amplification and *E. coli* AD 202 strain (Novagen, Madison, WI, USA) was used to express the gene. pGEX 5X-1 expression vector was purchased from Amersham-Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ, USA). Isopropyl thio- β -D-galactoside was purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Oligonucleotide synthesis was produced by Gibco BRL (Rockville, MD, USA). Restriction endonucleases, and DNA ladders were obtained from Promega. Factor Xa protease was purchased from Biolabs (Beverly, MA, USA). All other chemicals used were analytical grade.

Plant material and nucleic acid isolation from *A. pulchellus*

A. pulchellus tenuiflorus subspecies were cultivated in our laboratories to produce the necessary tissues for nucleic acid extractions. Approximately 1.5 g of leaves were frozen and ground to powder in liquid nitrogen. Genomic DNA was further isolated using a plant genomic DNA isolation Floraclean kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), following the manufacturer's instructions.

Total RNA was isolated from immature *A. pulchellus* seeds, previously frozen in liquid nitrogen, using the RNA-easy Plant Mini Kit (Qiagen). The total RNA was quantified at 260 nm (Hitachi U-2000 spectrophotometer) and 2 μ g was used to 5'RACE.

Genomic cloning

Degenerate primers were designed based on the amino acid sequence conservations along the preproabrin gene (MEDLINE 91266957) and were used for genomic amplifications. Their design was based on the *A. precatorius* codon table, trying to minimize the degeneration at their 3' ending. A pair of degenerate primers (abrin 1: 5'-ACTGAAGGTGCC ACTTCACAAAGCTAYAARCARTT-3'; abrin 3: 5'-GGT TAAACACTTCCC GTTGGACCTDATNGT-3') was chosen to represent the possible coding sequences of the conserved N-terminus of the pulchellin A- and B-chains. Thus, the expected amplified product could represent the major sequence encoding the A-chain and an additional fragment encoding part of the B-chain.

The primers described above were used in a PCR containing the *A. pulchellus* genomic DNA as a template. The reaction mixture included: 100 pmol of each primer; 1.0 μ g of *A. pulchellus* DNA template; 200 μ M for each dNTP; 1 \times PCR buffer (Amersham-Pharmacia Biotech); 2.5 U *Taq* DNA polymerase (Amersham-Pharmacia Biotech) in a total volume of 50 μ L. PCR was performed for: 1 cycle at 94 $^{\circ}$ C

for 5 min; 30 cycles at 94 $^{\circ}$ C for 1 min, 45 $^{\circ}$ C for 1 min, and a primer extension for 1 min at 72 $^{\circ}$ C; and a final cycle at 72 $^{\circ}$ C for 7 min. The products obtained by amplification were cloned in the pGEM-T easy vector (Promega), which was used to transform *E. coli* DH5- α competent cells.

Sequencing

The positive clones were sequenced in the ABI-Prism 377 (Perkin-Elmer) automatic sequencer following the manufacturer's instructions. The whole fragment was sequenced and submitted to a BLAST script data bank search [23].

RACE

The 5' RACE was performed using Access RT-PCR Introductory System according to an adapted protocol previously described [24]. Terminal transferase (Life Technologies, Rockville, MD, USA) was used to add a homopolymer G-tail in the first strand for 5' RACE. Specific primers were designed for this step based on DNA sequences obtained previously. Thus, the sequences of the primers used for 5' RACE were: 5'-GGGCATCACGGA AGAAATAG-3' for a reverse transcription and 5'-GC TCTAGAGCATTCGTCACATCGATACC-3' with 5'-AAGGAATT(dC)14 for the following amplification. The thermal profile was 40 cycles of 96 $^{\circ}$ C for 1 min, 55 $^{\circ}$ C for 2 min, 72 $^{\circ}$ C for 3 min and a final extension for 10 min at 72 $^{\circ}$ C. The PCR products were analyzed on 1% agarose gels. Subsequently, the RACE reaction product was purified and inserted into vector pGEM-T (Promega). One microliter of this mixture was used to transform *E. coli* EletroMax DH5 α -E cells (Gibco-BRL) by electroporation. The positive clones were sequenced as already described.

Pulchellin A-chain cloning and expression

A new oligonucleotide set was then synthesized to amplify the pulchellin A-chain gene fragment from *A. pulchellus* (GenBank accession number AY781337) by PCR. The sequences of the synthetic oligonucleotides used for amplification were pulcA/*Bam*HI (5'-CGGGATCCAGGAGGAC CGGCCATTGAATTTACTACTG-3', the *Bam*HI restriction site included is underlined) and the reverse primer pulcA/*Not*I (5'-ATAGTTTAGCGGCCGCTCAATTTGGC GGATTGCAGAC-3', *Not*I restriction site is underlined). The product obtained by amplification was inserted into pGEX 5X-1 (Amersham-Pharmacia Biotech). Briefly, amplification was carried out in a 50 μ L reaction volume containing \approx 625 ng genomic DNA, 100 pmol of each primer, 0.2 mM dNTPs and 2 U of Deep Vent DNA polymerase (Biolabs) in the PCR buffer recommended by the enzyme manufacturer. Cycling parameters were: 1 cycle at 96 $^{\circ}$ C for 5 min, 5 cycles (94 $^{\circ}$ C for 1 min, 57 $^{\circ}$ C for

1.5 min and 72 °C for 1 min), 25 cycles (94 °C for 1 min, 60 °C for 1.5 min and 72 °C for 1 min) followed by 10 min at 72 °C to a final extension. Both amplified fragment and pGEX 5X-1 vector were digested with *Bam*HI and *Not*I endonucleases and purified. Such digestion resulted in cohesive sticky ends able to directionally insert ligation, which was performed by a T4 DNA ligase reaction. *E. coli* DH5- α competent CaCl₂ cells were transformed with the recombinant plasmid (named pGEX-rPAC) by heat shock treatment [25].

The expression plasmid pGEX-rPAC was used to transform competent *E. coli* AD 202 strain. The transformed cells AD 202 pGEX-rPAC were grown at 37 °C in Luria–Bertani medium supplemented with kanamycin (50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and cultured up to a cell density absorbance of $A_{600} = 0.4\text{--}0.6$. Once this density was reached, the expression of recombinant protein was induced with 0.4 mM isopropyl thio- β -D-galactopyranoside and carried out for 12 h at 20 °C. Before and after induction, cell aliquots were collected by centrifugation and analyzed by 15% SDS/PAGE [26]. The remaining cells were pelleted by centrifugation and resuspended in 8 mL of 0.1 M pH 8.0 NaCl/P_i buffer containing 1.0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ lysozyme. After 30 min incubation on ice, cells were disrupted by sonication and the lysate was clarified by centrifugation at 20 000 *g*. At this point, both pellet and supernatant were submitted to SDS/PAGE 15% to check the solubility of the recombinant pulchellin A-chain (named rPAC). The clear supernatant was used for the purification step.

Purification of rPAC

The supernatant obtained was applied to a 2 mL glutathione–Sephacrose 4 Fast Flow (Amersham-Pharmacia) and the column was washed with 10 vol. of NaCl/P_i. After this, 5 vol. of the elution buffer (50 mM de Tris/HCl, 10 mM of reduced glutathione, pH 8.0) were loaded and the recombinant A-chain was collected. This recombinant protein was eluted, pooled and submitted to Factor Xa cleavage protocol followed by an additional chromatographic step in the Mono-Q HR 5/5 (1 mL).

Western blot analysis rPAC was submitted at immunodetection, after SDS/PAGE, onto nitrocellulose membranes (Protan, Keene, NH, USA), using a Bio-Rad electrotransfer cell, for 2 h at 110 V. Membranes were developed with a secondary antibody–alkaline phosphatase detection system (Promega), using rabbit polyclonal antibodies produced against native pulchellin. An antiserum titer of 1 : 5000 was used for all experiments.

Assay of the *N*-glycosidase activity of rPAC

The isolation of yeast (*Pichia pastoris*) ribosome was performed as previously described [27]. Yeast ribosomes (20 μg) were incubated at 25 °C for 1 h with different

amounts of rPAC (0.1, 1, 5 and 10 ng) in buffer A (20 mM Tris/HCl pH 8.0, 100 mM NaCl) in a total volume of 20 μL . The reaction was stopped by the addition of 0.1% SDS. The rRNA was obtained by phenol–chloroform extraction and precipitated by the addition of 0.1 vol. 2 M NaOAc pH 6.0 and 2.5 vol. 100% ethanol. The reaction mixtures were frozen and the precipitated rRNA was pelleted by centrifugation at 13 000 *g* for 30 min at 4 °C. The pellets were washed once with 70% ethanol and dried for 20 min in a vacuum desiccator. rRNA (10 μg) was treated (for 4 min, at 60 °C) with 20 μL of 1 M aniline-acetic (pH 4.5) or 20 μL of H₂O for nonaniline-treated controls. The reactions were stopped by the addition of 0.1 vol. of NH₄OAc and 2.5 vol. of 100% ethanol and frozen before centrifugation for 1 h at 4 °C. The pellets were resuspended in 15 μL of 60% formamide/0.1 \times TPE (3.6 mM Tris, 3 mM NaH₂PO₄, 0.2 mM EDTA) mix and run on a denaturing agarose–formamide gel electrophoresis. The RNA was visualized on a short-wave ultra-violet transilluminator.

In vitro association of rPAC and rPBC

The recombinant pulchellin heterodimer (named rPAB) was prepared by coupling isolated, rPAC and the recombinant pulchellin binding chain (rPBC). The rPBC was produced as described previously by Goto *et al.* [22].

For association of rPAC and rPBC, the two chains (0.5 mg of each chain) were incubated in 50 mM Tris/HCl buffer, 100 mM NaCl, pH 8.0 at 4 °C for 48 h. For the formation of interchain disulfide bridges, the reaction was incubated in the presence of a reduced/oxidized system (cysteine to cystine ratio 5 : 1). The association process was followed by 15% SDS/PAGE under nonreducing conditions. Silver staining was performed as described by Blum *et al.* [28].

Circular dichroism measurements

CD spectra were recorded with a Jasco J-715 spectropolarimeter over a wavelength range of 195–250 nm. Measurements were made in quartz cuvettes of 1 mm path length, recorded as an average of 32 scans. CD spectra were measured in protein solutions of 0.3 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. CD spectra were obtained in millidegrees and converted to molar ellipticity. Secondary structure fractions were calculated from deconvolution of the CD spectra using the program SELCON 3 [29] employing a database of 42 proteins.

Biological activity *in vivo* of the rPAB

The biological activity of the recombinant pulchellin was studied by measuring its toxic activity (*in vivo*). Toxic activity was determined by intraperitoneal injection in mice using different doses (15, 30, 45, 50 and 60 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ of

animal body mass) of recombinant pulchellin. Native pulchellin, produced as described by Ramos *et al.* [21], rPAC and rPBC were used as controls. Groups of six animals and different doses of each protein were prepared. Each group represented a particular dose and each animal in the same group received the same dose of protein in proportion to their body mass. After injection of each dose, the toxic effects were determined after 48 h and acute LD₅₀ values were calculated.

Acknowledgements

We thank Dr Heloísa S. S. de Araújo for N-terminal analysis, and Andressa P. A. Pinto for contributions to this study. This work was supported by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

References

- 1 Stirpe F, Barbieri L, Battelli MG, Soria M & Lappi DA (1992) Ribosome-inactivating proteins from plants – present status and future prospects. *Biotechnology* **10**, 405–412.
- 2 Liu RS, Yang JH & Liu WY (2002) Isolation and enzymatic characterization of lamjapin, the first ribosome-inactivating protein from cryptogamic algal plant (*Laminaria japonica* A.). *Eur J Biochem* **269**, 4746–4552.
- 3 Yao QZ, Yu MM, Ooi LSM, Ng TB, Chang ST, Sun SSM & Ooi VEC (1998) Isolation and characterization of a type 1 ribosome-inactivating protein from fruit bodies of the edible mushroom (*Volvariella volvacea*). *J Agr Food Chem* **46**, 788–792.
- 4 Endo Y, Tsurugi K, Yutsudo T, Takeda Y, Ogasawara T & Igarashi K (1988) Site of action of a Vero toxin (VT2) from *Escherichia coli* 0157:H7 and of Shiga toxin on eukaryotic ribosomes. RNA N-glycosidase activity of the toxins. *Eur J Biochem* **171**, 45–50.
- 5 Mundy J, Leah R, Boston R, Endo Y & Stirpe F (1994) Genes encoding ribosome-inactivating proteins. *Plant Mol Biol Report* **12**, 60–62.
- 6 Van Damme EJM, Hao Q, Chen Y, Barre A, Vandebussche F, Desmyter S, Rougé P & Peumans WJ (2001) Ribosome-inactivating proteins: a family of plant proteins that do more than inactivate ribosomes. *Crit Rev Plant Sci* **20**, 395–465.
- 7 Nielsen K & Boston RS (2001) Ribosome-inactivating proteins: a plant perspective. *Annu Rev Physiol Plant Mol Biol* **52**, 785–816.
- 8 Olsnes S & Pihl A (1972) Treatment of abrin and ricin with 2-mercaptoethanol. Opposite effects on their toxicity in mice and their ability to inhibit protein synthesis in a cell-free system. *FEBS Lett* **28**, 48–50.
- 9 Barbieri L, Valbonesi P, Gorini P, Pession A & Stirpe F (1996) Polynucleotide: adenosine glycosidase activity of saporin-L1: effect on DNA, RNA and poly(A). *Biochem J* **319**, 507–513.
- 10 Barbieri L, Battelli MG & Stirpe F (1993) Ribosome-inactivating proteins from plant. *Biochim Biophys Acta* **1154**, 237–287.
- 11 Ferreras JM, Citores L, de Benito FM, Arias FJ, Rojo MA, Muñoz R, Iglesias R & Gírbés T (2000) Ribosome-inactivating proteins and lectins from *Sambucus*. *Curr Top Phytochem* **3**, 113–128.
- 12 Kreitman RJ (1999) Immunotoxins in cancer therapy. *Curr Opin Immunol* **11**, 570–578.
- 13 Fracasso G, Bellisola G, Castelletti D, Tridente G & Colombatti M (2004) Immunotoxins and other conjugates: preparation and general characteristics. *Mini Rev Med Chem* **4**, 545–562.
- 14 Bolognesi A & Polito L (2004) Immunotoxins and other conjugates: pre-clinical studies. *Mini Rev Med Chem* **4**, 563–583.
- 15 Stirpe F (2004) Ribosome-inactivating proteins. *Toxicon* **15**, 371–383.
- 16 Wang P & Tumer NE (2000) Virus resistance mediated by ribosome inactivating proteins. *Adv Virus Res* **55**, 325–355.
- 17 Vivanco JM, Savary BJ & Flores HE (1999) Characterization of two novel type 1 ribosome-inactivating proteins from the storage roots of the Andean crop *Mirabilis expansa*. *Plant Physiol* **119**, 1447–1456.
- 18 Nielsen K, Payne GA & Boston RS (2001) Maize ribosome-inactivating protein has antifungal activity against *Aspergillus flavus* and *Aspergillus nidulans*. *Mol Plant–Microbe Interact* **14**, 164–172.
- 19 Gatehouse A, Barbieri L, Stirpe F & Croy RR (1990) Effects of ribosome inactivating proteins on insect development – differences between Lepidoptera and Coleoptera. *Entomol Exp Appl* **54**, 43–51.
- 20 Zhou X, Li XD, Yuan JZ, Tang ZH & Liu WY (2000) Toxicity of cinnamomim – a new type 2 ribosome-inactivating protein to bollworm and mosquito. *Insect Biochem Mol Biol* **30**, 259–264.
- 21 Ramos MV, Mota DM, Teixeira CR, Cavada BS & Moreira RA (1998) Isolation and partial characterization of highly toxic lectins from *Abrus pulchellus* seeds. *Toxicon* **36**, 477–484.
- 22 Goto SL, Beltramini LM, Moraes DI, Moreira RA & Araújo APU (2003) *Abrus pulchellus* type-2 RIP, pulchellin: heterologous expression and refolding of the sugar-binding B chain. *Prot Exp Purif* **31**, 12–18.
- 23 Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W & Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389–3402.

- 24 Frohman MA, Dush MK & Martin GR (1988) Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 8998–9002.
- 25 Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA & Struhl K (eds) (1995) *Short Protocols in Molecular Biology* 3rd edn. J Wiley & Sons, New York.
- 26 Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- 27 Smith DC, Marsden CJ, Lord JM & Roberts LM (2003) Expression, purification and characterization of ricin vectors used for exogenous antigen delivery into the MHC class I presentation pathway. *Biol Proced Online* **5**, 13–19.
- 28 Blum H, Beier H & Gross HJ (1987) Improved silver-staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**, 93–99.
- 29 Sreerama N & Woody RW (2000) Estimation of protein secondary structure dichroism spectra: comparison of Contin, Selcon, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal Biochem* **287**, 252–260.
- 30 Wood KA, Lord JM, Wawrzynczak EJ & Piatak M (1991) Preproabrin: genomic cloning, characterization and the expression of the A-chain in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* **198**, 723–732.
- 31 Roberts LM, Tregear JW & Lord JM (1992) Molecular cloning of ricin. *Targeted Diagn Ther* **7**, 81–97.
- 32 Lin J, Li YX, Zhou XW, Tang KX & Chen F (2003) Cloning and characterization of a curcin gene encoding a ribosome inactivating protein from *Jatropha curcas*. *DNA Seq* **14**, 311–317.
- 33 Lord JM (1985) Precursors of ricin and *Ricinus communis* agglutinin. Glycosylation and processing during synthesis and intracellular transport. *Eur J Biochem* **146**, 411–416.
- 34 Frigerio L, Jolliffe NA, Di Cola A, Felipe DH, Paris N, Neuhaus JM, Lord JM, Ceriotti A & Roberts LM (2001) The internal propeptide of the ricin precursor carries a sequence-specific determinant for vacuolar sorting. *Plant Physiol* **126**, 167–175.
- 35 Tahirov TH, Lu TC, Liaw YC, Chen YL & Lin JY (1995) Crystal structure of abrin-a at 2.14 Å. *J Mol Biol* **250**, 354–367.
- 36 Dwek RA (1996) Glycobiology: toward understanding the function of sugars. *Chem Rev* **96**, 683–720.
- 37 Robert RW, Sreerama N & Woody RW (2000) Circular dichroism of peptides and proteins. In *Circular Dichroism: Principles and Applications* (Berova N, Nakanishi K, Woody RW, eds), pp. 601–620. Wiley, New York.
- 38 Stirpe F & Barbieri L (1986) Ribosome-inactivating proteins up to date. *FEBS Lett* **195**, 1–8.
- 39 Funatsu G, Taguchi Y, Kamenosono M & Yanaka M (1988) The complete amino-acid sequence of the α -chain of abrin-a, a toxic protein from the seeds of *Abrus precatorius*. *Agric Biol Chem* **52**, 1095–1097.
- 40 Kim Y & Robertus JD (1992) Analysis of several key active site residues of ricin A-chain by mutagenesis and X-ray crystallography. *Protein Eng* **5**, 775–779.
- 41 Hartley MR, Legname G, Osborn R, Chen Z & Lord JM (1991) Single-chain ribosome inactivating proteins from plants depurinate *Escherichia coli* 23S ribosomal RNA. *FEBS Lett* **1**, 65–68.
- 42 Peumans WJ, Hao Q & Van Damme EJM (2001) Ribosome-inactivating proteins from plants: more than RNA *N*-glycosidases? *FASEB J* **15**, 1493–1506.
- 43 May MJ, Hartley MR, Roberts LM, Krieg PA, Osborn RW & Lord JM (1989) Ribosome inactivation by ricin-a chain-A sensitive method to assess the activity of wild-type and mutant polypeptides. *EMBO J* **8**, 301–308.
- 44 Stirpe F, Bailey S, Miller SP & Bodley JM (1988) Modification of ribosomal RNA by ribosome-inactivating proteins from plants. *Nucleic Acids Res* **16**, 1349–1357.
- 45 Eck J, Langer M, Möckel B, Witthohn K, Zinke H & Lentzen H (1999) Characterization of recombinant and plant-derived mistletoe lectin and their B-chains. *Eur J Biochem* **265**, 788–797.
- 46 Fulton RJ, Tucker TF, Vitetta ES & Uhr JW (1988) Pharmacokinetics of tumor-reactive immunotoxins in tumor-bearing mice: effect of antibody valency and deglycosylation of the ricin A-chain on clearance and tumor localization. *Cancer Res* **48**, 2618–2625.
- 47 Kreitman RJ & Pastan I (1998) Immunotoxins for targeted cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev* **31**, 53–88.
- 48 Lin J, Yan F, Tang L & Chen F (2003) Antitumor effects of curcin from seeds of *Jatropha curcas*. *Acta Pharmacol Sin* **24**, 241–246.
- 49 Huang XM, Bennett M & Thorpe PE (2004) Anti-tumor effects and lack of side effects in mice of an immunotoxin directed against human and mouse prostate-specific membrane antigen. *Prostate* **61**, 1–11.
- 50 Wang J-H, Tam S-C, Huang H, Ouyang D-Y, Wang Y-Y & Zheng Y-T (2004) Site-directed PEGylation of trichosanthin retained its anti-HIV activity with reduced potency *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* **17**, 965–971.
- 51 Au TK, Collins RA, Lam TL, Ng TB, Fong WP & Wan DCC (2000) The plant ribosome inactivating proteins luffin and saporin are potent inhibitors of HIV-1 integrase. *FEBS Lett* **471**, 169–172.

Manuscrito submetido à BBA (Biochimica et Biophysica Acta) – General

Subjects

**Endocytosis of Pulchellin and its recombinant B-chain into K-562 cells:
binding and uptake studies.**

Leandro S. Goto¹, Priscila V. Castilho^{1,2}, Márcia.R. Cominetti², Heloísa S. Selistre-Araújo², Ana Paula Ulian Araújo^{1*}.

Centro de Biotecnologia Molecular Estrutural, ¹Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brazil; ²Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brazil.

*Correspondence to: Ana Paula U. Araújo, Grupo de Biofísica Molecular “Sérgio Mascarenhas”, Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, Caixa Postal 369, 13560-970, São Carlos, Brazil, e-mail: anapaula@if.sc.usp.br

Keywords: ribosome-inactivating protein, pulchellin, endocytosis, plant toxin

Abstract

Type 2 Ribosome-inactivating proteins (RIPs) are toxins formed by an RNA-N glycosidase A-chain polypeptide linked to a lectin B-chain by a single disulfide bond. Members of this protein class vary greatly in cytotoxicity, correlating more with B-chain diversity rather than to A-chain differences. Pulchellin is a type 2 ribosome-inactivating protein toxin found in the seeds of *Abrus pulchellus tenuiflorus*. Recombinant pulchellin B-Chain (rPBC) has been previously produced as inclusion bodies in *E. coli* and successfully refolded recovering biological activity. New approaches for using this kind of protein as a biotechnological tool require a better understanding of cell targeting, binding, uptake, intracellular routing and delivery. In this work, cell adhesion experiments were used to determine the interaction of rPBC with mammalian cells. Fluorescence microscopy revealed the intracellular localization and trafficking. Sub cellular sorting of the native pulchellin could also be determined. The results support that the endosomal internalization pathway and the retrograde transport through the Golgi apparatus might be used by both native protein and rPBC.

Introduction

Pulchellin is a type 2 ribosome-inactivating protein (RIPs) found in the seeds of *Abrus pulchellus tenuiflorus*. Members of this group of proteins play a remarkable role in the history of clinical medicine and biomedical research [2] and include abrin, volkesin, viscumin, ebulin, [1] and the most extensively studied among all RIPs, ricin. Type 2 RIPs are structurally heterodimeric proteins composed of an enzymatic A-chain covalently linked by a single disulfide bond to a B-chain. The first bears the toxic rRNA-specific N-glycosidase activity. The B chain has lectin activity toward specific carbohydrate moieties present in mammal cell outer surface [3]. Ricin irreversibly removes an adenine residue from the conserved sarcin/ricin loop of the 28 S rRNA inhibiting the EF-2 binding to the ribosome and arresting protein synthesis ultimately resulting in cell death [4].

Ricin is synthesized as a single polypeptide precursor that must be cleaved yielding the independent chains of the mature protein. The uncleaved precursor is enzymatically inactive [5], which could be a means to prevent self-intoxication. The B-chain folds into two globular domains, each one with a carbohydrate binding site, responsible for the agglutinating activity of the toxins. The B-chain has possibly evolved from a series of gene duplications as each domain seems to be derived from three ancestral Galactose binding peptides named α , β and γ . Only two of these, 1α and 2γ are able to bind Galactose. [6]. Cell-bound RIP is endocytosed by both clatrin-dependent and independent processes operating in the same cell [7]. Additionally, an alternative mechanism of binding and uptake was described for ricin, which involves recognition of the native toxin glycosyl residues by the mannose receptors present in the macrophage and liver sinusoidal cells [8-

10]. Nevertheless the form of up taken, RIPs were shown to be transported to endosomes. From there, a fraction is recycled back to the cell surface, another part degraded in the lysosomes and only a small fraction (only 5% for ricin), is translocated to the cytosol. This small amount seems to use a retrograde transport from endosomes to the Golgi apparatus, to the ER and finally to the cytosol, exploring the cellular sorting mechanism for misfolded proteins [11, 12].

Pulchellin B-chain exhibits affinity for β -D-Galactose substrate. Recombinant pulchellin B-Chain (rPBC) was produced as inclusion bodies in *E. coli* that were successfully refolded recovering biological activity [13, 14]. New approaches for using this kind of protein as a biotechnological tool demand a better understanding of cell targeting, binding, uptake, intracellular sorting and delivery [2, 12]. In this work, cell adhesion experiments were used to determine rPBC interaction with mammalian cells and fluorescence microscopy to probe its intracellular localization. Native pulchellin sub cellular sorting could also be determined. The results are consistent with the hypothesis that the endosomal internalization path and retrograde transport through Golgi apparatus might be used by both the native and the recombinant pulchellin B-chain.

Materials and methods

Mammalian cell lines were from the American Type Culture Collection (ATCC - www.atcc.org): TK cells, *Mus musculus* fibroblast (ATCC number CCL-1.3); HeLa, *Homo sapiens* cervix adenocarcinoma epithelial cells (ATCC number CCL-2); MDA-MB-231 cells, *Homo sapiens* mammal gland breast cancer epithelial cells (ATCC number HTB-26); K-562 cells, human bone marrow leukemia lymphoblasts (ATCC number CCL-243). K-562 $\alpha_2\beta_1$, K-562 cells transfected with $\alpha_2\beta_1$ integrin were a gift from Dr. M. E. Hemler (Dana Farber, Boston, MA). Cells were stably transfected and the expression of integrins was confirmed by flow cytometry using monoclonal antibodies against the α_2 integrin subunit (clone AK-2, Pharmigen, USA). DMEM and Fetal Bovine Serum (FBS) were purchased from Cultilab, Brazil. Antibiotics were from (Invitrogen - Invitrogen Corporation, 1600 Faraday Avenue, PO Box 6482, Carlsbad, California 92008). 5-chloromethylfluorescein diacetate (CMFDA), Alexa Fluor 488 microscale protein labeling kit, Alexa Fluor 350 and Anti-golgi immunofluorescence staining reagents were supplied by Molecular Probes (Invitrogen). Native pulchellin and recombinant refolded pulchellin B-Chain were obtained as described previously [13, 14]. All the other reagents were of analytical grade.

Cell culture

Frozen cell stocks were inoculated in 75 cm² cell culture bottles containing 20 ml of DMEM supplemented with 10% of FBS and penicillin 100 U/ml and streptomycin 100µg/ml. Adhered cells were detached by incubation for 5 minutes in 5 ml of 0.25% trypsin in PBS (50 mM phosphate buffer, pH 7.4, 0.5 mM EDTA, 150 mM NaCl). Cells were recovered by centrifugation at 1000 x g and washed twice with 10 ml of PBS before being transferred to fresh medium. Cells were cultivated at 37°C under 5% CO₂ atmosphere until reaching confluence.

Cell adhesion experiments

Cell fluorescent staining - Cell suspensions were adjusted to 5 X 10⁶ cells/ml in PBS. CMFDA was added to a final concentration of 12.5µM and incubated for 30 minutes at 37°C. CMFDA incubated cells were collected by centrifugation and washed three times with HEPES buffer (20 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5mM KCl, 1mM MnCl₂, 1 mM MgSO₄). The cell suspension was then adjusted for 1.0 X 10⁶ cells/ml in HEPES buffer. **Protein coating** – a serial dilution of rPBC in HEPES buffer was dispensed into flat bottom 96–well plates. The negative controls were composed of 100 µl of a solution of 1% Bovine Serum Albumin (BSA) in the same buffer. Positive controls were composed of 100 µl of either collagen I or fibronectin, at 10 ng/µl, depending on the cell line used. All the samples were done in triplicates and incubated overnight at 4°C. After incubation each well was poured out and blocked with 200µl of 1% BSA in HEPES buffer for 2 hours at room temperature, followed by three wash steps with HEPES buffer. **Cell adhesion assay** - 100 µl of the labeled cell suspensions were dispensed into the coated wells and incubated for 30

minutes at 37°C. After washing away the unbound cells, the bound cells were lysed by the addition of 0.5% Triton X-100. The plates were read using a SpectraMax Gemini XS fluorescence plate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) with a 485 nm excitation and a 530 nm emission filters. The mean value of each triplicate was plotted and normalized in percentage values of the positive controls. **Inhibition of cell adhesion to collagen I** – Aliquots of 50 µl of CFMDA-labeled K-562 $\alpha_2\beta_1$ cells (1.0×10^6 cell/ml) were incubated for 30 minutes at 37°C with 2.30µM, 1.15 µM, and 0.58 µM of rPBC. These samples were dispensed into a 96-well plate previously coated with 1µg of collagen I/well and incubated for 20 minutes 37°C. After incubation, the wells were washed, the bound cells lysed and the plate read as described above. Positive and negative controls were prepared incubating untreated cells in plates coated with 1 µg of collagen I and 1% BSA, respectively. A normal cell adhesion assay using K-562 cells was also performed as a counterproof. In this late assay the positive controls was composed of 1 µg/well of fibronectin. **Inhibition of cell adhesion by competition for sugar-binding sites** – Serial dilutions of rPBC were incubated for 30 minutes at room temperature with either Lactose or D-Galactose and used for coating of 96-well plate wells. After blocking and washing, labeled K-562 $\alpha_2\beta_1$ cells were dispensed on the wells, incubated 20 minutes at 37°C and lysed for fluorescence reading.

All the above mentioned cell adhesion experiments were performed in triplicates, and the obtained fluorescence raw data were submitted to simple one way ANOVA statistical analysis for experimental significance level 0.05. Results were normalized and plotted as percentage values of the positive controls.

Cell internalization experiments

K-562 cells - Native pulchellin and rPBC were labeled using Alexa fluor 488 according to the manufacturer recommendations. After labeling procedures, both rPBC and native pulchellin still maintained hemagglutination ability. 20µg of labeled rPBC and 40µg of labeled native pulchellin proteins in PBS were separately added to 900µl of a suspension of 1.0×10^5 cells/ml K-562 in PBS (up to 70 nM of each protein), and incubated for 15 minutes at 37°C. As negative controls, the same amounts of labeled proteins were heated to 100°C for 30 minutes and used. After incubation, 50µl aliquots of each sample were dispensed onto microscopy slides. Also, labeled proteins previously incubated for 30 minutes with 100 mM of D-Galactose were added to a cell suspension also previously incubated for 30 minutes with D-Galactose. Cells were fixed by the addition of 10 µl of formaldehyde and incubated for 30 minutes at room temperature. Fixed cells were washed three times with PBS, covered with cover slips and observed on a NIKON Eclipse E400 fluorescence microscope under 500 nm excitation wavelength.

HeLa cells – Cells were grown on a 75 cm² culture bottle until reaching confluence. HeLa cells were detached by incubating for 5 minutes in 5 ml of trypsin 0.25% in 50 mM phosphate buffer, pH 7.4, 0.5 mM EDTA, 150 mM NaCl. The cells were recovered by centrifugation 5 minutes 1000 x g and washed twice with 10 ml of PBS. After that, the cells were inoculated in sterilized Petri dishes containing cover slips immersed in 10 ml of fresh culture medium. The cells were grown overnight at 37°C and 5% CO₂ and the cover slips with adhered HeLa cells were washed with PBS. Fifty microliters of each labeled protein in PBS (70 nM) were dropped on the cover slips and incubated for 15 minutes. After incubation, cells were fixed with 10 µl of formaldehyde for 30 minutes, washed with PBS

and mounted for observation on the fluorescence microscope. As negative controls each labeled protein was heated to 100°C for 30 minutes prior to use.

Sub cellular localization experiments

Native pulchellin and rPBC were labeled using Alexa fluor 350, added to 900 µl of a suspension of 1.0×10^5 K-562 cells / ml in PBS, and incubated for 15 minutes at 37° C. After incubation, 50 µl samples were dispensed onto microscopy slides. Cells were fixed with 10 µl of formaldehyde and incubated for 30 minutes. Fixed cells were washed three times with PBS and submitted to Golgi complex staining using Alexa fluor 488 anti-golgin monoclonal immuno-staining kit. Double stained cells were analyzed by fluorescence microscopy under 350 nm and 500 nm excitation wavelengths. rPBC did not remain inside the cells after immuno-staining protocol, therefore equimolar amounts of Alexa fluor 350-labeled rPBC and native pulchellin Alexa fluor 488-labeled were mixed and added to 900 µl (70 nM of each protein) of a suspension of 1.0×10^5 K-562 cells/ml in PBS, and incubated for 15 minutes at 37° C. After incubation, cells were recovered by centrifugation 5 minutes at 1000 x g and the supernatant containing unbound proteins was discarded. Cell pellet was washed tree times with 1 ml PBS. Aliquots of 50 µl were dispensed onto microscopy slides, fixed with formaldehyde and analyzed by fluorescence microscopy.

Sub cellular localization in living cells

Equimolar amounts of Alexa fluor 350-labeled rPBC and Alexa fluor 488-labeled native pulchellin were mixed and added to 900 µl (70 nM of each protein) of a suspension

of 1.0×10^5 K-562 cells/ml in PBS, and incubated for 5 minutes at 37° C. After incubation, cells were recovered by centrifugation for 5 minutes at 1000 x g and the supernatant containing unbound proteins was discarded. Cell pellet was washed three times with 1 ml of PBS. Aliquots of 50 μ l were dispensed onto microscopy slides and analyzed by fluorescence microscopy.

Results and discussion

RIPs were shown to trigger diverse cell responses, most of them related to the toxic A-chain catalytic activity on ribosomes, DNA or apoptotic response [15-17]. Promotion of cell adhesion is a useful way to probe for protein interaction with living cells, and the interacting cell line should be a good candidate to investigate the endocytosis pathway. Recombinant pulchellin B-chain supported adhesion of MDA-MB-231 and K-562 cancer cell lines in a protein-concentration dependent way but it had no effect on fibroblasts and HeLa cells (Fig. 1A to 1D). These differences may be important for the design of new therapeutic approaches for targeted cell delivery. K-562 cells were chosen for further experiments due to the easier handling along cell growth and the exclusion of criticisms related to trypsin treatments.

A bacterial host was used to produce rPBC so the resulting recombinant protein is free of post-translational modifications typical of eukaryotic cells such as glycosylation [13]. rPBC can agglutinate human erythrocytes due to its lectin activity which is inhibited by D-Gal, and should be somewhat similar to other related RIPs B-chains. With the purpose of identifying a possible cellular receptor, rPBC was incubated with $\alpha_2\beta_1$ -

transfected K-562 cells and these receptor-blocked cells were used to probe for adhesion to collagen I. The results show that rPBC did not inhibit $\alpha_2\beta_1$ -transfected K-562 interaction with collagen I (figure 2A), suggesting that it does not bind to $\alpha_2\beta_1$ -integrin, yet, rPBC could promote adhesion to K-562 cells without the $\alpha_2\beta_1$ -transfection (figure 2B).

To investigate the binding of rPBC to receptors through lectin properties, rPBC aliquots were pre-incubated with D-Gal, which was shown to inhibit rPBC agglutination properties [13]. rPBC was also pre-incubated with Lactose, another possible inhibitor since it interferes with the agglutination activity of native pulchellin (data not shown). As expected, D-Gal partially inhibits rPBC promoted cell adhesion (figure 3). This can be explained by any of the following: (1) K-562 cells glycoproteic receptors may have structural features that suit better for the rPBC binding sites than free D-Gal, and, blocking sites with D-Gal alone may not be effective resulting in that rPBC lectin binding sites may have stronger affinity to K-562 receptors than to D-Gal in solution. (2) rPBC binding sites may also have different affinities to D-Gal. Thus, D-Gal blocking could be enough to inhibit one site, but not so effective on the other, leaving it prone to interact with cell receptors. These two possibilities are not exclusive one of the other, and have already been observed in other RIPs. [18-23].

Although being a ligand for native pulchellin, lactose did not seem to inhibit rPBC adhesion (figure 3). This finding shows that native pulchellin does not share exactly the same properties as those of rPBC in respect to its lectin behavior. This could be due to the presence of pulchellin isoforms in the native protein preparation, a very common feature amongst RIPs, rPBC being only one of such isoforms. Moreover, post-translational

modifications of the native pulchellin are not present in rPBC possibly affecting its structure and activity.

Once defined interacting cells for rPBC by cell adhesion assays, further investigations were made to define if the isolated B-chain could be endocytosed. This is an important requirement for a possible use of rPBC in targeted cell therapy as a vector for the entry of other substances into selected cell types. Both rPBC and native pulchellin were labeled with Alexa fluor 488. Labeled rPBC and native pulchellin were assayed for agglutination ability and D-Gal inhibition of agglutination prior to the endocytosis experiments and both proteins retained activity after the labeling procedures. Each labeled protein was incubated with K-562 cells and aliquots of each sample were dispensed onto microscopy slides, fixed and observed by fluorescence microscopy. Both rPBC and native pulchellin were found in the surface of the cells and as small green fluorescent grains within the cells (figure 4 panels A and B). This correlates with the cell adhesion assays and shows that rPBC and native pulchellin not only bind to cells but also are internalized. Assays with Galactose did not show detectable differences in the proteins localization, showing agreement with cell adhesion assays. These results indicate that rPBC may have a selective cell targeting feature. However, native pulchellin was detected on HeLa cells (figure 4 panel C), while rPBC was not. This can be explained by the differences between rPBC and native pulchellin. Perhaps one isoform of pulchellin present in the native protein pool has a B-chain capable to interact with HeLa cell receptors while rPBC does not have this ability. Native pulchellin may also have a glycosylation pattern that could interact with HeLa cells, a feature evidently lacking in rPBC.

Type 2 RIPs endocytosis mechanism has been characterized and a general pathway has been identified. RIPs like ricin and abrin were shown to enter cells by endosomes,

either clatrin coated or not, from which the proteins are delivered to the trans-Golgi network [24]. From the Golgi, the toxin may hitchhike with other protein to the endoplasmic reticulum and there identified as a miss-folded protein, lead to the cytosol by the ERAD pathway [25-29]. To verify if rPBC and native pulchellin share the same pathway, subcellular localization experiments were performed. Co-localization of the labeled proteins with the Golgi apparatus protein golgin [30] was performed. Both rPBC and native pulchellin were fluorescently labeled with Alexa fluor 350, exhibiting a blue fluorescence upon 350 nm excitation. Each protein was added to a suspension of K-562 cells, fixed and permeabilized. The fixed cells were marked with anti-golgin antibodies. Alexa fluor 488-labeled secondary antibodies, green fluorescent under 500 nm excitation wavelength, were used. Double-stained K-562 cells were observed by fluorescence microscopy under 350 nm and 500 nm wavelengths. For some unknown reason double-stained K-562 cells lacked labeled rPBC signal (data not shown), but clearly showed rPBC when single stained with Alexa fluor 350-labeled rPBC. rPBC may have leaked upon immuno-staining as such leaky behaviour of RIPs has been previously described for ricin, that was released from rat bone marrow macrophages by Triton treatment [9]. Native pulchellin showed a good co-localization with golgin in the double-staining experiment (figure 5 panels A, B and C). The differences in staining behaviors may be a result of the differences between rPBC and pulchellin. Alexa fluor 350-labeled rPBC and Alexa fluor 488-labeled native pulchellin double-stained cells reveal their co-localization (figure 5 panels D, E and F), with a presumptive accumulation towards the Golgi apparatus (figure 5C). These results indicate that like other type 2 RIPs, rPBC and native pulchellin might share a similar endocytic pathway.

rPBC and native pulchellin seem to accumulate at the Golgi apparatus, possibly using the same pathway described for other RIPs. However, the dynamics of the events involved in cell sorting and entry may not be the same due to the differences between rPBC and native pulchellin. To detect differences in the proteins binding and uptake both them were mixed in equimolar amounts and added to a K-562 cells suspension. (figure 6 panels A and B). The merged image (figure 6C) indicates that binding and uptake of each protein may be somewhat different.

These data showed that both rPBC and native pulchellin may share the endocytic pathway of other RIPs. It is evident however that rPBC has some different features from native pulchellin and, although the lack of the A-chain, we can speculate that the reasons for such differences shall give further understanding of RIPs structural functions and the cellular events triggered by them. Taken together, the entry in specific targeted cells and partial adhesion inhibition promoted by D-Gal in K-562 cells suggest that the endocytosis must be mediated by surface cell receptors interactions with the lectin counterpart of pulchellin. In conclusion, these proteins might be useful tools to study transport and cytosolic translocation routes. Furthermore, they can be used as vectors for the transport of designed substances to the interior of chosen cell types, a major objective in targeted cell therapy of diseases.

Acknowledgements

This work was supported by grants from CAPES and FAPESP.

References

- [1] M.R. Hartley, and J.M Lord, Cytotoxic ribosome-inactivating lectins from plants, *Biochim. Biophys. Acta* 1701 (2004) 1-14.
- [2] S. Olsnes, The history of ricin, abrin and related toxins, *Toxicon* 44 (2004) 361-370.
- [3] S. Olsnes, and A. Pihl, Different biological properties of the two constituent peptide chains of ricin, a toxic protein inhibiting protein synthesis, *Biochemistry* 12 (1973) 3121-3126.
- [4] Y. Endo, and K. Tsurugi, RNA N-glycosidase activity of ricin A-chain. Mechanism of action of the toxic lectin ricin on eukaryotic ribosomes, *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 8128-8130.
- [5] P.T. Richardson, M. Westby, L.M. Roberts, J.H. Gould, A. Colman, J.M Lord, Recombinant proricin binds galactose but does not depurinate 28 S ribosomal RNA, *FEBS Lett.* 255 (1989) 15-20.
- [6] N. Sphyris, J.M. Lord, R. Wales, L.M. Roberts, Mutational analysis of the *Ricinus* lectin B-chains: Galactose-binding ability of the 2 gamma subdomain of *Ricinus communis* agglutinin B-chain, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 20292-20297.
- [7] K. Sandvig, and B. van Deurs, Transport of protein toxins into cells: pathways used by ricin, cholera toxin and Shiga toxin, *FEBS Lett.* 529 (2002) 49-53.

- [8] D.N. Skilleter, A.J. Paine, F. Stirpe, A comparison of the accumulation of ricin by hepatic parenchymal and non-parenchymal cells and its inhibition of protein synthesis, *Biochim. Biophys. Acta* 677 (1981) 495-500.
- [9] B.M. Simmons, P.D. Stahl, J. H. Russell, Mannose receptor-mediated uptake of ricin toxin and ricin A chain by macrophages: multiple intracellular pathways for A chain translocation, *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 7912-7920.
- [10] S. Magnusson, R. Kjekken, T. Berg, Characterization of two distinct pathways of endocytosis of ricin by rat liver endothelial cells, *Exp. Cell Res.* 205 (1993) 118-125.
- [11] J.M. Lord and L.M. Roberts, Toxin entry: retrograde transport through the secretory pathway, *J. Cell Biol.* 140 (1998) 733-736.
- [12] K. Sandvig and B. van Deurs, Delivery into cells: lessons learned from plant and bacterial toxins, *Gene Therapy* 12 (2005) 865-872.
- [13] L.S. Goto, L.M. Beltramini, D.I. de Moraes, R.A. Moreira, A.P.U. de Araújo, *Abrus pulchellus* type-2 RIP, pulchellin: heterologous expression and refolding of the sugar-binding B chain, *Protein Expr. Purif.* 31, 1 (2003) 12-18.
- [14] A.L. Silva, L.S. Goto, A.R. Dinarte, D. Hansen, R.A. Moreira, L.M. Beltramini, A.P.U. de Araújo, Pulchellin, a highly toxic type 2 ribosome-inactivating protein from *Abrus pulchellus*: Cloning heterologous expression of A-chain and structural studies, *FEBS J.* 272, 5 (2005) 1201-1210.
- [15] F. Stirpe and M.G. Battelli, Ribosome-inactivating proteins: progress and problems, *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 16 (2006) 1850-1866.

- [16] S.W. Park, R. Vepachedu, N. Sharma, J.M. Vivanco, Ribosome-inactivating proteins in plant biology, *Planta*. 219, 6 (2004) 1093-1096.
- [17] S. Narayanan, K. Surendranath, N. Bora, A. Surolia, A.A. Karande, Ribosome inactivating proteins and apoptosis, *FEBS Lett.* 579, 6 (2005) 1324-1331.
- [18] L.L. Houston and T.P. Dooley, Binding of two molecules of 4-methylumbelliferyl galactose or 4-methylumbelliferyl N-acetylgalactosamine to the B chains of ricin and *Ricinus communis* agglutinin and to purified ricin B chain, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 4147-4151.
- [19] R. Wales, P.T. Richardson, L.M. Roberts, H.R. Woodland, J.M. Lord, Mutational analysis of the galactose binding ability of recombinant ricin B chain, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 19172-19179.
- [20] N. Yamasaki, T. Hatakeyama, G. Funatsu, Ricin D-saccharide interaction as studied by ultraviolet difference spectroscopy, *J. Biochem.* 98, 6 (1985) 1555-1560.
- [21] T. Hatakeyama, N. Yamasaki, G. Funatsu, Identification of the tryptophan residue located at the low-affinity saccharide binding site of ricin D, *J. Biochem.* 100, 3 (1986) 781-788.
- [22] D. Ganguly and C. Mukhopadhyay, Binding diversity of the two binding sites of Ricin B lectin, *Biopolymers*, (2006) [Epub ahead of print – in press].
- [23] B.Z. Wang, W.G. Zou, W.Y. Liu, X.Y. Liu, The lower cytotoxicity of cinnamomin (a type II RIP) is due to its B-chain, *Arch. Biochem. Biophys.* 451, 1 (2006) 91-96.

- [24] K. Sandvig, B. Spilsberg, S.U. Lauvrak, M.L. Torgersen, T.G. Iversen, B. van Deurs, Pathways followed by protein toxins into cells, *Int. J. Med. Microbiol.* 293, 7-8 (2004) 483-490.
- [25] J.M. Lord, L.M. Roberts, W.I. Lencer, Entry of protein toxins into mammalian cells by crossing the endoplasmic reticulum membrane: co-opting basic mechanisms of endoplasmic reticulum-associated degradation, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 300 (2005) 149-168.
- [26] A. Di Cola, L. Frigerio, J.M. Lord, L.M. Roberts, A. Ceriotti, Endoplasmic reticulum-associated degradation of ricin A chain has unique and plant-specific features, *Plant Physiol.* 137, 1 (2005) 287-296.
- [27] R.A. Spooner, D.C. Smith, A.J. Easton, L.M. Roberts, J.M. Lord, Retrograde transport pathways utilised by viruses and protein toxins, *Virol. J.* 3 (2006) 26.
- [28] J.M. Lord, E. Deeks, C.J. Marsden, K. Moore, C. Pateman, D.C. Smith, R.A. Spooner, P. Watson, L.M. Roberts, Retrograde transport of toxins across the endoplasmic reticulum membrane, *Biochem. Soc. Trans.* 31, 6 (2003) 1260-1262.
- [29] L.M. Roberts and D.C. Smith, Ricin: the endoplasmic reticulum connection, *Toxicon* 44, 5 (2004) 469-472.
- [30] K.J. Griffith, E.K. Chan, C.C. Lung, J.C. Hamel, X. Guo, K. Miyachi, M.J. Fritzler, Molecular cloning of a novel 97-kd Golgi complex autoantigen associated with Sjogren's syndrome, *Arthritis Rheum.* 40 (1997) 1693-1702.

Legends

Figure 1. rPBC supports cell adhesion. 96-well plates were coated with rPBC serial dilutions and probed for adhesion to fluorescently labeled cell lines. A – TK cells; B – HeLa; C – MDA-MB-231; D – K-562 $\alpha_2\beta_1$. Positive and negative controls are assigned as C+ and C- respectively. C+ was 1 μg of fibronectin in panels A and B and 1 μg of collagen I in C and D. C- were BSA 1%. All the experiments were done as triplicates and the mean fluorescence values given as percentage relative to the positive controls. Error bars are absolute variation values among sample repeats. At the 0.05 level, the data means are significantly different in ANOVA analysis. For panels A and B, ANOVA distinguishes between only 2 classes: positive controls and negative controls in which other data points are included.

Figure 2. Inhibition of cell adhesion to collagen I. A - K-562 $\alpha_2\beta_1$ labeled cells were incubated with a serial dilution of rPBC (10 μg at 2.30 μM , 5 μg at 1.15 μM , 2.5 μg at 0.58 μM) (gray bars) and seeded on a 96-well plate coated with 1 μg collagen I. The samples were submitted to fluorescence measurements. Untreated marked cells were used for the positive (plates coated with collagen I) and negative (coating with BSA) controls. B – rPBC supports K-562 cell adhesion. Serial dilutions of rPBC (gray bars) were used for coating of 96-well plates. Labeled K-562 cells (not transfected with $\alpha_2\beta_1$) were placed on plate's wells and adhered cells fluorescence was read. Positive controls were 1 μg of fibronectin and negative were BSA coatings. All the experiments were done as triplicates. Error bars represent the absolute variation found for each protein concentration. At the 0.05 significance level, the data means are significantly different in ANOVA analysis. In panel

A, ANOVA analysis indicate that positive controls and data points other than negative controls are included in the same class.

Figure 3. Inhibition of cell adhesion by competition for sugar-binding sites. Serial dilutions of rPBC incubated with lactose (light gray) or D-Galactose (dark gray) were used for coating of 96-well plates. Labeled K-562 $\alpha_2\beta_1$ cells were placed on the plate's wells and the fluorescence was read. Untreated rPBC samples were used for comparison of normal adhesive activity. Positive control was 1 μ g of collagen I and BSA 1% the negative control. All the experiments were done as triplicates and error bars are the absolute values variation in each triplicate. The data means are significantly different at the 0.05 level in ANOVA analysis. Untreated rPBC and lactose incubated samples fall into the same classes for each concentration but galactose samples are considered significantly different in ANOVA.

Figure 4. Cell internalization experiments – K-562 cells - Both rPBC (A) and native pulchellin (B) were detected on the surface and inside the cells. rPBC (A) and native pulchellin (B) were labeled with Alexa fluor 488. Each labeled protein was added to a K-562 cells suspension at 70 nM protein concentration, and incubated for 15 minutes at 37° C. Aliquots of each sample were dispensed onto microscopy slides and fixed adding formaldehyde up to 15 %. Fixed cells were washed with PBS, mounted with cover slips and observed by fluorescence microscopy under 500 nm excitation wavelength. Assays with galactose did not show detectable differences in the protein localization. HeLa cells - Native pulchellin (panel C) was detected on the surface and inside the cells, while rPBC did not seem to interact with HeLa cells (not shown). Cells were grown overnight on cover

slips and washed with PBS, and incubated for 15 minutes with 1 µg of each labeled protein. After incubation, cells were fixed with 10 µl of formaldehyde, washed with PBS and mounted for observation. Negative controls were the same amounts of heat inactivated labeled proteins.

Figure 5. Subcellular localization of endocytosed pulchellin and rPBC. Native pulchellin and rPBC were labeled using Alexa fluor 350 according to the manufacturer recommendations. Labeled proteins were added up to 70 nM protein concentration to a suspension of K-562 cells. Cells were fixed, washed with PBS and submitted to Golgi complex monoclonal immuno-staining. Double stained cells were analyzed by fluorescence microscopy under 350 nm (for labeled proteins) and 500 nm (for the Golgi apparatus) excitation wavelengths. rPBC did not remain after double staining. Native pulchellin: A – K-562 cells under 350 nm excitation, in which blue fluorescence indicates native pulchellin location; B – K-562 cells lightened at 500 nm wavelength. A green fluorescence indicates the location of Golgi apparatus. C – Merged image of the two fluorescently probed locations, showing that pulchellin accumulates toward the Golgi apparatus. rPBC: Cells were incubated for 15 minutes with an equimolar mix of rPBC labeled with Alexa fluor 350 and native pulchellin labeled with Alexa fluor 488. Cell suspension was then washed with PBS and poured onto microscopy slides and submitted to fluorescence microscopy observation. D – K-562 cells lightened at 350 nm wavelength, in which rPBC shows a blue fluorescence; E – K-562 under 500 nm excitation showing native pulchellin location in green color; F – merged images showing that both proteins accumulate toward the same location inside the cells.

Figure 6. Live cells early steps - subcellular localization - Equimolar amounts of rPBC labeled with Alexa fluor 350 and native pulchellin labeled with Alexa fluor 488 were incubated with K-562 cells. After 5 min incubation, cells were washed with PBS and analyzed by fluorescence microscopy for visualization of intermediary endocytosis stages of the proteins. A – Cell under 350 nm excitation in which labeled rPBC is shown in blue fluorescence staining. B – K-562 cell under 500 nm lightening, in which labeled native pulchellin emits a green fluorescence. C – Merged image of both excitation wavelengths pictures.

Figure 1.

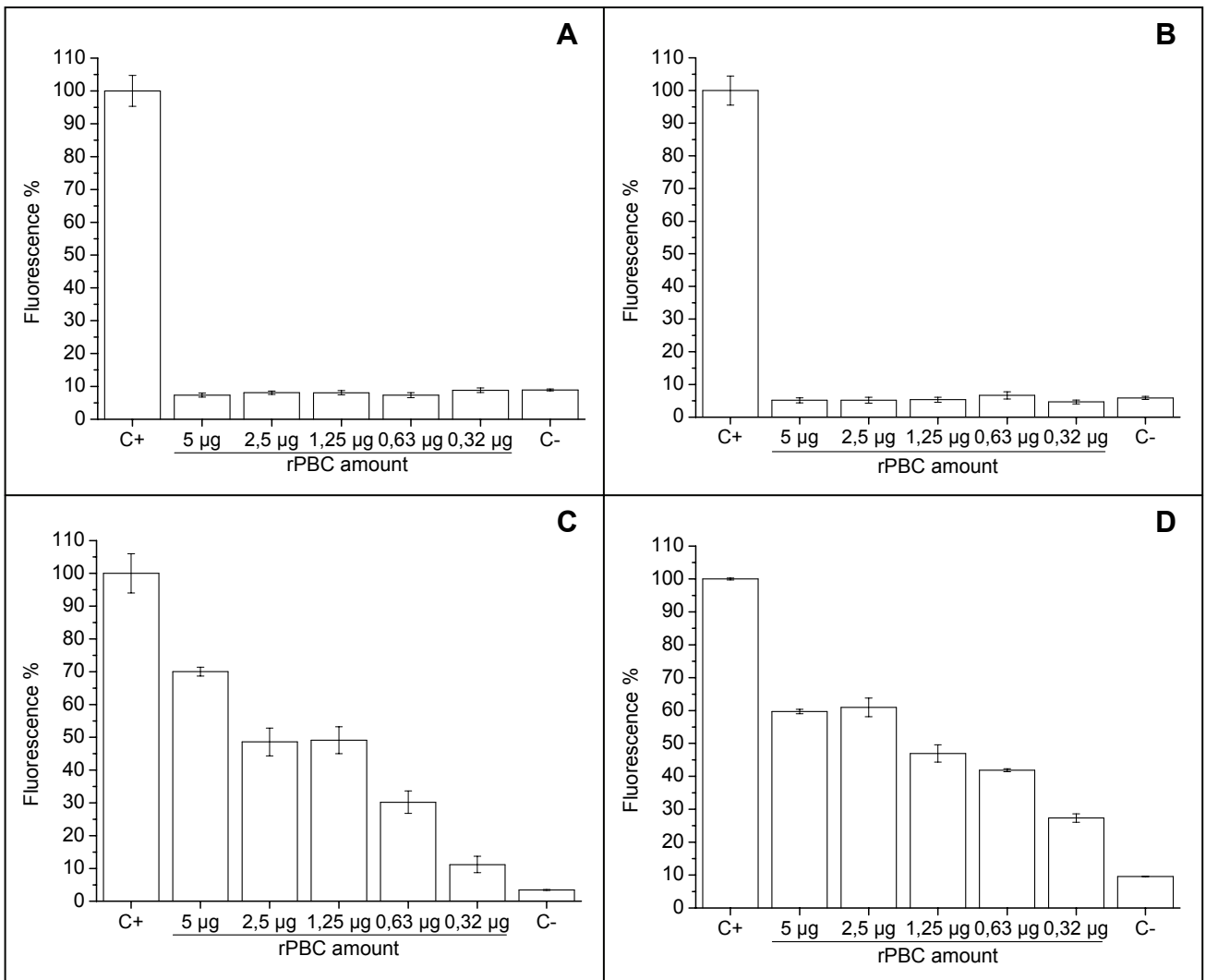


Figure 2.

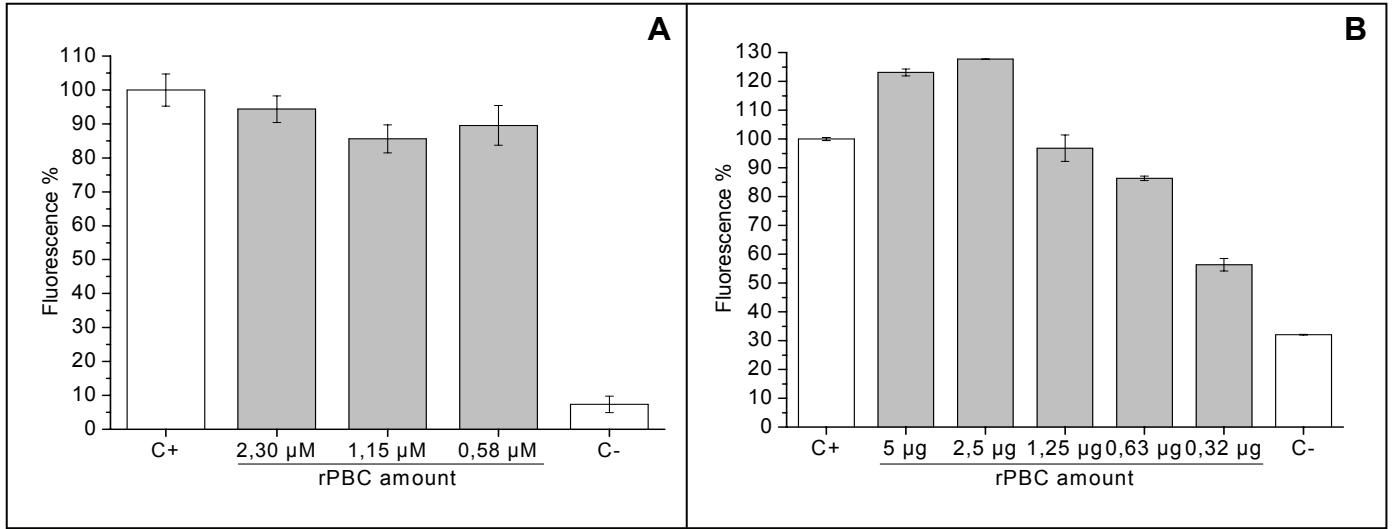


Figure 3.

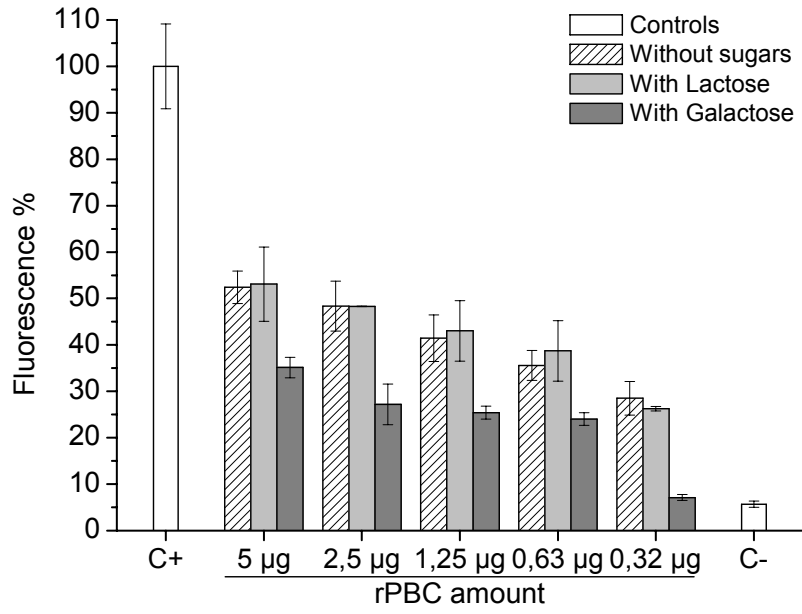


Figure 4.

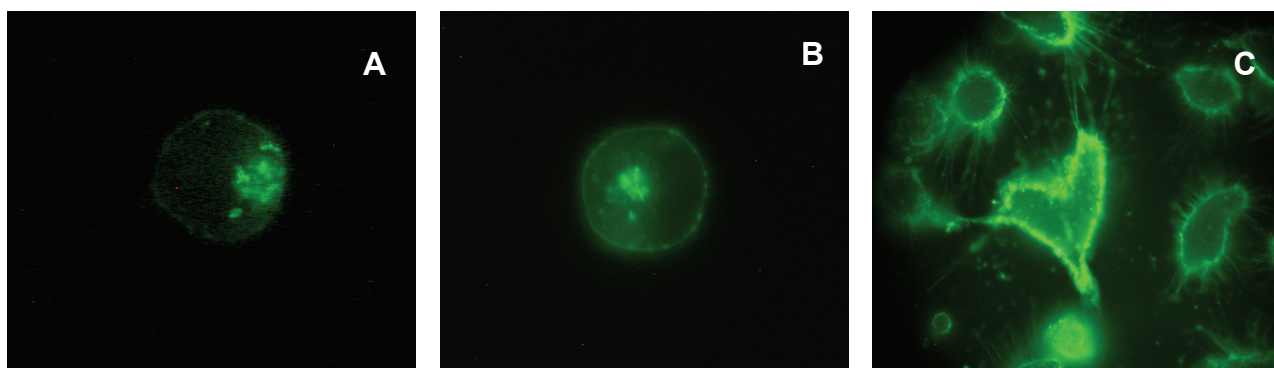


Figure 5.

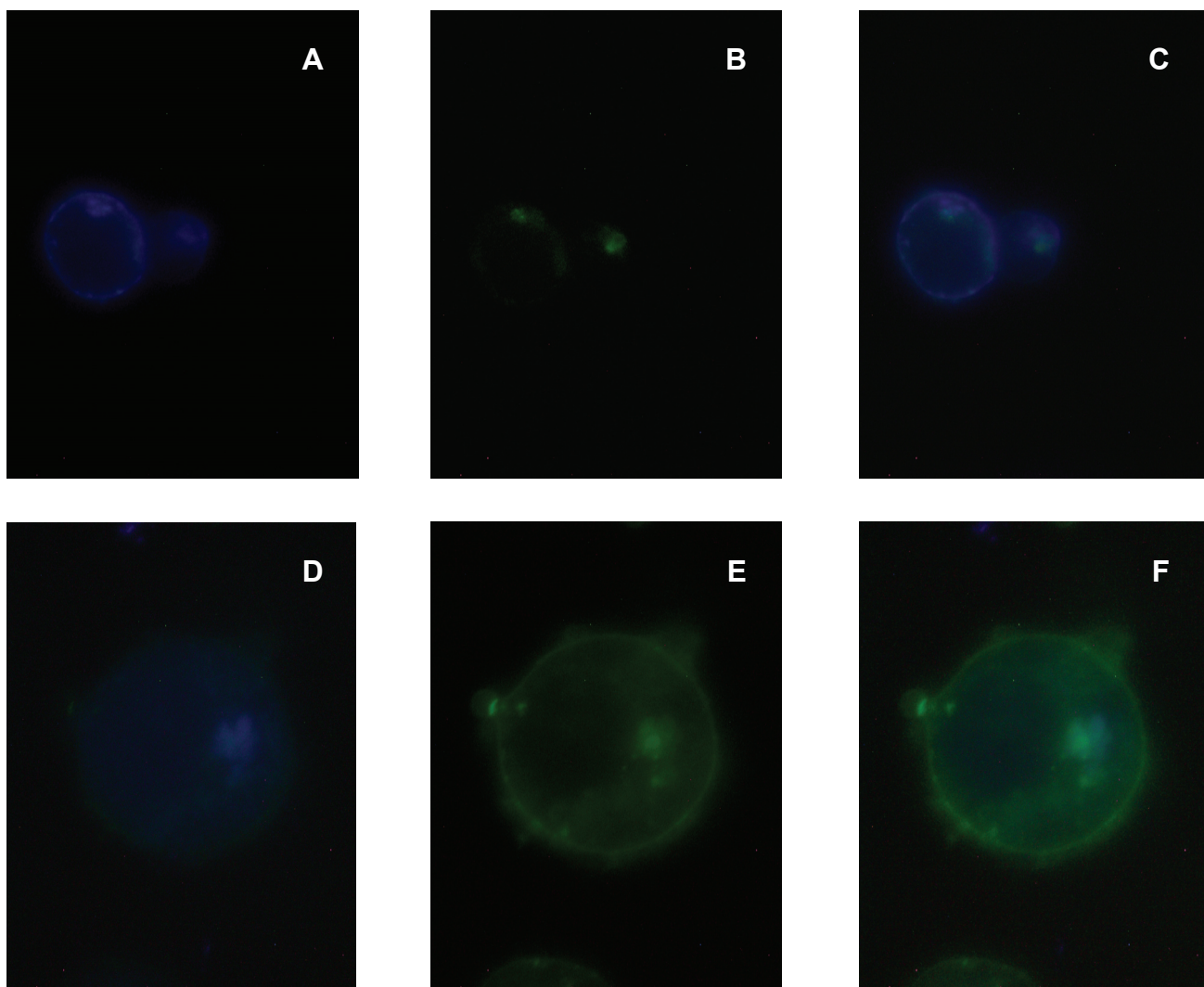
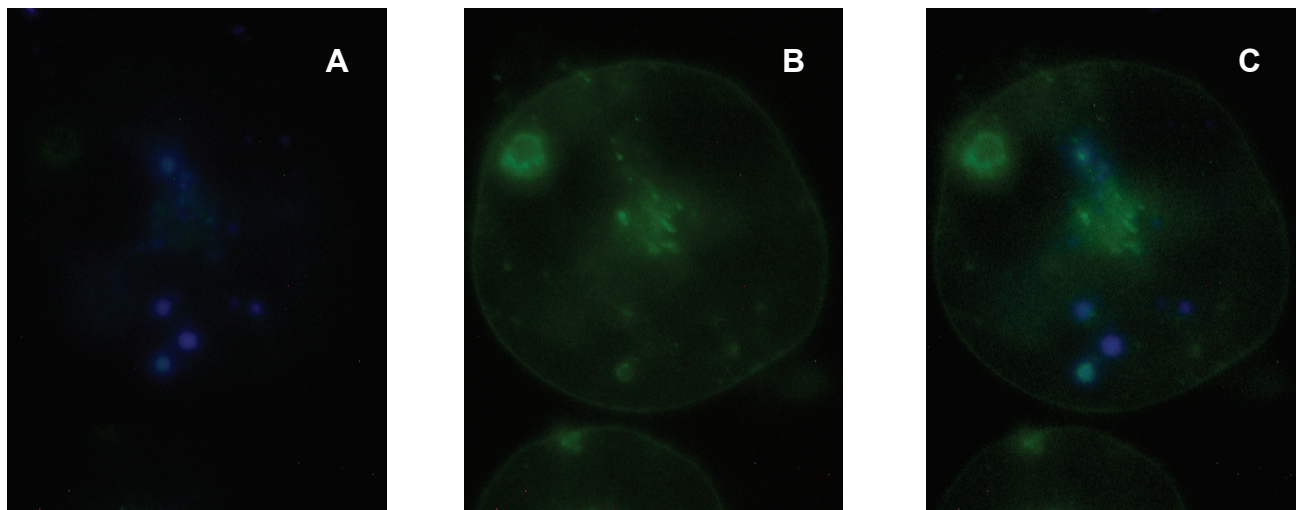


Figure 6.



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](#)