

**Pulchellina: Uma potente toxina vegetal inativadora de ribossomos – RIP tipo 2. estudos *in vitro* e *in vivo*.**

**André Luis Coelho da Silva**

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

Orientador: Profa. Dra. Ana Paula Ulian de Araújo

São Carlos – 2005

**USP/IFSC/SBI**



**8-2-001673**

**IFSC-USP** SERVIÇO DE BIBLIOTECA  
INFORMAÇÃO

IFSC - SP
CLASS.
Nº
FUNDO. Tu 1673

**Silva, André Luis Coelho da**

**“Pulchellina: Uma potente toxina vegetal inativadora de ribossomos – RIP tipo 2. Estudos in vitro e in vivo.”**

**André Luis Coelho da Silva – São Carlos, 2005**

**Tese (Doutorado) – Área de Física Aplicada – opção Bimolecular do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo**

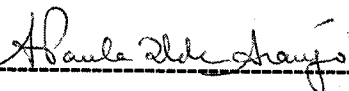
**2005 - Páginas: 115**

**Orientador: Profa. Dra. Ana Paula Ulian de Araújo  
Pulchellina.**


**I. Título**

MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA TESE DE DOUTORADO DE ANDRÉ LUIS  
COELHO DA SILVA APRESENTADA AO INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS,  
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, EM 25/05/2005.

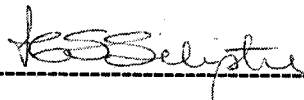
COMISSÃO JULGADORA:



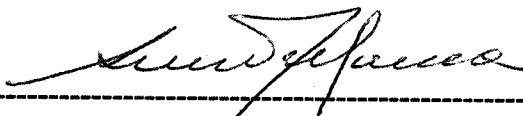
Prof. Dra. Ana Paula Ulian de Araújo (Orientadora e Presidente) – IFSC/USP



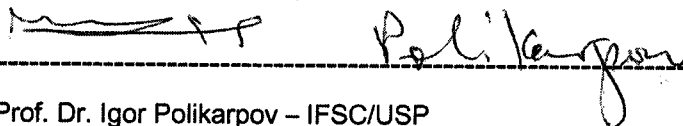
Prof. Dra. Célia Regina Ribeiro da Silva Carlini – UFRGS



Prof. Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo – UFSCar



Prof. Dr. Renato de Azevedo Moreira – UFC



Prof. Dr. Igor Polikarpov – IFSC/USP

*“Roguemos a Deus, ombros fortes, não só para carregar o bendito fardo das obrigações que nos competem, como também para sermos mais úteis e humildes”.*

**André Luiz**

*Aos meus amados pais-avós, José Saraiva de Araújo (in memoriam) e Teresinha Coelho de Araújo, pela educação e amor que fizeram de mim o homem que hoje sou.*

*A minha querida mãe, Maria do Socorro, por me ter dado o maior dos presentes... A vida!*

*Aos meus irmãos: Jerônimo, Emmanuelle e Daniel, por todo amor, carinho e compreensão.*

*A minha querida Cecília, pelo companheirismo, amor e dedicação.*

*Aos bons Espíritos de luz, principalmente ao Dr. Francisco Marcos Siqueira, pelo companheirismo, pela força e pela luz na minha jornada material.*

*A Deus, por tudo que sou e por tudo que tenho.*

## **AGRADECIMENTOS**

De modo bastante especial à minha orientadora, professora Dra. Ana Paula Ulian de Araújo pelo incentivo, apoio e criteriosa orientação, fundamentais na minha formação científica.

À professora Dra. Leila Maria Beltramini, por todo apoio e ter cedido seu laboratório e equipamentos para os experimentos práticos deste trabalho.

Ao professor Dr. Antônio José (Jabah) e a Dra. Maria Cristina, pela amizade, pelos valiosos ensinamentos e pela colaboração durante a realização deste trabalho. E ao professor Dr. Otaciro por sua imensa dedicação e vontade de transmitir conhecimentos.

Ao professor Dr. Renato de Azevedo Moreira, pelo qual cultivo a admiração, respeito e amizade de um filho. Agradeço por todos os ensinamentos e conselhos. E à professora Dra. Ana Cecília Góes Horta pelo apoio e amizade.

Aos técnicos Beto, Kelven, Bel, Susana e Andressa que muito me auxiliaram no desenvolvimento desse trabalho. Em especial, as minhas queridas amigas Bel e Andressa pela disposição e ajuda em todas as horas.

Aos amigos, Leandro Goto, Marlon, Gustavo Molina, Luciano e Cristina Nordi pela amizade, companheirismo e colaboração nas horas difíceis dessa jornada.

Aos companheiros de trabalho: Marcos Navarro, João, Ney, André Ambrosio, Mário, Monique, Wânus, Daiane, Danielle, Priscila, Débora, Assuero, Dani, Júlio, Célia, Sheila, Neusa, Marli, Zé, Marcel e Melissa pelo apoio e amizade. Em especial, a querida Ane pelos primeiros ensinamentos no laboratório de biologia molecular.

A querida Vivianne Viera pelas conversas, pelo carinho e amizade.

Aos queridos amigos: João Batista, Carlos Alberto, Eduardo Mágnio, Barone, Alexandre Neiva, Renan, André (Buana), Julieta (Tia Jú), Luciana (Flat), Cristiano Lins, Esaú, Monique, Dário, Vargas, Nirlene, Juquinha, Ricardo (Rolha), Rebecca, Rogério (Bicudo), Max e Galinho pelo apoio e pela amizade fraterna de tantos anos.

Às secretárias Ester e Wladerez pela amizade, atenção e interesse.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para execução desse trabalho.

Este trabalho foi realizado graças as seguintes instituições:

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por auxílios de pesquisa concedidos aos pesquisadores do curso de Pós-graduação em Física Biomolecular do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), através de convênios firmados com o grupo de Biofísica Molecular e Espectroscopia, e auxílios individuais concedidos aos pesquisadores.

À Universidade de São Paulo, grupos de Cristalografia e Biofísica Molecular Sérgio Mascarenhas em cujos laboratórios foram executadas as atividades práticas desta tese.

## SUMÁRIO

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE TABELAS.....	xii
ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
<b>CAPITULO 1: “Pulchellina, uma potente toxina RIP tipo 2 de <i>Abrus pulchellus</i>: Clonagem, Expressão e Estudos Estruturais da Cadeia Tóxica.”</b>	
<b>I. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
1. Proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs).....	01
2. Histórico.....	01
3. Considerações gerais sobre RIPs.....	04
3.1. Classificação.....	04
3.2. Distribuição, localização e biossíntese.....	06
3.3. Propriedades físico-químicas e estruturais.....	08
3.4. Interação e internalização.....	10
3.5. Papel fisiológico nas plantas.....	12
3.6. Toxicidade.....	13
3.7. Atividades biológicas.....	14
I.4. Pulchellina.....	17
I.5. Espécie <i>Abrus pulchellus</i> .....	19
<b>II. OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>
<b>III. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL.....</b>	<b>21</b>
<b>IV. MATERIAIS.....</b>	<b>22</b>
1. Material vegetal e animal.....	22
2. Outros materiais.....	22
<b>V. MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
1. Clonagem genômica.....	23
1.1. Extração do DNA genômico .....	23
1.2. <i>Primers</i> degenerados.....	23
1.3. PCR ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> ).....	24



1.4. Clonagem do produto amplificado.....	25
1.5. Sequenciamento.....	25
2. Clonagem e expressão da cadeia A da pulchellina.....	25
2.1. Construção de novos <i>primers</i> .....	25
2.2. Clonagem.....	27
2.4. Expressão em <i>E. coli</i> DH5- $\alpha$ .....	27
2.5. Expressão em <i>E.coli</i> AD202.....	28
3. Purificação da cadeia A recombinante da pulchellina (rPAC).....	28
3.1. Lise celular e análise da solubilidade.....	28
3.2. Purificação em resina de afinidade.....	28
3.3. Clivagem da proteína de fusão com Fator Xa.....	29
3.4. Purificação por cromatografia de troca iônica.....	30
4. Análise da seqüência N-terminal da rPAC.....	30
5. Produção de anticorpos e ensaio de imunodeteção da rPAC.....	30
6. Atividade RNA <i>N</i> -glicosilase ( <i>in vitro</i> ) da rPAC.....	31
7. Associação <i>in vitro</i> das cadeias recombinantes da pulchellina.....	32
8. Caracterização espectroscópica.....	33
8.1. Espectroscopia de dicroísmo circular (CD).....	33
8.2. Espectroscopia de fluorescência.....	33
9. Teste de toxicidade.....	34
<b>VI. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>35</b>
1. Amplificação e clonagem genômica da cadeia A da pulchellina.....	35
2. Expressão, purificação e caracterização da cadeia A recombinante da pulchellina.....	39
3. Características estruturais da rPAC.....	48
3.1. Estrutura primária.....	48
3.2. Estrutura secundária estimada por dicroísmo circular.....	48
3.3. Ensaio de fluorescência com a rPAC.....	55
4. Atividade RNA <i>N</i> -glicosilase ( <i>in vitro</i> ) da rPAC.....	58
5. Associação <i>in vitro</i> da rPAC com a rPBC.....	59
6. Dicroísmo circular utilizando o heterodímero rPAB.....	61
7. Teste de toxicidade.....	63
<b>VII. CONCLUSÕES.....</b>	<b>65</b>

<b>VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>67</b>
<b>IX. APÊNDICES.....</b>	<b>79</b>
<b>X. ANEXOS.....</b>	<b>81</b>
<b>CAPITULO 2: “Produção da pulchellina em cultura de tecidos vegetais.”</b>	
<b>I. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>82</b>
1. Considerações gerais sobre cultura de tecidos vegetais.....	82
2. Calogênese.....	84
3. Biossíntese de RIPs e outras proteínas vegetais em cultura de tecidos de plantas.....	89
<b>II. OBJETIVO.....</b>	<b>91</b>
<b>III. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL.....</b>	<b>92</b>
<b>IV. MATERIAIS.....</b>	<b>93</b>
1. Material vegetal.....	93
2. Material animal.....	93
3. Outros materiais.....	93
<b>V. MÉTODOS.....</b>	<b>94</b>
1. Esterilização dos cotilédones de <i>Abrus pulchellus</i> visando à indução <i>in vitro</i> de calos.....	94
2. Indução e manutenção de calos em cotilédones de <i>A. pulchellus</i> .....	94
3. Curva de crescimento dos calos.....	96
4. Extração e determinação do teor de proteínas solúveis dos calos.....	96
5. Acompanhamento da síntese protéica nos calos.....	96
6. Purificação da pulchellina dos calos por cromatografia de afinidade.....	97
7. Ensaio de imunodeteção.....	97
8. Ensaio de atividade hemaglutinante.....	97
9. Ensaio de toxicidade.....	99
10. Extração e isolamento do RNA total dos calos.....	99
11. Síntese do cDNA da cadeia tóxica da pulchellina através de RT-PCR.....	99
<b>VI. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>101</b>
1. Esterilização dos cotilédones de sementes de <i>A. pulchellus</i> .....	101
2. Indução e manutenção de calos em cotilédones de <i>A. pulchellus</i> .....	101
3. Curva de crescimento.....	105

4. Dosagem de proteínas solúveis e testes de atividade com os extratos de calos.....	107
5. Acompanhamento da síntese protéica nos calos.....	110
6. Purificação da pulchellina dos calos por cromatografia de afinidade.....	113
7. Síntese do cDNA da cadeia tóxica da pulchellina através de RT-PCR.....	116
<b>VII. CONCLUSÕES.....</b>	<b>118</b>
<b>VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>119</b>
<b>IX. APÊNDICES.....</b>	<b>125</b>
<b>X. ANEXOS.....</b>	<b>126</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura – Capítulo 1	Página
1. Representação esquemática da atividade RNA <i>N</i> -glicosilase das RIPs em ribossomos de ratos.....	04
2. Alinhamento esquemático das RIPs representando uma comparação entre suas estruturas primárias.....	06
3. <i>Abrus pulchellus</i> subespécie <i>tenuiflorus</i> .....	19
4. DNA genômico extraído de folhas frescas de <i>A. pulchellus</i> em gel de agarose 0,8 %.....	36
5. Produto da reação de amplificação em gel de agarose 0,8 %.....	37
6. Alinhamento entre as seqüências da preproabrina e prepropulchellina analisadas através do CLUSTAL W (1.8) <i>multiple sequence alignment</i> .....	38
7. Produto da reação de amplificação em gel de agarose 0,8 % utilizando os <i>primers</i> <i>pucA/NotI</i> e <i>pucA/BamHI</i> .....	40
8. Estrutura primária da cadeia A da pulchellina (PAC) alinhada as seqüências das cadeias A da abrina-c, abrina-a e ricina.....	41
9. Teste de expressão da rPAC em <i>E. coli</i> analisado em SDS-PAGE, corado com <i>Coomassie Blue R250</i> .....	43
10. Análise em SDS-PAGE 15 % da purificação da proteína de fusão (rPAC + GST) através da cromatografia de afinidade em resina de <i>Glutathione Sepharose-4 Fast flow</i> .....	44
11. Análise da clivagem da proteína de fusão (rPAC + GST) com Fator Xa em SDS-PAGE 15 %.....	45
12. Cromatografia de troca iônica em coluna MonoQ HR 5/5 do produto da clivagem com o Fator Xa.....	47
13. Análise da purificação da rPAC através de SDS-PAGE 15 % e <i>Western blot</i> . ....	48
14. Espectros de dicroísmo circular das amostras referentes aos picos PI e PII obtidos da cromatografia de troca iônica em coluna MonoQ.....	50
15. Espectros de dicroísmo circular da rPAC obtidos sob diferentes valores de pH.....	51
16. Espectros de dicroísmo circular da rPAC obtidos sob diferentes temperaturas.....	53
17. Curva de termoestabilidade da estrutura secundária obtida dos espectros de dicroísmo circular da rPAC.....	54
18. Espectros de emissão de fluorescência da rPAC e do NATA na ausência e na presença de	

adenina.....	57
19. Análise da atividade RNA <i>N</i> -glicosilase da rPAC e da pulchellina através de eletroforese em gel de agarose/formamida.....	59
20. Análise da associação <i>in vitro</i> da rPAC com a rPBC através de SDS-PAGE 15 %.....	60
21. Espectros de dicroísmo circular da rPBC, do heterodímero recombinante (rPAB), da pulchellina nativa e da rPAC.....	62
22. Atividade tóxica determinada por injeção intraperitoneal em camundongos utilizando diferentes concentrações da rPAC, rPAB, heterodímero rPAB e da pulchellina nativa.....	64

---

**Figura –Capítulo 2**

**Página**

1. Representação esquemática do ensaio de atividade hemaglutinante.....	98
2. Calos friáveis cotilédones de <i>A. pulchellus</i> induzidos e subcultivados no meio de cultura MS17.....	104
3. Diagrama das fases de crescimento de uma cultura de células em calos ou em suspensão celular.....	105
4. Curva de crescimento baseada no peso fresco dos calos cotilédones de <i>A. pulchellus</i> .....	107
5. Dosagem de proteínas solúveis dos calos de <i>A. pulchellus</i> extraídas em diferentes valores de pH.....	108
6. Dosagem de proteínas dos calos cotilédones de <i>A. pulchellus</i> obtidos durante os diferentes dias de crescimento.....	111
7. Análise dos extratos totais dos calos cotilédones de <i>A. pulchellus</i> obtidos durante os diferentes dias de crescimento através de SDS-PAGE 15 %.....	112
8. Imunodeteção da pulchellina em calos através da técnica de <i>Western blot</i> .....	112
9. Purificação da lectina de calos de <i>A. pulchellus</i> através de cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose-4B.....	114
10. Análise da purificação da pulchellina dos calos através de SDS-PAGE e <i>Western blot</i> .....	115
11. Análise do produto do RT-PCR a partir do RNA total dos calos de <i>A. pulchellus</i> .....	118

---

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela – Capítulo 1</b>	<b>Página</b>
1. Atividades relatadas para as RIPs (tipo 1, 2 e 3) em diferentes sistemas biológicos.....	16

---

<b>Tabela – Capítulo 2</b>	
1. Meios MS suplementados com diferentes concentrações de reguladores de crescimento e sacarose, utilizados para a indução de calos em cotilédones de <i>A. pulchellus</i> .....	95
2. Percentagem de calos em meios MS suplementados com diferentes concentrações de reguladores de crescimento e sacarose, utilizados para a indução de calos em cotilédones de <i>A. pulchellus</i> .....	103
3. Atividade tóxica determinada através de injeção intraperitoneal em camundogos, utilizando diferentes diluições do extrato total de calos de <i>A. pulchellus</i> .....	109
4. Rendimento da pulchellina de calos após as etapas de purificação.....	116

## ABREVIATURAS

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
Å	Angstrom
ABA	Ácido abscísico
AC	Anidrase carbônica
APG	Adenosina polinucleotídeo glicosilase
APGs	Arabinogalactanas
BA	6-benzaminopurina
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de cálcio
CD4	Linfócito T auxiliador
CITc	Citocromo c
DL <sub>50</sub>	Dose letal média
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	Desoxinucleotídeos
DO	Densidade óptica
EDTA	Ácido Etilenodiaminatetracético
EF	Fator de alongamento
EGTA	Ácido etilenoglicol-2-(2-aminoetil)
GST	Glutathiona S-transferase
h	hora
HCl	Ácido clorídrico
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IPTG	Isopropil-tio-β-D-galactosídeo
ITS	Inibidor de tripsina de soja
Kb	quilobase
KCl	Cloreto de potássio
kDa	quilodalton
Kin	Cinetina
LB	Luria-Bertani
mA	Mili amperes
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
min	minuto
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino)-propanosulfônico
MPa	Mega Pascal
MS	Murashige & Skoog
NaCl	Cloreto de sódio
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato diácido de sódio monoidratado
NaOAc	Acetato de sódio
NBT	nitro azul tetrazólio
NH <sub>4</sub> OAc	Acetato de amônio
OVA	Ovalbumina
p/v	Peso/volume
PAC	Cadeia A da pulchellina
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PAP	Proteína antiviral de <i>Phytolacca americana</i>

PBC	Cadeia B da pulchellina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEC	Células de exudato peritoneal
pI	Ponto isoelétrico
PVDF	Polivinilidenefluoreto
RE	Reticulo endoplasmático
RIP	Proteína inativadora de ribossomo
RNA	Ácido ribonucléico
rPAC	Cadeia A recombinante da pulchellina
rPBC	Cadeia B recombinante da pulchellina
rpm	Rotações por minuto
rRNA	RNA ribossomal
Sac	Sacarose
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TAE	Tampão Tris/Ácido acético/EDTA
TPE	Tampão Tris/Fosfato/EDTA
Tris	Tris(hidroximetil)amino metano
UV	Ultra-violeta
U	Unidade
YPD	Meio Levedura/Peptona/D-glucose



## RESUMO

Pulchellina é uma proteína inativadora de ribossomo (RIP) isolada de sementes de *Abrus pulchellus*. O fragmento que codifica a cadeia A da pulchellina (PAC) foi clonado e inserido no vetor pGEX-5X para expressar a cadeia A recombinante (rPAC) como uma proteína de fusão em *Escherichia coli*. A análise da seqüência de aminoácidos mostrou que a rPAC apresenta uma alta identidade seqüencial (>86%) com a cadeia A da abrina-c. A habilidade que a rPAC possui para depurinar rRNA em ribossomos de levedura também foi demonstrada em testes *in vitro*. Objetivando verificar a atividade tóxica do produto heterólogo, nós promovemos a associação *in vitro* da rPAC com a cadeia B recombinante da pulchellina (rPBC). Ambas as cadeias foram incubadas na presença de um sistema de redução/oxidação, originando um heterodímero ativo (rPAB). O rPAB apresentou uma massa molecular aparente de aproximadamente 60 kDa, similar a pulchellina nativa. As atividades tóxicas do rPAB e da pulchellina nativa foram comparadas através da injeção intraperitoneal em camundongos, usando diferentes diluições de cada proteína. O rPAB foi capaz de matar 50% dos animais testados com doses de 45  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . Nossos resultados mostraram que o heterodímero recombinante apresenta tanto toxicidade quanto um padrão conformacional similar à pulchellina nativa. Estudos usando cultura de tecidos também foram realizados com o objetivo de investigar a presença da pulchellina em calos obtidos a partir de sementes de *A. pulchellus*. Segmentos de cotilédones de sementes imaturas foram inoculados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de auxina, citocinina e sacarose para promover a indução dos calos. A expressão da pulchellina nos calos foi monitorada através de RT-PCR e testes de atividade biológica. Os calos obtidos após 35 dias foram congelados, macerados e submetidos à extração de RNA total e proteínas. Um fragmento específico de DNA que codifica a cadeia A da pulchellina foi amplificado a partir do RNA total sugerindo a síntese da proteína nos calos. Isto foi confirmado no extrato bruto de calos, que mostrou atividade hemaglutinante contra sangue de coelho e uma alta toxicidade quando injetado via intraperitoneal em camundongos. O extrato bruto também foi submetido à cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose-4B. A fração retida na coluna apresentou duas bandas protéicas quando analisadas em gel de poliacrinamida, sob condições desnaturantes, apresentando um padrão similar ao obtido com a pulchellina de semente.

## ABSTRACT

Pulchellin is a type 2 ribosome-inactivating protein (RIP) isolated from seeds of the *Abrus pulchellus tenuiflorus* plant. The DNA fragment encoding Pulchellin A-chain (PAC) was cloned and inserted in 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*. Intending 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 about 60 kDa similar to the native pulchellin. The toxic activities of the rPAB and native pulchellin were compared by intraperitoneal injection in mice using different dilutions. The rPAB was able to kill 50% of the tested mice with doses of 45  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . Our results indicated that the recombinant heterodimer presented toxic activity and a conformational pattern similar to pulchellin. Studies using tissue cultures were also performed to investigate the presence of the pulchellin in callus established from seed explants of *A. pulchellus*. Cotyledon segments of immature seeds were inoculated in basal medium MS supplemented with different concentrations of auxin, cytokinin and sucrose in order to determine the best callus induction. The pulchellin expression was monitored in callus cultures by RT-PCR and biological activity. The calli obtained after 35 days were freeze dried, macerated and submitted to extraction of total RNA and proteins. A specific DNA fragment codifying the A-chain pulchellin was amplified from callus RNA suggesting the synthesis of the protein. This was confirmed in the calli crude extract that showed haemagglutinating activity against rabbit blood cells and a high intraperitoneal toxicity to mice. The crude extract was also submitted to affinity chromatography on a Sepharose-4B column. The retained protein, showed to be composed by two main bands in polyacrylamide gel electrophoresis, in denaturing conditions, with a similar pattern to the results obtained with seeds pulchellin.

# CAPÍTULO 1

---

**“Pulchellina, uma potente toxina RIP tipo 2 de *Abrus pulchellus*:  
Clonagem, Expressão e Estudos Estruturais da Cadeia Tóxica.”**

## I. INTRODUÇÃO

### I.1. Proteínas inativadoras de ribossomo (RIPs).

A observação de que certas proteínas de origem vegetal eram capazes de inativar irreversivelmente (*in vitro*) a síntese de proteína em ribossomos animais, levou à origem do termo “proteínas inativadoras de ribossomo” (RIPs). Porém, por ter sido adotado antes de estudos estruturais e enzimáticos mais aprofundados, por muito tempo, esse termo foi aplicado para todas as proteínas vegetais que apresentassem esse tipo de atividade biológica. Após a elucidação do modo de ação das RIPs sobre ribossomos e a descoberta de que elas possuem um sítio específico com atividade RNA *N*-glicosilase, o termo RIP passou a ser associado apenas a essa atividade enzimática [1].

De acordo com nomenclatura internacional de enzimas, todas as proteínas capazes de catalisar a endohidrólise da ligação *N*-glicosídica numa adenina específica do RNA ribossomal, são consideradas RNA *N*-glicosilase (EC 3.2.2.22). Embora o termo RNA *N*-glicosidase seja comumente usado como sinônimo, RNA *N*-glicosilase é o nome oficial adotado para esse grupo de enzimas e deve ser preferencialmente usado [1].

A associação do termo RIP com a atividade RNA *N*-glicosilase é importante para diferenciar essas proteínas de outras, que apesar de também serem capazes de inativar ribossomos (por exemplo, RNases e proteases) não são consideradas RIPs, pois utilizam outros mecanismos de ação.

Sabe-se, atualmente, que as RIPs não são somente enzimas com uma atividade catalítica *in vitro* bem definida, mas também são proteínas bioativas que possuem atividades biológicas específicas tanto em plantas como em células de diversos organismos. Portanto, as atividades biológicas das RIPs podem ser um indicativo do seu papel fisiológico [1].

### I.2. Histórico

A história das RIPs começou em meados do século XIX, mesmo antes da descoberta de que certos extratos vegetais eram capazes de aglutinar eritrócitos sanguíneos e pouco depois da teoria celular. Naquele período se especulava sobre a natureza das substâncias tóxicas presentes em sementes de determinadas plantas. Uma das primeiras publicações sobre essas substâncias foi a tese de doutoramento de Georg Friedrich Krich

(Krich *apud* Ilomets, 1990<sup>I</sup>), intitulada “*Experimenta quedam phamacologica de oleis ricini, crotinis et Euphorbiae lathyridis*”, que descrevia a toxicidade dos óleos de *Ricinus communis*, *Croton triglium* e *Euphorbiae lathyridis*. Logo em seguida, foi relatado o isolamento de uma fração obtida por aquecimento e precipitação alcoólica de um extrato aquoso de sementes de *Ricinus communis* (Tuson *apud* Ilomets, 1990<sup>II</sup>). A fração isolada, no entanto, não apresentava atividade tóxica e foi Emil Werner (Werner *apud* Franz, 1988<sup>III</sup>) que superou o problema ao fazer extração a frio, obtendo uma fração ativa. No entanto, ele observou que essa fração perdia a atividade tóxica com o tempo, quando injetada, provavelmente pelo fato de que, na época, era comum usar o mesmo animal várias vezes para testar a atividade. Embora não tendo atentado ao fato, Werner foi o primeiro pesquisador a detectar imunização de um animal contra uma fração protéica.

A natureza protéica do fator tóxico presente em sementes de *Ricinus communis* e *Abrus precatorius* foi demonstrada logo nos anos seguintes (Warden & Waddel *apud* Kocourek, 1986<sup>III</sup>). Por exemplo, Warden e Waddel mostraram que a toxicidade de sementes de *Abrus precatorius* (jequiriti) era devido a uma fração protéica que podia ser precipitada com álcool a partir de um extrato aquoso, excluindo, neste caso, a possibilidade de que a toxicidade fosse devida à contaminação bacteriana. Pois, até o fim do século XIX, acreditava-se que tal efeito fosse devido à contaminação das sementes por toxinas bacterianas. Posteriormente, uma série de investigações estabeleceu a distinção entre as intoxicações de origem bacteriana daquelas induzidas por componentes da própria semente.

---

<sup>I</sup> Krich, G.F. *Experimenta quedam phamacologica de oleis ricini crotinis et Euphorbia lathyridis*. Tese, Dorpati Livonorun, (1857) *apud* Ilomets, T. Centenary of the Discovery of Lectins at Tartu University.// *Lectins-Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*. Vol 7. Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri USA 1990, 3 – 8.

<sup>II</sup> Tuson, R.V. *J. Chem. Soc.* 17, 195-197, 1864 *apud* Ilomets, T. Centenary of the Discovery of Lectins at Tartu University.// *Lectins-Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*. Vol 7. Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri USA 1990, 3 – 8.

<sup>III</sup> Warden, C.J.H; Waddel, L.A. The nature of poison with observations on its chemical and physiological properties. Bengal Secretarial Press, 1884 *apud* Kocourek, J. (1986). Historical background. In: Liener, I.J.; Sharon, N. & Goldstein, I.J., eds *The lectins. Properties, functions and applications in biology and medicine*. London, Academic Press, 3-32.

Segundo a literatura, o marco inicial da história científica das RIPs data de 1888, quando Stillmark (Stillmark *apud* Liener, 1986<sup>IV</sup>) publicou sua tese intitulada “Über Ricin ein giftiges ferment aus den samen von *Ricinus communis* L. und einigen anderen Euphorbiaceen”. Baseado nos dados experimentais de sua pesquisa, Stillmark acreditava que a ação tóxica dos extratos de sementes fosse consequência das propriedades hemaglutinantes que esses extratos apresentavam. Ele observou que quando a fração protéica (referente à ricina) era adicionada a uma suspensão de hemáceas, estas aglutinavam. O autor também observou que a fração protéica era capaz de aglutinar células epiteliais, células de fígados, leucócitos e relatou que essa fração reagia de maneira distinta com diferentes tipos de hemáceas.

Após os estudos de Stillmark, a capacidade hemaglutinante também foi observada em extratos de sementes de *Abrus precatorius* (Hellin *apud* Liener, 1986<sup>V</sup>). Porém, até nesta época, os princípios tóxicos dos extratos de sementes de algumas espécies ainda eram creditados às propriedades de hemaglutinação e hemólise dos extratos. Somente no início da década de 70, foi que estudos mostraram que as preparações de daquela época eram, na verdade, uma mistura de uma potente citotoxina (RIP) e uma hemaglutinina (lectina) [2]. Atualmente sabe-se que a porção hemaglutinina, isolada, é oralmente inativa e só apresenta ação aglutinante em hemácias *in vitro*, ou quando administrada via intravenosa [3].

Somente após os primeiros estudos de Stillmark, o primeiro modelo sobre o mecanismo de ação em ribossomos de mamíferos foi proposto. Endo *et al.* [4] descreveram as proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs) como sendo um grupo de enzimas RNA *N*-glicosilases capazes de catalisar a clivagem de uma adenina conservada na subunidade 28S do RNA ribossomal e conseqüentemente bloquear a tradução. De acordo com o mecanismo proposto, todos os resíduos de adenina clivados estão localizados em um *loop* de uma região do RNA ribossomal que possui uma seqüência conservada GAGA (nomeada de *loop* sarcina/ricina), sugerindo então, que as RIPs reconhecem esta estrutura específica e clivam

---

<sup>IV</sup> Stillmark, H. Über Ricin ein giftiges ferment aus den samen von *Ricinus communis* L. und einigen anderen Euphorbiaceen. Tese de doutorado, Universidade de Dorpad, Dorpad (Tartu), 1988 *apud* Liener, I.J.; Sharon, N.; Goldstein, I.J. The lectins. Properties, functions and applications in biology and medicine. New York, Academic Press Inc, 600 pp., 1986.

<sup>V</sup> Hellin, H. Der giftig Eiweisskörper abrin und dessen wirkung auf das blut. Tese de doutorado, Universidade de Dorpad, Dorpad (Tartu), 1891 *apud* Liener, I.J.; Sharon, N.; Goldstein, I.J. The lectins. Properties, functions and applications in biology and medicine. New York, Academic Press Inc, 600 pp., 1986.



**RIP tipo 1:** são enzimas monoméricas que possuem um único domínio RNA *N*-glicosilase, sendo que a maioria possui tamanho aproximado de 30 kDa, como a saporina (*Saponaria officinalis*) e a PAP, proteína antiviral de *pokeweed*\*. Normalmente, são proteínas básicas que apresentam resíduos altamente conservados dentro do sítio ativo e na estrutura secundária da região do sítio ativo [7]. Por não possuírem uma cadeia ligante a glicoconjugados, conseqüentemente as RIPs tipo 1 apresentam uma baixa citotoxicidade. Entretanto, algumas proteínas desta classe podem entrar na célula através do mecanismo endocitose fase-fluída, como por exemplo, a saporina, que se liga ao receptor  $\alpha_2$ -macroglobulina expresso em muitas células humanas [8]. É muito provável que as RIPs tipo 2 tenham sido originadas da fusão de um gene ancestral das RIPs tipo 1 com um gene ancestral das lectinas [1].

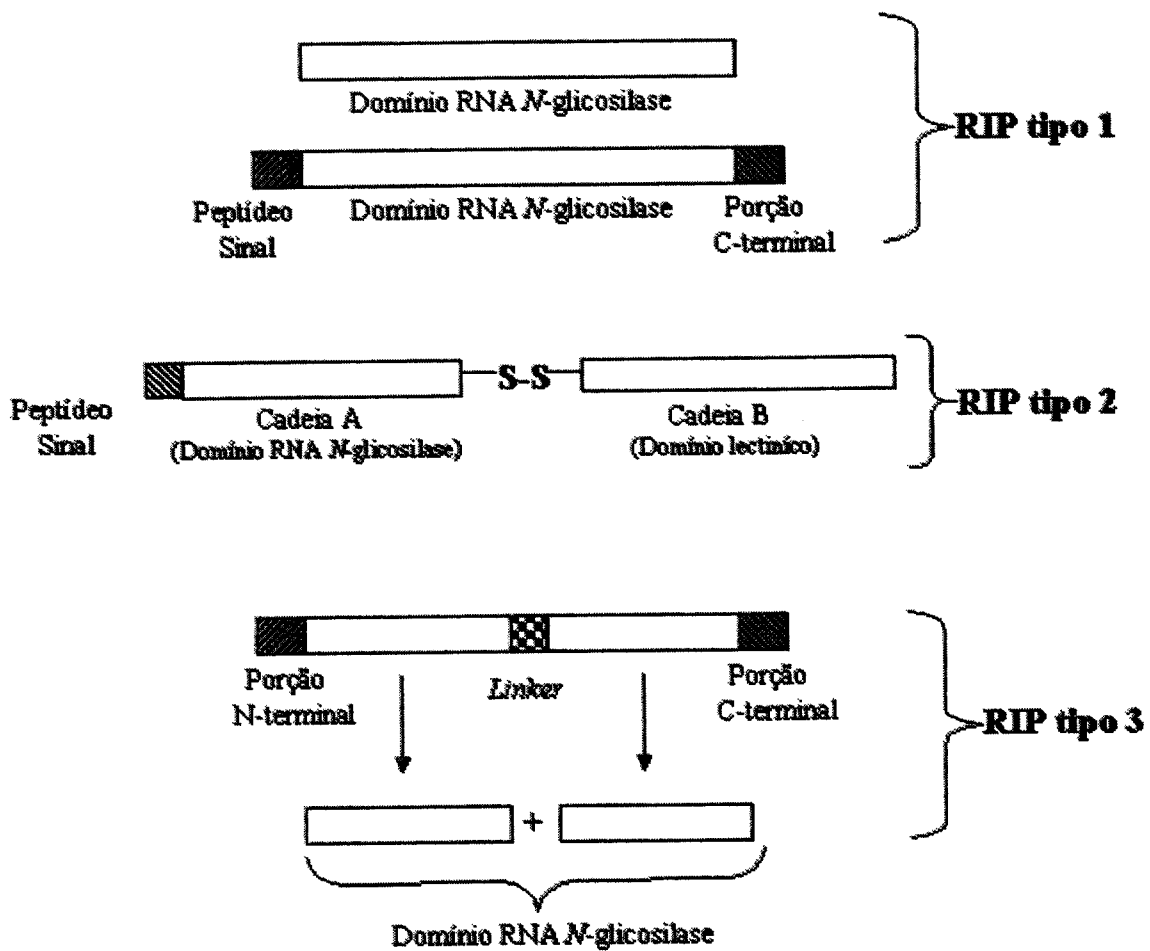
**RIP tipo 2:** são proteínas heterodiméricas, altamente tóxicas, com propriedades lectínicas e enzimáticas em subunidades polipeptídicas separadas, cada uma de aproximadamente 30 kDa, onde um polipeptídeo com atividade RIP (cadeia A) é ligado por meio de uma ligação dissulfeto a uma cadeia lectínica (cadeia B) [9]. A cadeia lectínica pode se ligar a glicoproteínas ou glicoconjugados da superfície de células eucarióticas [10] e mediar o transporte da cadeia A para o citosol [11]. Uma vez no citosol, a RIP tem acesso à maquinaria de tradução e rapidamente interrompe a síntese protéica. Pertencem a esta classe a abrina (de *Abrus precatorius*) e a ricina (de *Ricinus communis*).

**RIP tipo 3:** são aquelas sintetizadas como precursoras inativas (proRIPs) que requerem um processamento proteolítico entre os aminoácidos envolvidos na formação do sítio ativo. Essas RIPs são bem menos comuns que os outros dois tipos, sendo que, até o momento, foram caracterizadas somente em milho e cevada [12].

---

\* Pokeweed é o nome vulgar atribuído à espécie vegetal *Phytolacca americana*.





**Figura 2 – Alinhamento esquemático das RIPs representando uma comparação entre suas estruturas primárias [7]. A simbologia -S-S- representa a ligação dissulfeto que liga os dois domínios.**

### **L3.2. Distribuição, localização e biossíntese das RIPs.**

Estudos realizados nos últimos anos revelam que as RIPs estão amplamente distribuídas entre plantas, fungos, bactérias e até em algas [13, 14, 15].

A maioria das RIPs purificadas até o momento consiste de proteínas de cadeia única (tipo 1). As RIPs tipo 2 foram somente encontradas em 20 espécies de plantas de diferentes

famílias: Euphorbiaceae, Curcubitaceae, Sambucaceae, Fabaceae, Passifloraceae, Caprifoliaceae, Viscaceae e Liliaceae [13].

De um modo geral, as RIPs já foram encontradas em mais de 100 espécies vegetais, estando distribuídas não somente em sementes, mas também em outras partes da planta [13, 16]. Como exemplo, podemos citar a presença de RIPs tipo 1 e tipo 2 em: folhas de *Dianthus sinensis* e de *Poligonatum multiflorum* [17, 18]; raízes de *Mirabilis jalapa* e de *Curcubita foetidissima* [19, 20]; frutos de *Cucurbita moschata* e de *Sambucus nigra* [21, 22]; sementes de *Momordica charantia* e de *Cinnamomum camphora* [23, 24]; bulbos de *Iris hollandica* [25]; látex de *Hura crepitans* [26]. No caso das RIPs tipo 3, ocorrências foram relatadas somente em sementes e em folhas de milho e cevada [27, 28, 29].

Apesar de até o momento existirem relatos da presença de RIPs em quase todos os tecidos vegetais, segundo Barbieri *et al.* [30], uma RIP produzida numa planta não necessariamente expressa a sua atividade tóxica em todos os seus tecidos. Podemos citar como exemplo as RIPs tipo 1 de *Dianthus cayophyllus* (diantina 30 e 32) estudadas com a ajuda de anticorpos produzidos contra essas proteínas. A diantina 30 foi detectada em todas as partes da planta, incluindo sementes. Porém, a diantina 32 foi encontrada apenas em folhas e brotos vegetativos [31].

As plantas que produzem RIPs, desenvolveram ao longo do processo evolutivo, diferentes estratégias para se autoprotegerem da ação dessas toxinas durante o processo de biossíntese [30]. Três processos parecem estar envolvidos no mecanismo de síntese das RIPs: 1) relativa resistência dos ribossomos autólogos à ação das RIPs; 2) sínteses de pró-formas inativas; 3) sínteses de pró-formas com seqüências sinais no N-terminal que direcionam a cadeia polipeptídica nascente ao lúmen do retículo endoplasmático antes que ela seja enovelada na conformação ativa [30]. Por exemplo, durante a biossíntese da ricina nas sementes de *Ricinus communis*, a seqüência sinal N-terminal da prepro-ricina media a translocação co-traducional do precursor nascente dentro do lúmen do retículo endoplasmático (RE) e a seqüência sinal é clivada durante esta etapa. A pró-ricina é glicosilada e as ligações dissulfeto são formadas. No RE a pró-ricina é transportada via aparelho de Golgi para corpos protéicos, onde é processada por uma proteinase para sua forma madura [29]. A síntese da ricina na forma de um precursor inativo é o principal

mecanismo através do qual, as células de mamona se protegem da ação tóxica dessa proteína [32].

### I.3.3. Propriedades físico-químicas e estruturais.

A massa molecular das RIPs tem sido usualmente determinada por eletroforese em PAGE-SDS, porém tem sido relatado, que os valores obtidos por filtração em gel são menores devido à provável existência de interações com a matriz cromatográfica. Diferentes estudos revelaram que as massas moleculares deduzidas a partir das seqüências completas de aminoácidos de diversas RIPs, concordam com as determinadas por PAGE-SDS. Esses estudos também demonstram que as massas moleculares das RIPs variam em torno de 30 kDa, tanto para as tipo 1 como para a cadeia A das RIPs tipo 2. Valores um pouco maiores foram encontrados para a cadeia B [30].

Apesar da maioria das RIPs tipo 1 apresentarem um pI básico ( $\geq 9,5$ ), existem algumas exceções, como é o caso da camphorina (purificada de sementes de *Cinnamomum camphora*) que apresenta um pI de 6,1, o que difere bastante das demais RIPs tipo 1 [33]. Já a cadeia A das RIPs tipo 2 pode ser ácida ou básica com o pI entre 4,6 para a abrina e 8,6 para algumas das cadeias A de isoformas da ricina [30, 34].

Com o avanço biotecnológico, a composição de aminoácidos um grande número de RIPs já é atualmente conhecida para ambos os tipos [35, 36]. As RIPs tipo 2, semelhantes às outras lectinas vegetais, são geralmente ricas em aminoácidos ácidos e hidrofóbicos, e também possuem uma certa quantidade de aminoácidos sulfurados, como é o caso das RIPs de sementes de *Abrus precatorius* [37, 38].

Na grande maioria, as RIPs são glicoproteínas. Alguns trabalhos relatam que os componentes carboidratos não têm um papel relevante na atividade enzimática das RIPs, pois essa atividade também tem sido observada em algumas proteínas não glicosiladas [39, 40, 41]. Entretanto, esses carboidratos apresentam uma grande importância no englobamento dessas proteínas pelas células. A porção glicídica das diferentes RIPs varia tanto em quantidade como na composição do açúcar [30]. A gelonina e a cadeia A da ricina podem ser deglicosiladas sem afetarem sua capacidade de inibir a síntese proteica em reticulócitos lisados de coelho. As cadeias A recombinantes da abrina e da ricina,

expressas não glicosiladas em *Escherichia coli*, são completamente funcionais [40]. Os açúcares presentes nas RIPs são geralmente glicose, galactose, manose, fucose, xilose e N-acetil D-glicosamina [30, 31].

As estruturas das cadeias laterais dos carboidratos da momordina-a [42], da ricina-d (cadeias A e B) e da ricina-a (cadeia A) foram elucidadas detalhadamente. A cadeia A da ricina-d contém uma única unidade completa de oligossacarídeos, enquanto a cadeia A da ricina-a contém um elevado complexo de oligossacarídeos de manose. A cadeia B apresenta dois tipos de oligossacarídeos também com elevada quantidade de manose. Outros exemplos são a lufina-a, lufina-b e da PAP que apresentam resíduos de asparagina glicosilados somente com N-acetil D-glicosamina. Esse padrão único de glicosilação foi atribuído à presença, em certos tecidos das plantas, de uma enzima endo-N-acetilglicosaminidase [43]. Sítios de glicosilação também foram identificados na sequência C-terminal da pro-saporina, os quais são clivados para formar a proteína madura, que é livre de açúcares neutros [44].

Até o início dos anos 90, a ricina era a única RIP que tinha a estrutura tridimensional resolvida em detalhe por difração de raios-X [45, 46, 47], apesar dos estudos cristalográficos com RIPs tipo 2 datarem de 1973 [48]. Como resultado, foi mostrado que a cadeia A da ricina é uma proteína globular que apresenta uma estrutura secundária regular e uma cavidade bem definida. Essa cavidade foi relacionada ao sítio de atividade enzimática, pois a atividade da cadeia A recombinante da ricina é abolida por modificações introduzida na sequência de nucleotídeos, na posição correspondente aos aminoácidos envolvidos na cavidade. Os resultados de difração também demonstraram que a cadeia B da ricina é dividida em dois domínios similares contendo um sítio de ligação para açúcar na porção mais superficial. A especificidade (D-galactose) da ligação é dada por uma ponte de hidrogênio entre um resíduo de glutamina e um grupo hidroxila na posição quatro do resíduo galactosídico. A análise mutacional e bioquímica da cadeia B da ricina revelaram a presença de no mínimo três sítios de ligação a carboidratos localizados nos subdomínios  $1\alpha$ ,  $1\beta$  e  $2\gamma$  dessa molécula [49, 50]. No entanto, Agopov *et al.* [51] demonstraram que a cadeia B da ricina possivelmente interage com a membrana celular através de dois sítios ligantes: um sítio ligante a galactose e outro sítio hidrofóbico intercadeia. Outros dados

obtidos por difração confirmaram a evidência bioquímica de que as duas cadeias são unidas por ligações dissulfeto e por ligações hidrofóbicas [35].

Atualmente, várias outras RIPs têm sido cristalizadas e suas estruturas resolvidas por difração de raios-X [35]. Como exemplo, a abrina-a, que apresentou um cristal cujos dados estruturais foram obtidos com uma resolução de 2.14 Å [38]. Esse estudo mostrou que o sítio ativo (na cadeia A) da abrina é composto por cinco resíduos invariantes (Tyr74, Tyr113, Glu64, Arg167 e Trp198) e cinco resíduos conservados (Asn72, Arg124, Gln160, Glu195 e Asn196). Estudos envolvendo o alinhamento da seqüência de aminoácidos também revelaram que todos esses resíduos são extremamente conservados em diversas RIPs [46, 52]. Análises cristalográficas das estruturas da ricina, tricosantina, PAP, momordina e abrina-a mostraram uma elevada identidade estrutural entre os sítios ativos dessas proteínas. Porém, a estrutura fina incluindo a orientação de algumas cadeias laterais, o número de moléculas de água e de pontes de hidrogênio pode variar consideravelmente [38].

#### **I.3.4. Interação e internalização das RIPs.**

Apesar de ser bastante estudado, o mecanismo de entrada das RIPs nas células ainda é alvo de grande especulação. O interesse nesse mecanismo de internalização aumentou devido a esse processo ser um ponto chave na possível utilização terapêutica dessas proteínas. Além disso, estudos desse tipo são de extrema importância para o discernimento do transporte intracelular e da distribuição de ligantes fisiológicos. Atualmente, muitas evidências sugerem que essas toxinas entram e distribuem-se por vias específicas.

A maioria dessas observações está voltada para as RIPs tipo 2 e sugerem que mais de um mecanismo de internalização esteja envolvido [53]. Segundo Barbieri *et al.* [30] a interação RIP-célula parece ser seguida de três fatos comuns: (1) a inibição da síntese protéica geralmente não é detectada nas células antes de 30 minutos; (2) apenas poucas moléculas tóxicas são captadas pelas células e transferidas para o citosol, alcançando assim o seu alvo; e (3) uma única molécula RIP pode ser suficiente para induzir a morte celular.

A primeira etapa da internalização das RIPs é a interação RIP-célula que consiste na ligação dessas proteínas aos sítios receptores presentes na superfície da membrana celular.

No caso das RIPs tipo 2 esse processo geralmente ocorre à temperatura fisiológica e pode ser suprimido pela a adição do açúcar pelo o qual a proteína apresenta especificidade ou por ilimaquinona [66], um metabólito obtido de esponjas do mar.

O número de sítios de ligação nas células varia bastante para as diferentes RIPs tipo 2. Por exemplo, para a ricina esses sítios foram estimados, podendo ser de 0,2 a  $8,0 \times 10^7$ /célula [55]. Um número similar de ligantes foi encontrado para a abrina [56]. No entanto, as células apresentaram um menor número de sítios ( $1,0$  a  $2,0 \times 10^5$ /célula) para a modicina [57].

Como comentado anteriormente, as RIPs 2 são potentes toxinas que possuem atividade lectínica. Essas proteínas podem ser captadas por um maior número de células devido à presença de glicoconjugados na superfície celular. A adição do açúcar ligante ao meio promove uma competição com os receptores da membrana pela toxina, conseqüentemente inibindo a ligação da proteína à membrana e reduzindo drasticamente a toxicidade [58].

Outro processo de reconhecimento é a interação de receptores com as cadeias laterais de carboidratos presentes nas proteínas. As cadeias A e B da ricina apresentam grupos de oligossacarídeos contendo manose, os quais são os principais responsáveis pela ligação e toxicidade da proteína em células não parenquimais de fígado de rato [32, 59]. A ligação da ricina a essas células é inibida na presença de galactose, porém inibida com mais eficiência por manose ou manana, sendo completamente suprimida na presença de ambos carboidratos [60]. Isso indica que a ricina pode ligar-se a células não parenquimais através de dois diferentes mecanismos: (1) via sítio de ligação à galactose da cadeia B que se liga a resíduos galactosídicos presentes na membrana celular, e (2) pela a presença de resíduos de manose em ambas às cadeias, que são ligados por receptores de manose presentes nas células não parenquimais. O elevado efeito inibitório da manose sobre a citotoxicidade da ricina, causada as células não parenquimais do fígado, sugere que esse mecanismo é bastante eficiente. Porém, a ricina entra essencialmente em hepatócitos de rato através da via de reconhecimento galactosídico [30].

Até o momento, o mecanismo de internalização das RIPs tipo 1 ainda não foi totalmente elucidado e somente algumas hipóteses foram formuladas sobre esse assunto. Segundo uma dessas hipóteses, por conta da presença de resíduos glicosil nas cadeias

laterais de várias RIPs tipo 1, muitas dessas proteínas podem ser internalizadas depois de se ligarem a receptores de carboidratos presentes na superfície da membrana celular [1, 7]. As células de exudato peritoneal (PEC) de ratos foram capazes de internalizar a gelonina (uma RIP tipo 1 isolada de sementes de *Gelonium multiflorum*) através dos receptores de manose presentes nessa proteína. Inibidores de manana também foram capazes de se ligarem especificamente aos receptores manosídicos, alterando assim, o padrão de captação da gelonina pelas PEC [61]. Diferentes estudos apontam o fato de que as RIPs também podem ser internalizadas pelo mecanismo de endocitose fase-fluida, a qual permite a entrada de moléculas sem um mecanismo mediador receptor [8, 47, 55].

Um quarto mecanismo de internalização tem sido proposto para ambas as RIPs e está relacionado à presença de receptores concentrados em invaginações da membrana, denominadas *coated pits* e *uncoated*. Esse é um mecanismo não seletivo, o qual é menos eficiente na captação dessas moléculas quando comparado aos demais. A clatrina é uma proteína fibrosa da superfície celular e que possui a capacidade de promover um mecanismo energético (*coated pits clathrin*), que combinado com a sua flexibilidade, ajuda a vesícula a ser contraída [62, 63]. As RIPs contendo manose podem utilizar esse mecanismo para internalização depois de ligadas a receptores localizados nos *coated pits* [7, 59].

### 1.3.5. Papel fisiológico das RIPs nas plantas.

A enzimologia das RIPs tem sido bem caracterizada, porém, o papel que essas proteínas desempenham nas plantas ainda é objeto de grande especulação. Um dos fatores que contribuem para a dificuldade em elucidar as funções biológicas das RIPs é o fato delas compartilharem poucas propriedades além da capacidade de depurar ribossomos. Aliás, até mesmo esta atividade pode variar entre os diferentes substratos [7].

Estudos com mutantes, plantas transgênicas, testes nutricionais e ensaios biológicos sugerem que a defesa é um dos principais papéis das RIPs [64]. Porém, dados sobre a estrutura, função e evolução sugerem que os vários tipos de RIPs possuem papéis fisiológicos diferentes. Muito provavelmente, todas as RIPs, estão de alguma forma envolvidas com a defesa da planta, mas não necessariamente utilizando o(s) mesmo(s)

mecanismo(s). Acredita-se que RIPs tipo 2 altamente tóxicas, como ricina e abrina, protegem as sementes contra organismos predadores da planta. No entanto, mesmo sendo a toxicidade oral da maioria das outras RIPs tipo 2 menor do que a da ricina e abrina, o acúmulo de grande quantidade destas outras proteínas menos tóxicas (em tecidos vegetais de reserva), provavelmente oferece alguma proteção contra invertebrados fitófagos e/ou animais herbívoros [65]. Já as RIP tipo 1 estão possivelmente envolvidas na defesa das plantas contra fungos e vírus fitopatogênicos, porém o mecanismo exato de como elas agem ainda não é bem compreendido. Isto explica o porquê de algumas RIPs tipo 1 conferirem proteção contra fungos e vírus quando expressas em plantas transgênicas [1]. Existe ainda a hipótese de que as RIPs desempenham um importante papel durante o processo de apoptose, já que são expressas em altos níveis em tecidos vegetais senescentes ou em estresse [66].

RIPs tipo 2, como ricina e abrina, possuem diferenças marcantes na citotoxicidade [67]. A ricina, por exemplo, causa 50% de morte celular em concentrações menores que 1 ng/ml, enquanto que outras RIPs tipo 2, não mostram nenhum efeito em 1 mg/ml [68]. Apesar das cadeias B de diversas RIPs tipo 2 compartilharem alta similaridade entre suas seqüências e virtualmente apresentarem estruturas tridimensionais idênticas, existem grandes diferenças na especificidade de ligação ao açúcar. Essas diferenças na atividade lectínica e especificidade, são extremamente importantes, pois o grau de toxicidade e a citotoxicidade das RIPs tipo 2 é (parcialmente) determinado pela ligação da cadeia B a um receptor glicosilado na superfície da célula [67].

### **I.3.6. Toxicidade.**

A toxicidade de extratos de plantas contendo RIPs tipo 2 tem sido extensivamente estudada por vários grupos de pesquisa de todo o mundo, desde o fim do século passado.

O primeiro trabalho citando os sinais e sintomas de envenenamento humano por RIP tipo 2 foi descrito por Balint [69]. Nesse trabalho ele descreveu patologias incluindo hemorragias no estômago e intestino, mudanças degenerativas no coração, fígado, rins, danos no baço e nódulos linfóides. Nenhum caso a respeito de envenenamento de humanos causados pelas as RIPs tipo 1 e tipo 3 foi relatado até hoje, porém sinais de toxicidade (febre e erupções cutâneas) foram identificados para algumas RIPs tipo 1 [53].



Muitos trabalhos foram desenvolvidos sobre a determinação dos efeitos tóxicos das RIPs tipo 2 em vários animais. Por exemplo, em coelhos, Christiansen *et al.* [70] observaram que a ricina reduzia a pressão sanguínea devido a uma vasodilatação causada pela diminuição da contração vascular e a um aumento do relaxamento vaso dependente do endotélio aórtico. Outros estudos, utilizando fígados de ratos intoxicados com ricina, mostraram mudanças precoces no citoplasma e no núcleo de células não parenquimais, as quais foram progressivamente danificadas até a necrose celular [71]. Esses estudos também demonstraram que as células não parenquimais são os primeiros alvos da ricina, isso é consistente com a captação preferencial da ricina por essas células e com elevada toxicidade da ricina para macrófagos. Griffiths *et al.* [72] foram os primeiros a descreverem o processo de apoptose em tecidos linfóides e em intestino de ratos intoxicados com ricina e abrina [53].

Licastro *et al.* [71] observaram pela primeira vez que a ricina induz a produção de fator de necrose tumoral e interleucinas em células mononucleares do sangue, com tempo e dose dependentes. Estudos detalhados citados por Battelli [53] sobre a toxicidade da cadeia A da ricina, administrada intravenosamente em doses não letais, foram realizados em ratos e macacos. Após nove dias da aplicação da proteína, foram observadas necroses no fígado, nos rins e lesões nas glândulas salivares e pancreáticas, linfocitose, piloereção, diminuição na taxa de hemácias, neutrófilos e plaquetas. Taxas de albumina, colesterol, triacilgliceróis, uréia e enzimas hepáticas também foram reduzidas. No entanto, trinta dias após o tratamento, muito desses parâmetros retornaram aos seus valores normais.

### **I.3.7 Atividades Biológicas.**

Durante muito tempo o interesse em se estudar RIPs era devido às suas potenciais aplicações médicas e terapêuticas, pois várias destas proteínas apresentavam uma alta toxicidade para células tumorais quando comparado a células normais, oferecendo uma oportunidade teórica e prática para o desenvolvimento de drogas anti-tumorais que selecionam como alvo células tumorais [73]. Hoje, pesquisas baseadas em dados experimentais revelam que as RIPs possuem diferentes atividades biológicas (tabela 1).

Estudos mais recentes mostraram que células tratadas com RIPs exibem as características morfológicas de apoptose, como por exemplo, a condensação e


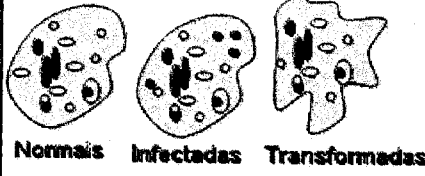


fragmentação do núcleo, densificação do citoplasma, quebra do DNA nuclear em vários fragmentos e alterações na membrana mitocondrial [53, 74]. Devido à atividade inibitória da tradução, as RIPs são alvos potencialmente importantes para o uso como agentes seletivos para morte celular.

As propriedades intrínsecas das RIPs podem ser exploradas por meio de um *screening* de suas toxicidades diferenciais em diversos tipos celulares, ou através de técnicas bioquímicas para procurar a melhor maneira de internalizá-las em uma célula específica, ou até mesmo conjugando as RIPs a vários carreadores para se obter a função dupla de reconhecimento e citotoxicidade. Uma abordagem interessante seria o uso de RIPs durante a quimioterapia através da conjugação desta com carreadores adequados. Com o freqüente desenvolvimento e uso de anticorpos monoclonais como “ferramentas” para a identificação de marcadores de superfície das células, pesquisas mostraram que esses anticorpos podem ser ligados a RIPs promovendo a elaboração de imunotoxinas capazes de direcionar a proteína tóxica diretamente para células específicas [75]

Além de anticorpos, outras moléculas carreadoras têm sido usadas com bastante freqüência visando a produção de novas drogas, moléculas como lectinas, hormônios, receptores, substâncias ligantes a receptores e antígenos [76]. O potencial uso das RIPs como imunotoxinas impulsionaram estudos de isolamento e caracterização de novas RIPs em diversas espécies de plantas, conseqüentemente, várias proteínas já foram usadas para a construção desses “mísseis biológicos” [77, 78]. Geralmente, a ligação entre o carreador e a toxina pode ser feita de três formas: (1) ligação química (*cross-linking*); (2) ligação indireta (imunotoxinas não covalentes); e (3) fusão gênica (imunotoxinas recombinantes). Porém a mais utilizada tem sido a ligação química do carreador à toxina, feita via ligação dissulfeto [75].

Diferentes imunotoxinas já foram preparadas tanto com RIPs tipo 1 como com tipo 2. Contudo, estudos revelaram que preparações de conjugados com RIPs tipo 2 apresentaram baixa especificidade, devido à capacidade da cadeia B (lectínica) de ligar-se, de forma inespecífica, a diversas células diferentes da célula alvo. Melhores resultados foram obtidos utilizando-se a cadeia A separada da cadeia B. Nesse caso, a especificidade do anticorpo proporcionou o reconhecimento direto da toxina pela a célula alvo.

**Tabela I** – Atividades relatadas para as RIPs (tipo 1, 2 e 3) em diferentes sistemas biológicos [1, 13, 53].

Sistemas Biológicos	Atividade	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3
<i>In vitro</i> 	RNA-N-glicosilase Contra ribossomo APG	Sim Sim Sim	Sim Sim Sim	Sim ?* ?
<i>In vivo (Células)</i>  Normais    Infectadas    Transformadas	Citotoxicidade Antiviral (animal e humana) Antitumoral (seletiva)	Não** Sim Não/?	Sim Sim Sim	Não/? ? ?
<i>In vivo (Animal)</i> 	Tóxica (via oral) Tóxica (intravenosa) Tóxica (intraperitoneal)	Não Não/? Não/?	Sim Sim Sim	? ? ?
<i>In planta</i> 	Antifúngica Antiviral Inseticida	Sim Sim Não/?	Sim Não/? Sim	? ? ?

\* Nenhum estudo foi realizado.

\*\* Nenhuma atividade foi detectada.

Não/? : Nenhuma atividade foi detectada, mas nem todas as proteínas foram testadas.

Além dessa, existem outras desvantagens nas preparações de conjugados utilizando RIPs do tipo 2. Esse problema, no entanto, tem sido facilmente solucionado com o uso da cadeia A recombinante, considerando que em breve, a molécula inteira imunotóxica possa ser produzida por técnicas de biologia molecular.

As preparações de imunotoxinas com RIPs tipo 1 parecem oferecer algumas vantagens a mais, pois sendo de cadeia única, proteínas desse tipo não precisam de processamento, o que contribui bastante para estabilidade da proteína e facilita a preparação do conjugado. Algumas imunotoxinas contendo RIP tipo 1, mostraram-se mais potentes

comparadas às imunotoxinas com o mesmo anticorpo, porém utilizando a cadeia A de uma RIP tipo 2 [75].

O primeiro conjugado usando uma RIP do tipo 1 foi preparado pela ligação da gelonina à proteína concanavalina A [79]. Uma das primeiras imunotoxinas resultante da ligação da cadeia A da ricina com o antígeno CD<sub>4</sub> mostrou-se bastante efetiva contra células infectadas com o vírus HIV [76, 80].

Além da atividade RNA *N*-glicosilase, tornou-se evidente que as RIPs também são capazes de catalisar a clivagem de vários substratos de ácidos nucleicos não ribossomais (RNA e DNA) sendo consideradas: polinucleotídeo adenosina glicosilase (APG) [47, 53]. Segundo Barbieri *et al.*, essa atividade APG já foi detectada em 52 RIPs [81].

Atualmente já existem atividades enzimáticas adicionais descritas para algumas RIPs [7, 82]. Guyot *et al.* [127] demonstraram que a ricina possui um sítio de atividade lipase que potencializa sua citotoxicidade. Day *et al.* [128] também verificaram que a cadeia A da ricina (RTA) é capaz de interagir e desestabilizar (*in vitro*) vesículas bicamadas de lipídios. Outras atividades enzimáticas também já foram descritas para as RIPs, como por exemplo a ribonuclease [129], DNase [130], quitinase [131], fosfatase [132] e atividade superóxido dismutase [7, 82].

Essas novas descobertas renovaram o interesse nas RIPs, pois o entendimento de novos mecanismos de ação dessas proteínas tem permitido investigações mais detalhadas sobre as suas propriedades e potenciais aplicações. Com isso, nos últimos anos esses estudos têm se concentrado principalmente na utilização das RIPs na construção de novas imunotoxinas, em ensaios de inibição da replicação do HIV, ensaios antimicrobianos (fungos e bactérias) e como bioinseticidas [1, 13, 75, 76].

#### **I.4. Pulchellina**

Em 1998, Ramos *et al.* [83] isolaram uma nova RIP (denominada pulchellina) de sementes de *Abrus pulchellus* por cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose 4B. A pulchellina é uma RIP tipo 2 heterodimérica composta de uma cadeia enzimática com atividade RNA *N*-glicosilase (de aproximadamente 29 kDa, designada cadeia A, ou PAC) ligada, através de uma ligação dissulfeto, a uma cadeia lectínica galactose/*N*-

acetilgalactosamina-ligante (de aproximadamente 31 kDa, a cadeia B ou PBC). A pulchellina apresenta uma alta toxicidade para mamífero ( $DL_{50} = 30 \mu\text{g/Kg}$  de peso corpóreo), comparável à relatada para a ricina e a abrina. A proteína também apresentou uma elevada toxicidade para o microcrustáceo *Artemia salina* ( $DL_{50} = 3,5 \mu\text{g/mL}$ ). A composição de aminoácidos da pulchellina mostrou que essa proteína, igualmente a outras RIPs do tipo 2, é rica em aminoácidos ácidos e também possuem uma certa quantidade de aminoácidos sulfurados, como é o caso das RIPs de sementes de *Abrus precatorius* [38, 84].

É importante ressaltar que até o momento, apenas a espécie *Abrus precatorius* do gênero *Abrus* havia sido estudada quanto à presença de RIPs, sendo esses estudos iniciados em 1884 por Warden e Waddel (Warden & Weddel *apud* Kocourek, 1986<sup>VI</sup>). Como foi citado anteriormente, as sementes de *Abrus precatorius* possuem uma potente RIP tipo 2 denominada abrina. Apesar de atualmente existirem diversos estudos bioquímicos, biológicos, estruturais e mesmo de clonagem envolvendo a abrina, ainda existem questões cruciais pendentes com relação às atividades enzimáticas, às atividades biológicas *ex planta* e *in planta*, às funções e questões relacionadas com a evolução molecular dessa proteína. Várias RIPs com propriedades semelhantes a da abrina ainda estão por ser descobertas e estudadas, assim como a elucidação das estruturas tridimensionais dessas proteínas.

Por ser uma proteína isolada de uma espécie também do gênero *Abrus* e por possuir características (biológicas e bioquímicas) semelhantes às da abrina, a pulchellina possui um grande potencial no que se refere aos estudos utilizando técnicas de biologia molecular e outros recursos biotecnológicos, objetivando a busca de novas atividades e características. Além disso, o estudo sobre as diferentes atividades biológicas da pulchellina e de suas cadeias (tóxica e lectínica) recombinantes, pode ser considerando o segundo na história científica das RIPs envolvendo outra espécie do gênero *Abrus*.

---

<sup>VI</sup> Warden, C.J.H; Waddel, L.A. The nature of poison with observations on its chemical and physiological properties. Bengal Secretarial Press, 1884 *apud* Kocourek, J. Historical background. In: Liener, I.J.; Sharon, N. & Goldstein, I.J., eds The lectins. Properties, functions and applications in biology and medicine. London, Academic Press, 3-32, 1986.

### I.5. Espécie *Abrus pulchellus*.

O gênero *Abrus* é composto por aproximadamente 15 espécies, sendo a maioria de regiões tropicais e subtropicais da Ásia, África e da América do Sul [126]. No Brasil, existem relatos apenas das espécies *Abrus precatorius* e *Abrus pulchellus*. A espécie *Abrus pulchellus* (Figura 3) pode ser encontrada principalmente na região Nordeste. Essa espécie é uma trepadeira perene, cujos cipós auxiliam na suporte da planta. Os ramos geralmente são finos, pouco lenhosos, alcançando em média de 2 a 4 m de comprimento. As folhas são compostas contendo de 5 a 20 pares de folíolos dispostos opostamente ao longo da raque, cujo comprimento pode variar de 5 a 10 cm. As flores são pequenas, organizadas em cachos e apresentam uma cor violeta clara. O ovário tem uma placentação marginal. O fruto é uma vargem de 3 a 5 cm de comprimento, deiscente, contendo de 3 a 6 sementes por fruto. Diferente da espécie *Abrus precatorius*, as sementes de *Abrus pulchellus* possuem uma cor marrom clara alternada com marrom escuro, apresentando em média 0,5 cm de comprimento.



**Figura 3** – *Abrus pulchellus* subespécie *tenuiflorus*. Planta inteira, à esquerda. À direita: acima frutos imaturos de diferentes idades; abaixo detalhe da flor.

## **II. OBJETIVO**

---

#### IV. OBJETIVO

O objetivo principal desse trabalho foi desenvolver um protocolo para produção recombinante e caracterização da cadeia tóxica da pulchellina (uma potente toxina RIP tipo 2 de sementes de *Abrus pulchellus*), visando à obtenção de um produto homogêneo e ativo.



### **III. ESTRATÉGIA**

---

#### IV. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

Para alcançar o objetivo dessa primeira etapa do trabalho, utilizou-se a seguinte estratégia experimental:

- 1) Extração do DNA genômico de folhas de *Abrus pulchellus*.
- 2) Desenho e construção de *primers*.
- 3) Ensaaios de amplificação (PCR).
- 4) Ensaaios de sequenciamento.
- 5) Clonagem e expressão da cadeia A (tóxica) da pulchellina em *Escherichia coli*.
- 6) Purificação da cadeia A recombinante da pulchellina (rPAC).
- 7) Caracterização bioquímica e espectroscópica da rPAC.
- 8) Associação *in vitro* da rPAC com a cadeia B (lectina) recombinante da pulchellina.
- 9) Teste de atividade *in vitro* e *in vivo* da pulchellina e de seus produtos heterólogos.

## **IV. MATERIAIS**

---

## IV. MATERIAIS

### 1. Material vegetal

O material vegetal foi obtido de uma planta adulta da espécie *Abrus pulchellus* subespécie *tenuiflorus* pertencente à família Fabaceae, cultivada no nosso laboratório.

### 2. Material animal

Foram utilizados camundongos Swiss, machos e saudáveis, pesando em média entre 25 e 30 g, provenientes Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), mantidos em repouso por no mínimo 24 horas em caixas de plásticos forradas com serragem e de livre acesso à ração e água.

As linhagens de *Escherichia coli* usadas foram a DH5 $\alpha$  e a AD202.

### 3. Outros materiais

Acilamida (Sigma); N,N'-metileno bis-acilamida (Sigma); albumina sérica bovina (Sigma); TEMED (Sigma); Comassie Brilliant Blue R-250 (Sigma); nitrato de prata (Merk) marcadores moleculares (Promega), enzimas de restrição: *NotI* e *BamHI* (Gibco); outras enzimas: *Deep Vent* DNA polimerase (Biolabs), ligase (Promega), lisozima (USB), Fator Xa (Novagen); IPTG (Sigma),  $\beta$ -mercaptoetanol, dodecil sulfato de sódio (Sigma); NBT/BCIP (Roche); Glutathione S-transferase (Sigma); resinas: Sepharose 4B e D-Gal (Amersham Pharmacia), *Glutathione Sepharose 4 Fast Flow* (Amersham Pharmacia), C18 e de troca iônica MonoQ HR 5/5 (Amersham Pharmacia). Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

## **V. MÉTODOS**

---

## V. MÉTODOS

### 1. Clonagem genômica

#### 1.1. Extração do DNA genômico

Folhas verdes de *A. pulchellus* foram colocadas num almofariz e cobertas com nitrogênio líquido até congelarem completamente. Em seguida foram maceradas até obterem consistência de pó e transferidas para um tubo estéril. A extração do DNA genômico das folhas foi realizada com o auxílio do *kit* comercial *FloraClean*<sup>TM</sup> (Bio 101), usado eficientemente para isolar o DNA genômico de alto peso molecular a partir de uma ampla variedade de espécies e tecidos vegetais. Esse *kit* permite que o DNA seja isolado a partir do núcleo purificado, eliminando desta forma, outros componentes citoplasmáticos que permanecem junto ao DNA.

De acordo com as instruções do fabricante, 10 ml de *Nuclear Buffer* foram adicionados a 1,5 g do pó de tecido vegetal e homogeneizado em banho de gelo. O homogenato foi filtrado e a porção líquida coletada foi centrifugada a 2000 *xg* por 20 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado (3X) com 5 ml de *Nuclear buffer*. Para cada lavagem foi feita uma centrifugação a 2000 *xg* por 20 min a 4 °C. O precipitado obtido pela centrifugação foi ressuspensão em 1,5 ml de *Nuclear suspension solution* e 100 µl de *Nuclear lysis solution* foram adicionados a ressuspensão, que em seguida, foi incubada 30 min a 55 °C. Para degradar as proteínas celulares, 25 µl de *Protease mix* foram adicionados a ressuspensão que foi novamente incubada por 3 h, a 55 °C. Após esse período de incubação, 500 µl de *Salt-out Mixture* foram adicionados a ressuspensão que foi incubada 15 min em banho de gelo e centrifugada a 15700 *xg* por 15 min. O DNA presente no sobrenadante foi precipitado com etanol 100 %, ressuspensão em água (*DNase-free*) e quantificado.

#### 1.2. *Primers* degenerados

Os oligonucleotídeos degenerados (*primers*) utilizados na amplificação genômica do gene da pulchelina, foram desenhados com base no gene da preproabrina (MEDLINE 91266957) de *Abrus precatorius*, procurando minimizar a ocorrência de degeneração na

porção 3' dos mesmos. A sequência dos *primers* foi inferida a partir do alinhamento de seqüências de: preproabrina, cadeia A da abrina, ricina-d, ricina-e e aglutinina de *Ricinus communis* [85]. As seqüências dos oligonucleotídeos degenerados escolhidas foram:

1) *primer* abrin1: 5' ACTGAAGGTGCCACTTCACAAAGCTAYAARCARTT 3'

2) *primer* abrin3: 5' GGTAAACACTTCCCGTTGGACCTDATNGT 3'

### 1.3. PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Os *primers* selecionados foram utilizados nas reações de amplificação (PCR). A mistura de reação utilizada foi a seguinte:

Mistura de Reação	Volume (µl)	Concentração Final
DNA genômico de <i>Abrus pulchellus</i>	5	1 µg
10 mM dNTP's	1	200 µM
<i>primer</i> Abrin 1	1	100 pmol
<i>primer</i> Abrin 3	1	100 pmol
tampão <i>Taq</i> (com MgCl <sub>2</sub> )	5	1X
<i>Taq</i> polimerase (5U/µl)	1,5	2,5 Unidade
água estéril	36,5	
Volume final de reação	50	

O procedimento de amplificação foi realizado em um termociclador PTC-100 (MJ Research Inc.) sob as seguintes condições:

1 ciclo inicial de desnaturação de: 94 °C por 5 mim.

30 ciclos de: 94 °C por 1 mim (desnaturação);

45 °C por 1 mim;

50 °C por 1 mim (anelamento);

55 °C por 1 mim;

72 °C por 1 mim (extensão);

1 ciclo final de extensão de: 72 °C por 7 mim.

A visualização dos fragmentos amplificados foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TAE (1X), coradas com brometo de etídio e visualizadas

sob luz UV, conforme descrito na literatura [86]. O padrão utilizado foi 1 Kb DNA *Ladder* (GibcoBRL)

O produto de amplificação utilizando os *primers* abrin 1 e 3, foi clonado no vetor pGEM-T *easy* (apêndice 1) para posterior seqüenciamento.

#### 1.4. Clonagem do produto amplificado

Para a clonagem foram utilizados 1 µl (~50ng) do DNA purificado, 1 µl pGEM-T *easy* (~50 ng), 2 µl de T4 DNA ligase (6U), 10 µl do tampão da enzima (2X) e água q.s.p 20 µl. A reação foi incubada a 4 °C por 12 h. Em seguida, a mistura de ligação foi utilizada para transformar (por choque térmico) células de *E. coli* DH5-α competentes por CaCl<sub>2</sub>. A extração de DNA plasmidial (*miniprep*) dos transformantes foi realizada por lise alcalina, segundo Ausubel [87]. Foram utilizados 5 µl de DNA purificado para digestão com *EcoRI* e certificação dos clones positivos.

#### 1.5. Seqüenciamento

Os clones positivos foram seqüenciados num sequenciador automático ABI-Prism 377 (Perkin Elmer) seguindo o protocolo adaptado para o equipamento. A seqüência completa da cadeia A, *linker* e parte do N-terminal da cadeia B foi realizada. A região correspondente à cadeia A seqüenciada foi traduzida e submetida a um alinhamento utilizando o banco de dados *BLAST* (NCBI).

## 2. Clonagem e Expressão da Cadeia A da Pulchellina

### 2.1. Construção de novos *primers*

Novos *primers*, desta vez não degenerados, foram sintetizados (baseados nas seqüências obtidas) para amplificar o fragmento gênico codificador apenas da cadeia A da pulchellina (PAC). Os *primers* utilizados foram:

*Primer pulcA/BamHI* (sense)

5'- CGGGATCCCAGGAGGACCGGCCATTGAATTTACTACTG - 3'

*BamHI*



Primer pulcA/NotI (reverse)

5'-ATAGTTTAGCGGCCGCTCAATTTGGCGGATTGCAGAC - 3'

NotI stop códon

Os novos *primers* selecionados foram utilizados numa nova reação de amplificação (PCR). A mistura de reação utilizada foi a seguinte:

Mistura de Reação	Volume ( $\mu$ l)	Concentração Final
DNA genômico de <i>Abrus pulchellus</i>	5	625 ng
10 mM dNTP's	1	200 $\mu$ M
primer pulcA/BamHI	1	100 pmol
primer pulcA/NotI	1	100 pmol
tampão Taq (com MgCl <sub>2</sub> )	5	1X
Deep Vent DNA polimerase (5U/ $\mu$ l)	0,5	2,5 Unidade
água estéril	36,5	
Volume final de reação	50	

O processo de amplificação foi realizado sob as seguintes condições:

1 ciclo inicial de desnaturação de: 96 °C por 5 mim.

5 ciclos de: 94 °C por 1 mim;  
57 °C por 1 mim;  
72 °C por 1 mim;

25 ciclos de: 94 °C por 1 mim;  
60 °C por 1,5 mim;  
72 °C por 1 mim;

1 ciclo final de extensão de: 72 °C por 10 mim.

A visualização do fragmento amplificado foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TAE (1X), corado com brometo de etídio sob luz UV, conforme descrito na literatura [86]. O padrão utilizado foi 1 Kb DNA *Ladder* (GibcoBRL).

## 2.2. Clonagem

O produto de amplificação foi recuperado do gel de agarose usando o *kit* de purificação *Gene Clean II* (Bio 101). Este produto foi dessalinizado em micro-coluna de Sephacryl S-200 (*Amersham Pharmacia*) e digerido com 10 unidades de *NotI* (Promega) e 10 unidades de *BamHI* (Gibco). Após a digestão, foi feita uma nova purificação (*Gene Clean II*) em gel de agarose 0,8 %, TAE (1X), e quantificação do produto para a posterior subclonagem no vetor pGEX 5X-1 (apêndice 2).

O vetor pGEX codifica a glutationa-S-transferase de *Schistosoma japonicum* (29 kDa) como proteína carreadora, permitindo a purificação da proteína de fusão por cromatografia de afinidade, em matriz com glutationa imobilizada. 200 ng do vetor pGEX 5X-1 foram também digerido com 10 unidades de *NotI* e de *BamHI*. O vetor digerido foi purificado em gel (*Gene Clean II*) e usado na mistura de ligação. Nesta mistura foram utilizados 150 ng do inserto amplificado, purificado e digerido, 200 ng do vetor pGEX 5X-1, tampão da ligase (1X), 5 unidades da enzima T4 DNA ligase (3U) (Promega). A mistura de ligação foi incubada por 1 h a 16 °C e mantida *overnight* a 4 °C.

As células de *E. coli* DH5- $\alpha$  (genótipo: F-,  $\phi$ 80*dlacZ* $\Delta$ M15, *endA1*, *recA1*, *hsdR17* ( $r_k^-$ ,  $m_k^+$ ), *supE44*, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*,  $\Delta$ (*lacZYA-argF*)U169,  $\lambda^-$ ) foram transformadas (por choque térmico) com o produto da ligação do vetor pGEX 5X-1 com inserto correspondente à cadeia A (esse plasmídeo foi denominado pGEX-rPAC). Dos transformantes obtidos, 3 colônias foram selecionadas. As colônias foram usadas para extração de DNA plasmidial utilizando o *kit* de extração e purificação de DNA plasmidial *GFX Micro plasmid*, objetivando analisar a presença do inserto e testar a expressão da cadeia A da pulchelina.

## 2.4. Expressão em *E. coli* DH5- $\alpha$

Os transformantes contendo o inserto foram puncionados e utilizados em um pré-inóculo de 5 ml de meio LB contendo ampicilina (200  $\mu$ g/ml), o qual foi incubado a 37 °C, *overnight*, sob agitação (250 rpm). Esse pré-inóculo foi diluído em 500 ml de meio LB suplementado com ampicilina. As células foram crescidas a 37 °C, sob agitação de 250 rpm até atingir uma  $DO_{600nm} = 0.5 - 0.6$  (cerca de 4 h). Uma vez atingida tal densidade, correspondente ao início da fase exponencial de crescimento, a expressão da proteína

recombinante foi induzida com 0,4 mM de IPTG por 16 h, a temperatura de 20 °C, visando aumentar a proporção de proteína solúvel, mantendo a agitação como antes. Alíquotas de 200 µl da cultura foram coletadas antes e após a indução, a cada 2 h. Essas amostras foram centrifugadas a 15700 *xg* por 1 min em microcentrífuga, descartando os sobrenadantes e ressuspensando os precipitados com 30 µl de água *MilliQ*. Foram adicionados 15 µl de tampão de amostra contendo β-mercaptoetanol e essas amostras foram fervidas por 5 min. O resultado da expressão (proteínas totais nas frações solúvel e insolúvel do lisado celular) foi analisado em SDS-PAGE 15 %, segundo Laemmli [88]. Os marcadores de massa molecular (Sigma) utilizados foram: BSA (66 kDa), OVA (45 kDa), AC (30 kDa), IT (20,1 kDa), CITc (12, 4 kDa). Os géis foram corados com *Comassie Brilliant Blue R-250*.

### 2.5. Expressão em *E.coli* AD202

Em função da baixa expressão que vinha sendo obtida, optou-se por realizar uma nova transformação (choque térmico) da *E. coli*, usando a linhagem AD202 (genótipo: *Δlac, araD, thiaA, rpsL, relA, ompT, kan*) com pGEX-rPAC, por ser mais adequada à expressão. A expressão seguiu o mesmo protocolo acima descrito para DH5-α. A única diferença foi que além da ampicilina (200 µg/ml), a canamicina (50 µg/ml) foi adicionada ao meio LB.

## 3. Purificação da cadeia A recombinante da pulchellina (rPAC)

### 3.1. Lise celular e análise da solubilidade

As células provenientes de 1 l de cultura, foram ressuspensas em 8-10 ml de tampão PBS (1X) contendo 8-10 mg de lisozima e 1 % de Triton X-100, e incubadas 30 min em banho de gelo, e posteriormente foram lisadas por sonicação com auxílio de um sonicador *Sonic Dismembrator – Fisher Scientific*. Esse procedimento foi realizado durante 30 segundos, usando intervalos regulares de um minuto entre cada sonicação, com repouso em banho de gelo, num total de 6 ciclos. A amostra sonicada (10 ml) foi centrifugada a 20000 *xg* por 10 min, 4 °C. Alíquotas do precipitado e sobrenadante foram separadas para eletroforese.

### 3.2. Purificação em resina de afinidade

O sobrenadante obtido após o processo de lise, foi filtrado e aplicado a uma coluna contendo 2 ml da resina *Glutathione Sepharose 4 Fast Flow* (Amersham Pharmacia) visando à purificação da proteína de fusão (GST + rPAC). A *Glutathione Sepharose* é designada para a purificação da proteína de fusão Glutathione S-Transferase (GST) produzida utilizando os vetores de expressão da série pGEX. A resina empacotada foi previamente equilibrada com 10 volumes de PBS (1X). Essa etapa de purificação foi realizada a 4 °C, cuidando para que as frações coletadas fossem imediatamente transferidas para banho de gelo. O sobrenadante foi incubado junto à resina por 15 min a 4 °C. A coluna foi posteriormente lavada com 10 volumes de PBS (1X) e todo o volume eluído foi coletado. Em seguida aplicou-se 5 volumes de tampão de eluição (Tris-HCl 50 mM pH 8, contendo Glutathione reduzida 10 mM), incubando-o junto à resina por mais 15 min. O material eluído contendo a proteína de fusão foi coletado em frações de 0,5 ml.

O resultado da purificação da proteína de fusão (GST + rPAC) foi acompanhado por eletroforese em SDS-PAGE 15 %, sob condições desnaturantes.

### 3.3. Clivagem da proteína de fusão com Fator Xa

O Fator Xa consiste de duas subunidades, unidas por ligações dissulfeto que reconhece especificamente a seqüência Ile-Glu-Gly-Arg e cliva na porção C-terminal antes da arginina [89].

As frações eluídas contendo a proteína de fusão foram desalinizadas e concentradas utilizando-se Centriprep-10 (Amicon), sob centrifugação, sendo “lavadas” com tampão de clivagem para Fator Xa (Tris-HCl 50 mM pH 7,5; NaCl 150 mM; CaCl<sub>2</sub> 1 mM). Cerca de 1 ml de proteína (1mg/ml) foi utilizado para a clivagem com Fator Xa. O resultado do teste de clivagem da proteína de fusão (GST + rPAC) foi acompanhado por eletroforese em SDS-PAGE 15 % sob condições desnaturantes.

A concentração de proteína foi obtida pelo coeficiente de extinção teórico, onde se estabeleceu uma relação entre a densidade óptica a 280 nm e concentração protéica (1 de D.O. = 1 mg de proteína/ml), sendo essa relação confirmada pelo método colorimétrico de Bradford [90].

Após a clivagem, a amostra foi dessalinizada em Centricon-10 (Amicon), sendo “lavada” com tampão Tris-HCl 20mM, pH 8.0 com 10 mM. O volume de 1 ml da proteína (com concentração de  $\approx 2,2$  mg/ml) foi aplicado na coluna Mono-Q HR 5/5.

### 3.4. Purificação por cromatografia de troca iônica.

Após os testes de clivagem, a purificação da cadeia A recombinante foi realizada usando uma coluna de troca iônica (Mono-Q HR 5/5) acoplada a um sistema automatizado ÄKTA (Amersham - Pharmacia) e monitorada pela leitura de absorbância em 280 nm pelo detector de UV. A coluna com volume de 1 ml foi previamente equilibrada com tampão A (Tris-HCl 20 mM, pH 8,0 contendo 10 mM de NaCl) e submetida a um gradiente salino com o tampão B (Tris-HCl 20 mM, pH 8,0 contendo 500 mM de NaCl) sob um fluxo de 1 ml/min com pressão máxima de 5 MPa, a 25 °C. A purificação da cadeia A recombinante (rPAC) foi monitorada por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes.

### 4. Análise da seqüência N-terminal da rPAC

A rPAC foi submetida à SDS-PAGE 15 % na presença de  $\beta$ -mercaptoetanol. Em seguida, o gel foi cuidadosamente manuseado (com luvas), sendo primeiramente imerso na solução de transferência juntamente com os papéis de filtro (*Whatman*, 3MM). A membrana de PVDF foi colocada primeiramente em metanol 100 % por 3 min, depois em água por alguns segundos e por último em solução de transferência. Foi feito um “sanduíche” com a membrana, os papéis de filtro e o gel, evitando a formação de bolhas. O pacote foi prensado, colocado na cuba de transferência (Gibco-BRL) contendo tampão de transferência, e submetido a uma potência de 150 volts por cerca de 2 h.

Após a corrida, a membrana foi corada com solução de amido-*black* por 5 min, seguido de descoloração com água, ácido acético e metanol (45: 10: 45). A banda de interesse foi recortada e encaminhada para o seqüenciamento de aminoácidos da porção amino-terminal. Esta etapa foi realizada na Universidade Federal de São Carlos, sob a supervisão da Dra. Heloisa Sobreiro S. Araújo, num seqüenciador automatizado *SHIMADZU* PPSQ-10, conforme as condições recomendadas pelo fabricante.

### 5. Produção de anticorpos e ensaio de imunodeteção da rPAC.

A produção de anticorpos policlonais anti-pulchellina foi feita através da sensibilização primária de coelhos albinos adultos por via parenteral (intramuscular) com a pulchellina (5 ng/Kg de peso corpóreo do animal) dissolvida em 1 ml de uma mistura contendo NaCl 0,15 M e adjuvante de Freund's (1:1). Após 15 dias foi administrado o primeiro reforço da amostra seguindo o procedimento realizado anteriormente. Após mais 15 dias, foi administrado o segundo reforço nas mesmas condições e passado 5 dias a primeira sangria. Depois do processo de coagulação, o soro foi separado, centrifugado e armazenado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Reforços e sangrias adicionais foram realizados para a obtenção da quantidade desejada de soro com título apropriado de anticorpos. A técnica de *Western blot* foi utilizada para a imunodeteção e conseqüente confirmação da banda correspondente a cadeia A da pulchellina. As amostras (pulchellina nativa e rPAC) foram aplicadas no gel SDS-PAGE 15 %. Após a eletroforese, as proteínas presentes no gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Em seguida, a membrana foi colocada para reagir com o anticorpo primário (com título de 1:5000). A reatividade foi detectada pelo anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina, e, para o processo de coloração, foram utilizados os agentes cromogênicos *NBT* e *BCIP* (BioRad). Para o procedimento de transferência foi utilizado o equipamento *TransBlot SemiDry* (BioRad).

### 6. Atividade RNA *N*-glicosilase (*in vitro*) da rPAC

O isolamento dos ribossomos de levedura (*Pichia pastoris*) foi realizado conforme a metodologia descrita por Smith *et al.* [91]. Resumidamente, 5 ml de um pré-inóculo (contendo a levedura) em meio YPD foi incubado a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , *overnight*, sob agitação (250 rpm). Esse pré-inóculo foi diluído em 500 ml de meio YPD suplementado com sacarose (2 %), adenina e uracila (0,2 %). As células foram crescidas a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , sob agitação de 250 rpm até atingir uma  $D_{600\text{nm}} = 1$  (cerca de 12 h). Uma vez atingida tal densidade, a cultura foi centrifugada 5000 xg por 10 min,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . O precipitado obtido foi lavado (3X) com água estéril RNase *free* e ressuspenso em 4 ml do tampão de lise (Tris-HCl 200 mM, pH 9,0, contendo KCl 200 mM, sacarose 200 mM,  $\text{MgCl}_2$  25 mM, EGTA 25 mM e  $\beta$ -mercaptoetanol 0,01%). Ao tubo contendo as células foi adicionado igual volume de “pérolas de vidro” para romper a parede celular através de agitação vigorosa por 10 min. A

ressuspensão foi centrifugada a 1250 xg por 5 min, 4 °C. O sobrenadante foi coletado e novamente centrifugado a 20000 xg por 20 min, 4 °C. Mais uma vez o sobrenadante foi coletado e submetido a uma ultracentrifugação de 100000 xg por 1 h, 4 °C. Após esse processo, o sobrenadante foi descartado e o precipitado contendo os ribossomos foi ressuspensão em 100 µl do tampão Endo (Tris-HCl 25 mM, pH 7,5 com KCl 25 mM e MgCl<sub>2</sub> 5 mM) e estocado (-80°C) em alíquotas com 20 µg/µl de concentração.

Para o ensaio de atividade RNA *N*-glicosilase, 20 µg de ribossomos foram incubados a 25 °C por 1 h com diferentes quantidades de rPAC e pulchellina nativa (0,1; 1; 5 e 10 ng de cada) no tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8,0 contendo NaCl 100 mM, num volume final de 20 µl. As reações foram interrompidas pela a adição de SDS 1%. O RNA ribossomal foi obtido através da extração com fenol-clorofórmio e precipitado pela a adição de 0,1 volume de NaOAc 2 M pH 6,0 e 2,5 volumes de etanol 100 %. As misturas de reações foram congeladas e os precipitados de rRNA foram obtidos por centrifugação a 13000 xg por 30 min a 4 °C. Os precipitados foram lavados com etanol 70 % e incubados 20 min num dessecador a vácuo para secarem. 10 µg de cada rRNA foi tratado (por 4 min, a 60 °C) com 20 µl de anilina-acética 1 M pH 4,5. Nos controles negativos foram usados água no lugar da anilina. As reações foram interrompidas pela a adição de 0,1 volume de NH<sub>4</sub>OAc 2 M, 2,5 volumes de etanol 100 % e centrifugadas a 15000 xg por 1 h a 4 °C. Os precipitados obtidos foram ressuspensos em 15 µl de TPE (Tris 3,6 mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 mM; EDTA 0,2 mM) contendo formamida 60%. A visualização dos fragmentos de rRNA depurinados foi realizada através de eletroforese em gel desnaturante de agarose-formamida, utilizando brometo de etídio e visualizados sob luz UV do transluminador.

### **7. Associação *in vitro* das cadeias recombinantes da pulchellina**

Com o objetivo de promover a ligação *in vitro* das cadeias A (rPAC) e B (rPBC) recombinantes da pulchellina, um protocolo de associação foi montado baseado na metodologia descrita por Eck *et al.* [92]. A cadeia B recombinante da pulchellina foi produzida de acordo com metodologia descrita por Goto *et al.* [93].

Para promover a associação da rPAC com a rPBC, as duas cadeias recombinantes (0,5 mg de cada) foram adicionadas ao tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 contendo NaCl 100 mM. Para a formação das pontes dissulfeto intercadeias, a mistura foi incubada na

presença de um sistema oxido/redução (utilizando cisteína e cistina, 5:1). O processo de associação foi acompanhado por eletroforese em SDS-PAGE 15 % sob condições não redutoras. Os géis foram revelados com nitrato de prata seguindo a metodologia descrita por Blum *et al.* [94].

## 8. Caracterização espectroscópica

### 8.1 Espectroscopia de dicroísmo circular (CD)

As medidas de CD foram realizadas em um espectropolarímetro Jasco J715, no intervalo de 195 to 250 nm, usando 16 varreduras. As medidas foram feitas com amostra da pulchellina nativa, rPAC, rPBC e do heterodímero recombinante (rPAB) com concentração de ~ 0,3 mg/ml, em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8 contendo NaCl 100 mM, utilizando cubetas cilíndricas de quartzo de 1 mm de caminho óptico. Em todos os casos, eles foram obtidos em elipticidade ( $\theta$ ) e, em alguns casos, convenientemente transformados em elipticidade molar ( $[\theta]$ ), utilizando a relação:

$$[\theta] = \frac{100 \cdot 10^{-6} N}{Cl} \cdot \theta$$

em que  $N$  é 115 (massa molar média de um resíduo),  $C$  é a concentração da proteína em  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  e  $l$  é o caminho óptico em cm.

A estabilidade da pulchellina foi estudada em função do pH e da temperatura, 10 a 80 °C. A predição quantitativa da estrutura secundária foi realizada pela desconvolução dos espectros de CD usando o programa *SELCON 3*, desenvolvido por Sreemana *et al.* [95].

### 8.2. Espectroscopia de fluorescência

As medidas de emissão da fluorescência foram feitas a 25 °C em um espectrofluorímetro Hitachi modelo FP-777. As amostras foram excitadas em 295 nm e a emissão foi monitorada no intervalo de 300 a 450 nm, usando cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico. A concentração final da rPAC usada nos ensaios foi 67  $\mu\text{M}$  e a absorbância foi sempre menor que 0,1. Após a coleta, foi feita a subtração do espectro do tampão afim de excluir a interferência do espalhamento Raman. Em todas as medidas, foram usados filtros ópticos de 295 nm no compartimento de emissão do equipamento.



Medidas também foram realizadas com a rPAC na presença de diferentes concentrações de adenina (0,16 a 8 mM).

### **9. Teste de toxicidade**

Para os testes de atividade tóxica, diferentes doses (15, 30, 45, 50 and 60 µg/Kg de peso corpóreo) da pulchellina nativa, rPAC, rPBC e do heterodímero recombinante (rPAB) foram injetadas na cavidade intraperitoneal de camundongos sendo observadas as sintomatologias e o tempo de sobrevivência. A mortalidade foi expressa em termos de DL<sub>50</sub>, sendo esta definida como a quantidade de proteína capaz de matar 50 % dos animais testados. Foram usados grupos de seis animais machos adultos, entre 20 – 25 g de peso. Após a injeção de cada dose, os efeitos tóxicos foram observados até um período de 72 h.

## **VI. RESULTADOS E DISCUSSÕES**

## VI. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 1. Amplificação e clonagem genômica da cadeia A da pulchellina

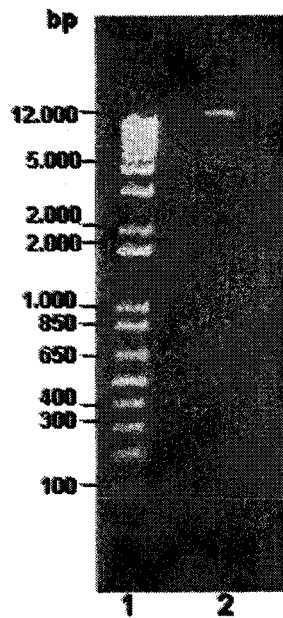
A pulchellina, uma RIP tipo 2 isolada de sementes de *A. pulchellus*, é uma potente toxina de origem vegetal que apresenta características bioquímicas e biológicas similares a abrina e ricina [83]. A clonagem do gene que codifica a cadeia tóxica da pulchellina poderá fornecer importantes informações sobre a estrutura e função dessa proteína, e dar uma fundamentação sólida para as suas possíveis aplicações.

Nos últimos anos, clones de algumas RIPs tipo 2 têm sido obtidos em diferentes grupos de pesquisa e os estudos desenvolvidos indicam que alguns desses clones, como por exemplo da ricina e o da abrina (RIPs obtidas de *Abrus precatorius* e *Ricinus communis*, respectivamente) parecem pertencer a uma família multigene [85, 96]. Esses estudos também demonstram que os genes dessas RIPs não possuem íntrons. A ausência de íntrons já foi relatada para outras RIPs tipo 2, como a PMRIP [97], a viscumina [92], e a volkensina [98]. Baseados na suposição de que situação similar deveria ocorrer com a pulchellina e na proximidade filogenética do *A. pulchellus* com o *A. precatorius*, foi elaborada uma estratégia inicial de clonagem da cadeia tóxica (cadeia A) da pulchellina.

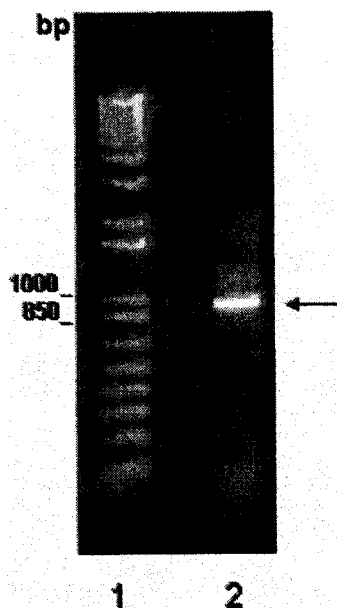
Estudos preliminares de clonagem da cadeia A da pulchellina foram realizados em nosso laboratório [99]. No entanto, problemas relacionados às etapas de expressão e purificação levaram a elaboração de novas estratégias visando a obtenção da cadeia A recombinante da pulchellina.

Como foi citado na introdução desse trabalho, as RIPs tipo 2 são geralmente encontradas em maior abundância nos órgãos de reserva, como as sementes [1,13]. Porém estudos já demonstraram que as proteínas dessa classe podem estar distribuídas em diferentes partes da planta [13]. Baseados nesse fato e em função da disponibilidade de material, optou-se pela extração do DNA genômico a partir de folhas frescas de *A. pulchellus*, usando o kit comercial *FloraClean*<sup>TM</sup>. O DNA obtido da extração apresentou uma boa qualidade (Figura 4), e um rendimento total de 800 ng de DNA para cada 1 g de tecido vegetal.

Utilizando os oligonucleotídeos degenerados desenhados com base na seqüência do gene da preproabrina (MEDLINE 91266957) foi possível a amplificação do fragmento correspondente à cadeia tóxica (cadeia A) e parte da cadeia ligante (cadeia B) da pulchellina. O tamanho esperado do produto de amplificação utilizando os *primers* abrin 1 e abrin 3 (para a cadeia A, *linker* e a porção N-terminal da cadeia B) deveria ser de aproximadamente 970 bp, considerando a proximidade taxonômica entre a pulchellina e abrina. O produto da amplificação obtido por PCR usando esse conjunto de iniciadores, teve o seu tamanho concordante com o previsto (Figura 5). Esse produto foi seqüenciado e a região correspondente à cadeia A seqüenciada foi traduzida e submetida a uma busca por identidade no programa *BLAST* [100]. O resultado mostrou uma alta identidade (84%) com a cadeia A da abrina-c de *A. precatorius*, confirmando o êxito na amplificação da seqüência-alvo desejada.



**Figura 4 – DNA genômico extraído de folhas frescas de *A. pulchellus* em gel de agarose 0,8%, TAE [1X], corado com brometo de etídio e visualizado em transluminador UV. Colunas: 1) padrão de 1kb (Gibco) e 2) DNA genômico.**



**Figura 5** – Produto da reação de amplificação em gel de agarose 0,8%, TAE [1X], corado com brometo de etídio e visualizado em transluminador UV. Colunas: 1) Padrão de 1kb e 2) Produto da amplificação utilizando os *primers* abrin 1 e abrin 3.

Informações sobre a região da extremidade 5' da cadeia A da pulchellina obtidas anteriormente em nosso laboratório através da técnica RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*), indicaram uma elevada identidade seqüencial (91%) com gene da preproabrina de *A. precatorius* [99, 101]. Essa técnica possibilita a amplificação de qualquer extremidade 5' ou 3' de um cDNA específico partindo-se de uma população de mRNA que pode estar contida no RNA total. Portanto, essas informações auxiliaram bastante na predição da seqüência da pulchellina.

Os resultados obtidos com o RACE 5' e com a nova clonagem genômica também indicaram a presença de uma seqüência líder N-terminal contendo 34 aminoácidos altamente conservados, tal como ocorre para a abrina [85] (Figura 6). Possivelmente essa região N-terminal contém a seqüência sinal responsável pelo direcionamento do polipeptídeo precursor para o retículo endoplasmático, onde será transportado aos corpos protéicos das sementes. Segundo Hartley *et al.* [47], a maioria da RIPs parece possuir essa seqüência sinal N-terminal que direciona a proteína para entrar no sistema endomembrana. Apesar das endomembranas servirem como uma barreira para o acesso das RIPs aos

ribossomos, essas proteínas podem ser transportadas de forma bilateral, ou seja, indo e voltando através do sistema endomembrana. Sendo assim, como uma forma de auto-proteção da célula, estratégias adicionais são adotadas durante o processo de síntese das RIPs para prevenir o subsequente transporte retrógrado dessas proteínas recém-sintetizadas ao citossol. Uma dessas estratégias é a síntese das RIPs como preproteínas inativas [7].

A grande similaridade entre a cadeia A da preproabrina e da prepropulchellina, assim como a presença de um *linker* e do peptídeo sinal das seqüências analisadas, são fortes evidências de que a pulchellina, assim como a abrina, também é sintetizada na forma de uma preproteína.

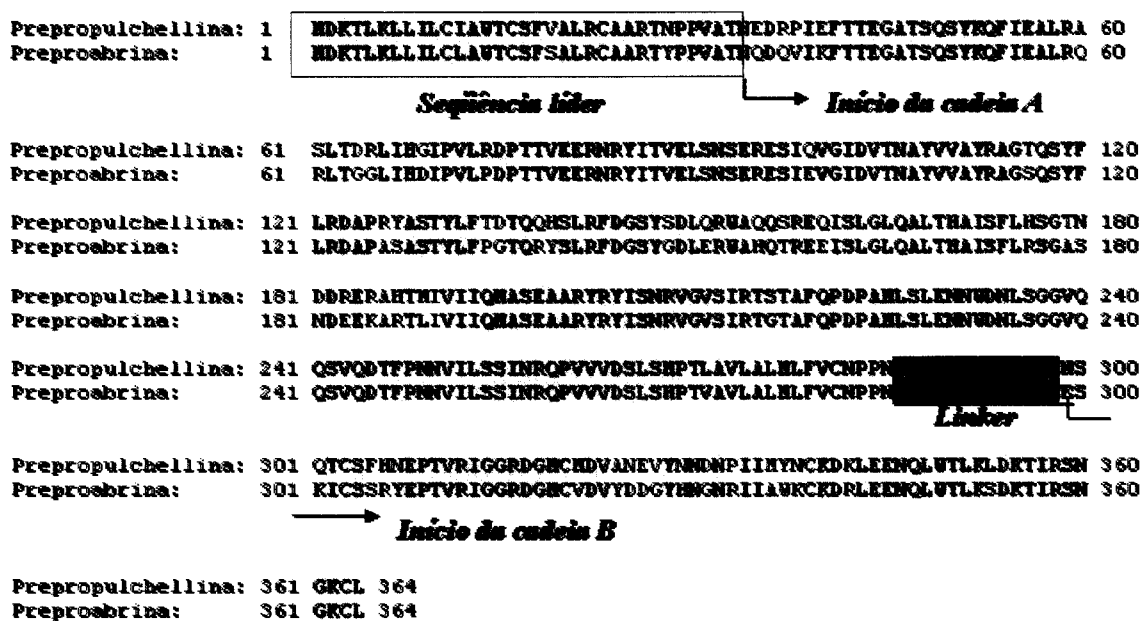
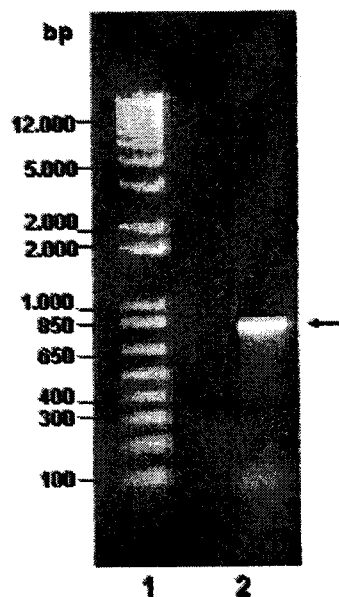


Figura 6 – Alinhamento entre as seqüências da preproabrina e prepropulchellina analisadas através do *CLUSTALX multiple sequence alignment*. Seqüência líder (quadro vermelho); Cadeia A; Seqüência *Linker* (em azul) e início da cadeia B. Em cinza são os resíduos conservados nas duas seqüências.

## 2. Expressão, purificação e caracterização da cadeia A recombinante da pulchellina

Com base na sequência completa da cadeia A da pulchellina dois novos *primers* específicos foram desenhados para evitar problemas de degeneração: o *primer* *pucA/BamHI*, contendo um sítio de restrição para *BamHI*; e o *primer* *pucA/Not I* contendo um sítio de restrição para enzima *Not I*. O fragmento gênico correspondente à cadeia A madura da pulchellina foi amplificado por PCR usando os novos *primers*, gerando um produto de aproximadamente 850 bp (Figura 7).



**Figura 7** – Produto da reação de amplificação em gel de agarose 0,8%, TAE [1X], corado com brometo de etídio e visualizado em transluminador UV. Colunas: 1) padrão de 1kb (Gibco) e 2) Produto da amplificação utilizando os *primers* *pucA/NotI* e *pucA/BamHI*.

O produto obtido da reação de PCR foi sequenciado e o sequenciamento confirmou a clonagem do fragmento que codifica uma cadeia polipeptídica de 251 resíduos, correspondente a cadeia A da pulchellina. O peso molecular foi estimado em 29,2 kDa, conivente com peso obtido para a cadeia A da pulchellina nativa [83]. Também foram estimados um ponto isoelétrico teórico de 5,5 e um coeficiente de extinção técnico de

24180 ( $DO_{280nm}$  1mg/ml = 0,856)<sup>1</sup>. Esses resultados foram semelhantes aos encontrados para outras RIPs tipo 2 [30, 98]. A seqüência da cadeia A da pulchellina foi depositada no *GenBank* e recebeu o número de acesso AY781337.

Até o momento mais de 50 RIPs tipo 1 e aproximadamente 15 do tipo 2 foram clonadas e/ou seqüenciadas [102]. Uma análise comparativa entre as seqüências de várias RIPs tipo 2 revelou que existe uma maior similaridade seqüencial entre as cadeias A do que entre as cadeias B dessas RIPs [102]. Este fato levantou a hipótese de que essas diferenças no grau de conservação podem explicar o motivo pelo qual algumas atividades são conservadas na maioria das RIPs e outras não [7, 30], como por exemplo à atividade SOD [7, 82].

O alinhamento múltiplo da seqüência de aminoácidos predita para a PAC (*pulchellin A chain*) através do programa *CLUSTALX* [103] mostrou que ela apresenta uma identidade seqüencial de 86 % com a cadeia A da abrina-c, 78 % com a da abrina-a e somente 38 % com a da ricina (RTA). Além da alta identidade seqüencial da PAC com as cadeias A das abrininas, pôde-se observar tanto na PAC como nas outras proteínas comparadas, a presença de uma cisteína conservada na porção C-terminal das seqüências (Figura 8). Segundo Tahirov [38], essa cisteína conservada na abrina permite a formação da ligação dissulfeto com outra cisteína também conservada na porção N-terminal da cadeia B (cadeia lectínica) promovendo assim, a ligação intercadeias. Esse mesmo fato também foi relatado para a ricina e volkensina [98].

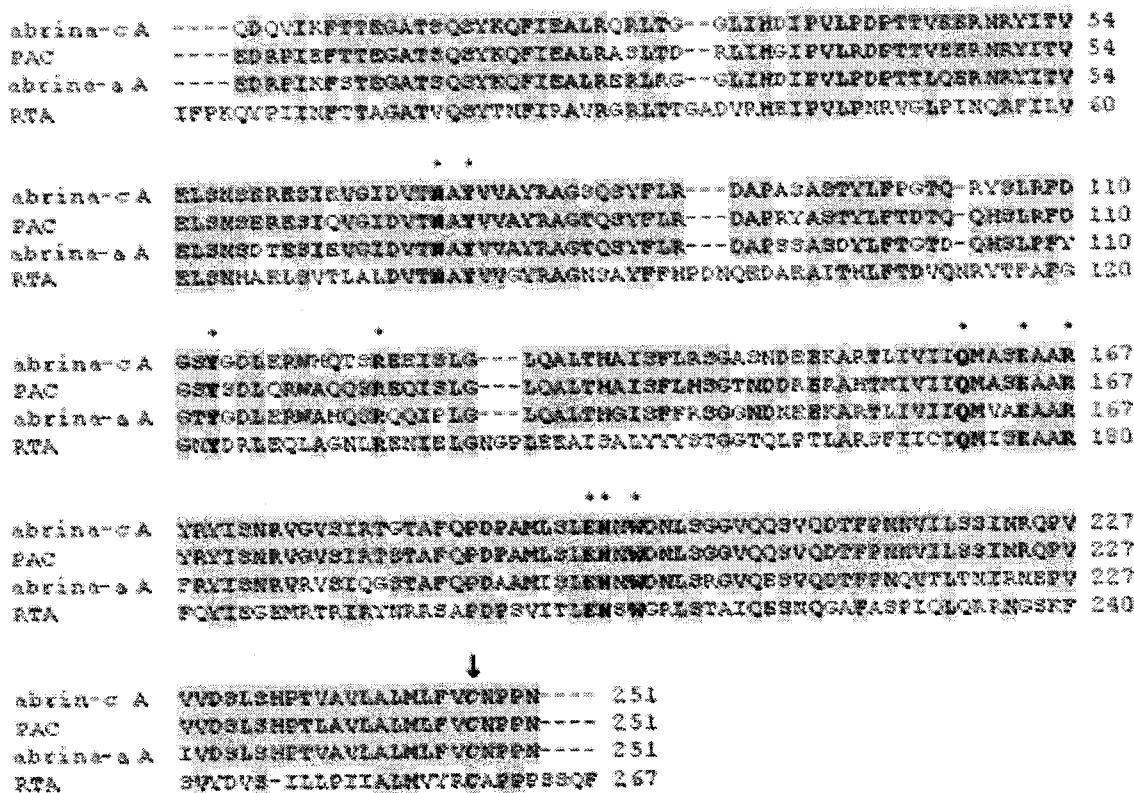
Sabe-se hoje que os sítios ativos RNA *N*-glicosilase da abrina-a, abrina-c, e ricina são formados por 5 resíduos invariantes (Tyr74, Tyr113, Glu164, Arg167, Trp198 para abrina-a e abrin-c, e Tyr115, Tyr158, Glu212, Arg215, Trp246 para a ricina) e outros 5 resíduos conservados (Asn72, Arg124, Gln160, Glu195, Asn196 para abrin-a e abrina-c, e Asn78, Arg134, Gln172, Glu208, Asn209 para a ricina) [34, 40]. Recentemente, estudos cristalográficos comparando as estruturas da ricina, tricosantina, PAP, momordina e abrina mostraram que esses resíduos permanecem constantes para todas essas proteínas [10, 35]. De acordo com o resultado do alinhamento (Figura 8), todos esses resíduos envolvidos no sítio de atividade RNA *N*-glicosilase da abrina-a, abrina-c e ricina são totalmente

---

<sup>1</sup> Valores obtidos através do ExPASy software (<http://ca.expasy.org/tools/protparam.html>)



conservados na seqüência da PAC [101]. Essa observação sugere que possivelmente a PAC venha apresentar atividades similares a essas proteínas.



**Figura 8 - Estrutura primária da cadeia A da pulchellina (PAC) alinhada as seqüências das cadeias A da abrina-c, abrina-a e ricina (RTA) [101].** Resíduos conservados em fundo cinza, resíduos não conservados em fundo branco, resíduos envolvidos no sítio de atividade RNA N-glicosilase em negritos e indicados com \*. Resíduo de cisteína (indicado com ↓) possivelmente envolvido na ligação dissulfeto intercadeias.

O fragmento de DNA que codifica a cadeia A da pulchellina foi inserido no vetor pGEX 5X-1 para produzir a cadeia A recombinante fusionada a glutathione S-transferase (GST). Essa construção da cadeia A recombinante da pulchellina (rPAC) no plasmídio de expressão pGEX 5X-1, foi denominada de pGEX-rPAC. A escolha desse sistema foi baseada nos trabalhos publicados com a abrina, que através do referido sistema pôde ser

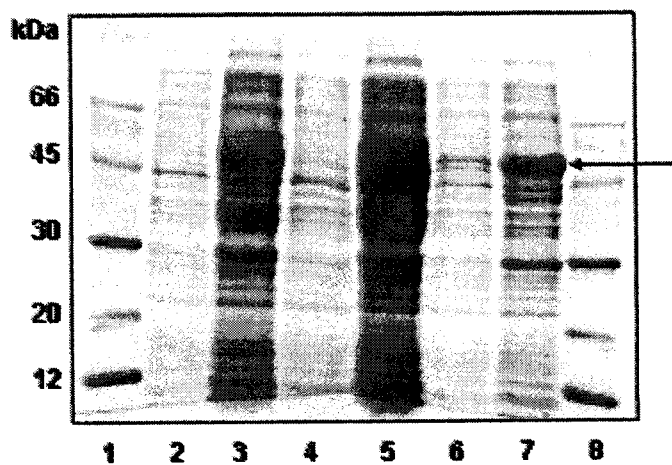
expressa como proteína de fusão na forma solúvel e com um rendimento satisfatório [104, 105], bem como nos resultados preliminares obtidos em nosso laboratório [99].

As bactérias de *E. coli* DH5 $\alpha$  foram transformadas por choque térmico com o pGEX-rPAC. O teste de expressão da rPAC foi realizado na presença de IPTG por 16 horas a temperatura de 20 °C. A expressão foi realizada nessa temperatura para promover a maior produção de proteína solúvel, fato bastante comum quando a expressão é realizada a 37 °C, conforme já foi relatado para outras proteínas heterólogas.

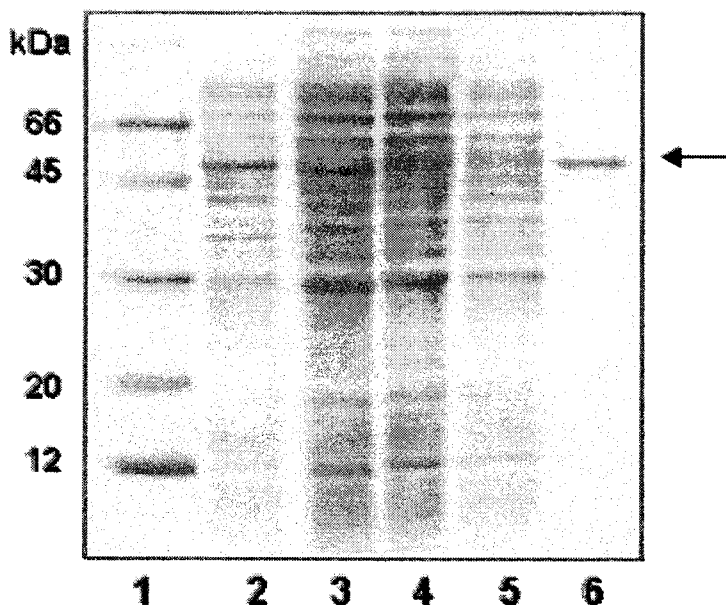
Quando analisados por eletroforese, os clones escolhidos aleatoriamente apresentaram uma única banda protéica de massa molecular de aproximadamente 60 kDa (correspondendo a massa molecular da rPAC, somada ao sítio de clivagem para o Fator Xa e a massa da GST), concordante com a prevista pela seqüência, confirmando assim, o sucesso da expressão da rPAC (Figura 9).

Apesar da expressão inicial da proteína de fusão ter sido ensaiada em *E. coli* DH5 $\alpha$ , optou-se em usar a linhagem de *E. coli* AD202, pois foi observado que a expressão da proteína na forma solúvel foi relativamente superior quando essa linhagem de expressão foi usada. Em virtude disso a linhagem AD202 passou a ser usada para os demais ensaios de expressão e purificação.

A proteína de fusão expressa em AD202 foi facilmente separada das demais proteínas celulares através de cromatografia de afinidade em resina de *Glutathione Sepharose-4 Fast flow* [101]. Primeiramente as células foram fragilizadas através da ação da lisozima, em seguida lisadas por sonicação em tampão de ressuspensão PBS (1X) contendo 1% de Triton X-100, que é um detergente suave que dirige a maioria dos componentes celulares (incluindo a proteína de fusão) para a fração solúvel, facilitando o processo de purificação. A proteína de fusão foi facilmente eluída da coluna com glutatona reduzida (Figura 10). O rendimento obtido usando linhagem AD202 foi de aproximadamente 9 mg de proteína de fusão por litro de cultura bacteriana.



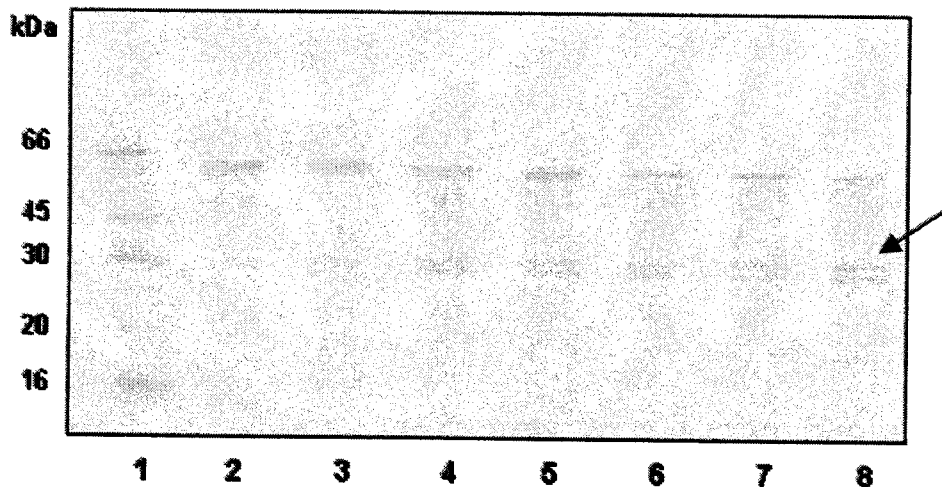
**Figura 9 –** Teste de expressão da rPAC em *E. coli* analisado em SDS-PAGE 15%, corado com *Coomassie Blue R250*. Colunas: 1 e 8) Padrão de massa molecular; 2 e 4) Expressão na linhagem AD202 contendo o vetor pGEX-rPAC não induzido; 6) Expressão na linhagem DH5α contendo o vetor pGEX-rPAC não induzido; 3 e 5) Expressão na linhagem AD202 contendo o vetor pGEX-rPAC induzido com IPTG 0,4 mM; 7) Expressão na linhagem DH5α contendo o vetor pGEX-rPAC induzido com IPTG 0,4 mM. A banda de expressão referente a rPAC + GST, está indicada pela a seta.



**Figura 10 – Análise em SDS-PAGE 15 % da purificação da proteína de fusão (rPAC + GST) através da cromatografia de afinidade em resina de *Glutathione Sepharose-4 Fast flow* [101]. Colunas: 1) Padrão de massa molecular; 2 e 3) Culturas de *E. coli* AD202 pGEX-rPAC não induzida e induzida com 0,4 mM de IPTG, respectivamente; 4) Fração solúvel da lise celular obtida após o processo de sonicação; 5) Fração insolúvel; 6) Fração correspondente a proteína de fusão eluída da coluna com glutatona reduzida.**

Em seguida a rPAC foi dissociada da GST pela ação do Fator Xa. Geralmente, essa clivagem pode ser completa seguindo um tempo de incubação de 8 a 12 h [89]. Sendo assim, com a finalidade de otimizar o processo de clivagem, uma série de diferentes incubações foi realizada. Num primeiro experimento, a proteína de fusão foi incubada por 12 h com o Fator Xa diretamente na resina de afinidade dentro da própria coluna. Como os resultados não foram satisfatórios, partiu-se para clivagem através da adição do Fator Xa diretamente nas frações eluídas, seguida de incubação sob tempos diferenciados (2, 4, 6, 8, 12 e 14 h), sempre a 16 °C. Pode-se notar na figura 11 que a partir de 2 horas de incubação, ocorreu uma sutil separação da rPAC da GST, igualmente à observada na clivagem na resina de afinidade. Com o decorrer do tempo de incubação, houve uma redução de intensidade da banda protéica ( $\approx$  60 kDa) referente à proteína de fusão, decorrente do aumento da eficiência do processo de digestão. Mesmo não ocorrendo uma clivagem

completa com 14 horas de incubação, houve um significativo aumento da clivagem em relação aos outros tempos de incubação.



**Figura 11 – Análise da clivagem da proteína de fusão (rPAC + GST) com Fator Xa em SDS-PAGE 15%. Colunas: 1) Padrão de massa molecular; 2) Clivagem da proteína de fusão na própria resina de afinidade por 12 h; 3 a 8) Clivagem da proteína de fusão purificada e incubada diretamente com o Fator Xa por 2, 4, 6, 8, 12 e 14 horas, respectivamente. A seta indica a banda protéica referente à rPAC.**

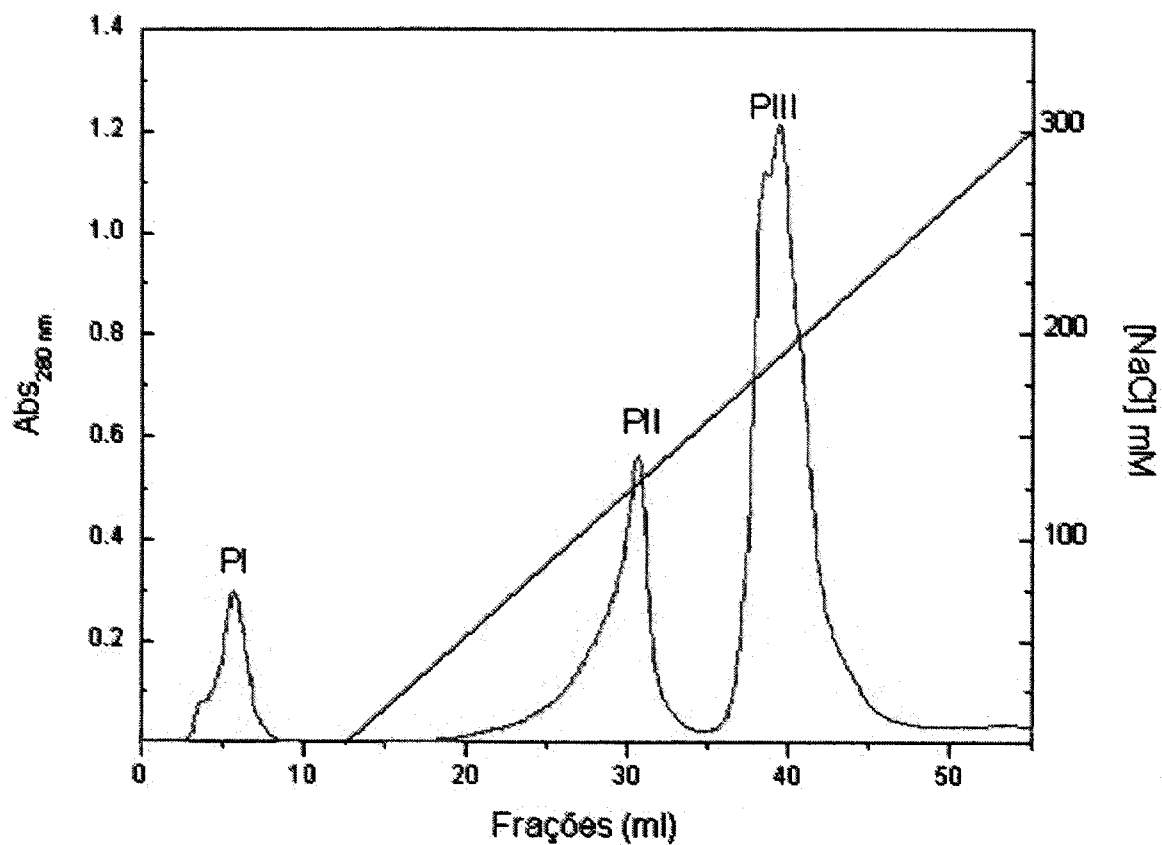
Após esses testes, um novo experimento foi realizado, dessa vez, incubando a proteína de fusão por 16, 18 e 20 horas a 16 °C. Após 16 horas (Figura 13), a clivagem da proteína foi total, sendo esse tempo considerado o ideal para os ensaios de clivagem da rPAC [101]. Após a digestão, o produto da clivagem foi dialisado contra o tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0 com 10 mM de NaCl e acondicionado na geladeira ( $\approx 4$  °C) para posterior uso.

A etapa seguinte do processo de obtenção da rPAC foi à purificação através de cromatografia de troca iônica em coluna de MonoQ RH 5/5 acoplada a um sistema de purificação AKTA (Amersham-Pharmacia). O volume de 1 ml da fração dialisada (contendo  $\approx 2,2$  mg de proteína) proveniente da etapa de clivagem com o Fator Xa foi aplicado na coluna previamente equilibrada com Tris-HCl 20 mM pH 8,0. Inicialmente foi

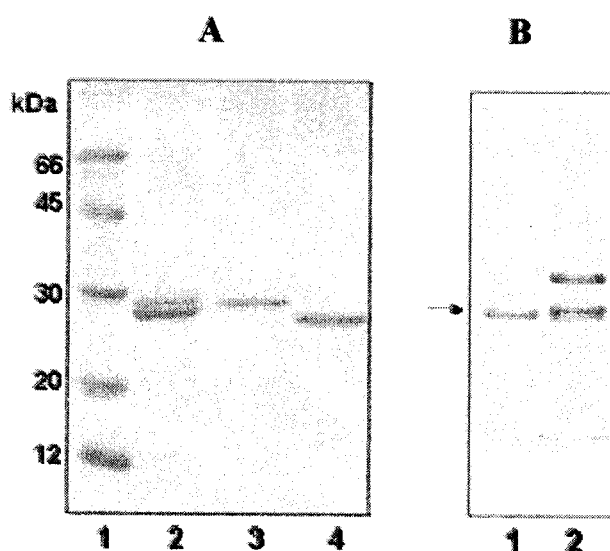
utilizado um gradiente contínuo de NaCl (0 a 500 mM) para verificar o perfil cromatográfico da amostra. De acordo com a figura 12, o gradiente de NaCl utilizado mostrou-se bastante eficiente, proporcionando a separação de 3 picos cromatográficos (denominados PI, PII e PIII). As frações correspondentes ao PI (3-8 ml), PII (20-33 ml) e PIII (36-45 ml) foram coletadas separadamente, sendo que uma alíquota de 40 µl de cada um dos picos foi submetida a ensaios eletroforéticos e de imunodeteção para identificar a fração correspondente a rPAC.

A análise em SDS-PAGE das alíquotas coletadas de cada um dos três picos (PI, PII e PIII) obtidos na MonoQ revelou que tanto o PI (não mostrado) como o PII (Figura 13-A) apresentou uma única banda protéica homogênea com massa molecular aparente de 29 kDa, similar à obtida para a cadeia A da pulchellina nativa [83]. A alíquota correspondente ao PIII também apresentou somente uma banda protéica (Figura 13-A), porém com uma massa molecular aparente um pouco menor, concordante com a esperada para GST.

Para a inteira certificação sobre qual dos picos era o referente à rPAC, um ensaio de imunodeteção foi realizado usando-se a técnica de *Western blot* conforme foi descrito no item Métodos. Pôde-se observar pelo resultado, que os anticorpos anti-pulchellina nativa foram capazes de reconhecer e interagir fortemente com as bandas protéicas referentes ao PI (não mostrado) e PII (Figura 13-B), porém não reconheceram a banda equivalente ao PIII. Esse resultado sugeriu que tanto o PI e o PII correspondem a rPAC, possivelmente sob duas diferentes conformações, uma vez que mesmo sendo reconhecidas pelo anticorpo anti-pulchellina, elas apresentam diferenças quanto ao perfil cromatográfico na coluna de troca iônica.



**Figura 12 – Cromatografia de troca iônica em coluna MonoQ HR 5/5 do produto da clivagem com o Fator Xa. A coluna foi equilibrada e inicialmente eluída com 12 ml de tampão A (Tris-HCl 20 mM pH 8,0); fluxo de 1 ml/min, a temperatura ambiente. Foram coletadas frações de 0,5 ml. O material retido na coluna foi eluído através do gradiente (—) de 0 a 500 mM (em tampão A). A eluição foi monitorada por absorbância em 280 nm. Os picos 1, 2 e 3 são representados por PI, PII e PIII, respectivamente.**



**Figura 13 – Análise da purificação da rPAC através de SDS-PAGE e *Western blot* [101]. (A) SDS-PAGE 15%: 1) Padrão de massa molecular; 2) Clivagem completa da proteína de fusão (rPAC+GST) incubada diretamente com o Fator Xa por 16 h; 3) Alíquota do PII eluído da MonoQ, correspondente a rPAC; 4) Alíquota do PIII eluído da MonoQ, referente à proteína GST. (B) *Western blot*: 1) rPAC e 2) Pulchellina nativa.**

### 3. Características estruturais da rPAC

#### 3.1. Estrutura primária

Os aminoácidos da porção N-terminal da pulchellina nativa e da rPAC foram determinados através de um seqüenciador automatizado *SHIMADZU PPSQ-10* conforme foi descrito nos Métodos. As seqüências obtidas foram comparadas entre si e com seqüências de outras RIPs. A semelhança desta porção N-terminal (cuja seqüência obtida foi EDRPI) entre a rPAC, a pulchellina nativa e a abrina-c foi total, porém quando a rPAC foi comparada com as seqüências N-terminais da abrina-c e da cadeia A da ricina, observou-se apenas 40 e 20 % de similaridade, respectivamente.

#### 3.2. Estrutura secundária estimada por dicroísmo circular

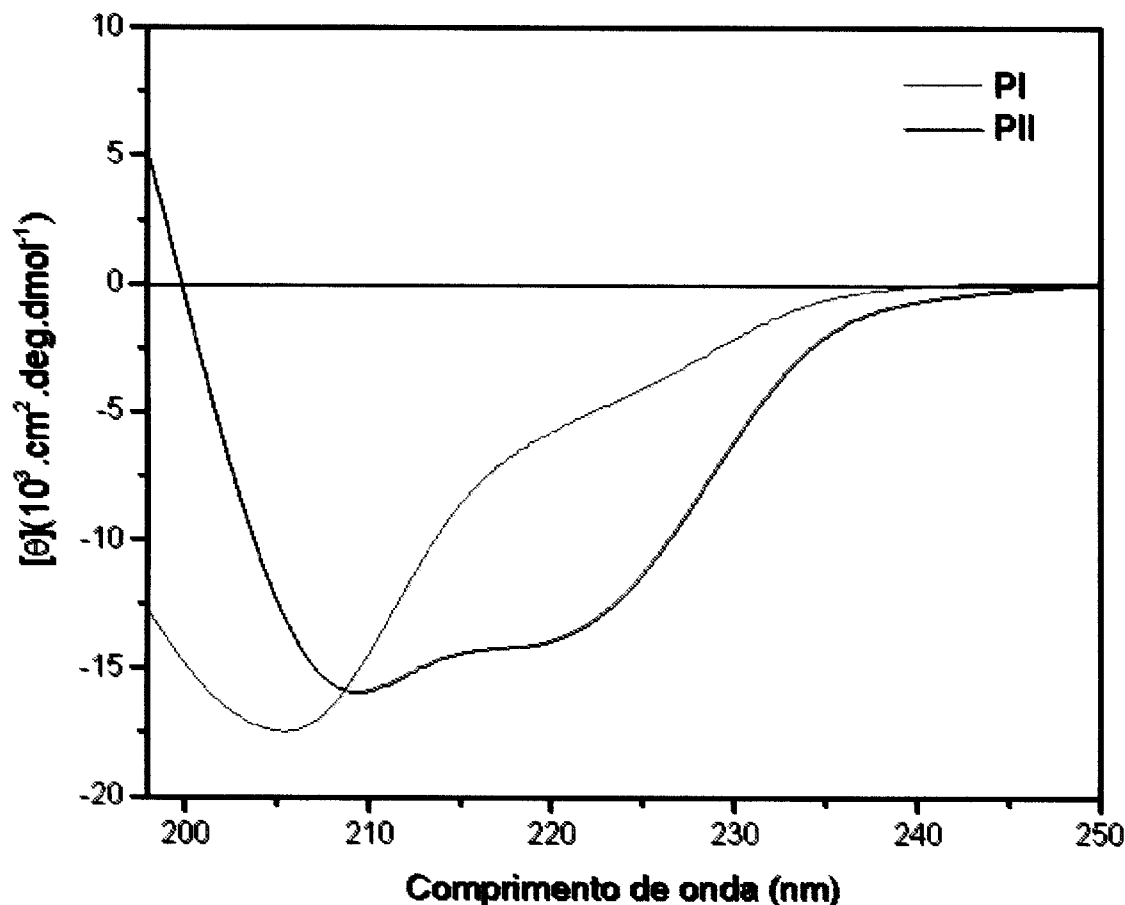
As evidências da possível existência de duas populações de rPAC, levaram a utilização da espectroscopia de dicroísmo circular (CD) para avaliar a estrutura secundária



e o padrão de enovelamento dessas duas populações. Por ser uma ferramenta bastante utilizada para estudos estruturais de proteínas ou de polipeptídeos em solução, a técnica de CD, devido à sua capacidade de discriminar o tipo de estrutura secundária, é muito útil no monitoramento de alterações conformacionais das proteínas em função de diversos fatores, como por exemplo pH e temperatura [106]. Os espectros de dicroísmo circular das frações do PI e PII são mostrados na figura 14. O espectro do PI apresentou somente uma acentuada banda negativa em 205 nm, característico do padrão de estrutura desordenada. Segundo Kelly e Price [106], dependendo do polipeptídeo e das condições utilizadas o espectro de estruturas desordenadas também pode apresentar uma banda positiva de menor intensidade em torno de 218 nm. Diferentemente, o espectro referente ao PII apresentou duas bandas negativas de amplitudes aproximadas com mínimos em 208 e 222 nm. Este espectro concorda com a presença de estruturas do tipo hélice  $\alpha$ , que geralmente apresenta uma banda positiva acentuada, com um máximo em 191-193 nm, e duas bandas negativas de amplitudes aproximadamente iguais, com mínimos em 208-210 e 222 nm [106, 107]. Análises do espectro de CD do PII realizadas com os programas *CONTIN* e *SELCON 3* confirmaram a predominância de estruturas do tipo hélice  $\alpha$ , em concordância com as estruturas das cadeias A das abrinas-a e -c [35, 38], proteínas com as quais compartilha alta identidade em termos de estrutura primária [101].

Por apresentar um padrão de estrutura secundária definida e coerente com o obtido para proteínas similares, como a abrina [35, 38], os demais experimentos passaram a ser realizados com as frações do PII, referente à cadeia A recombinante da pulchellina (rPAC).

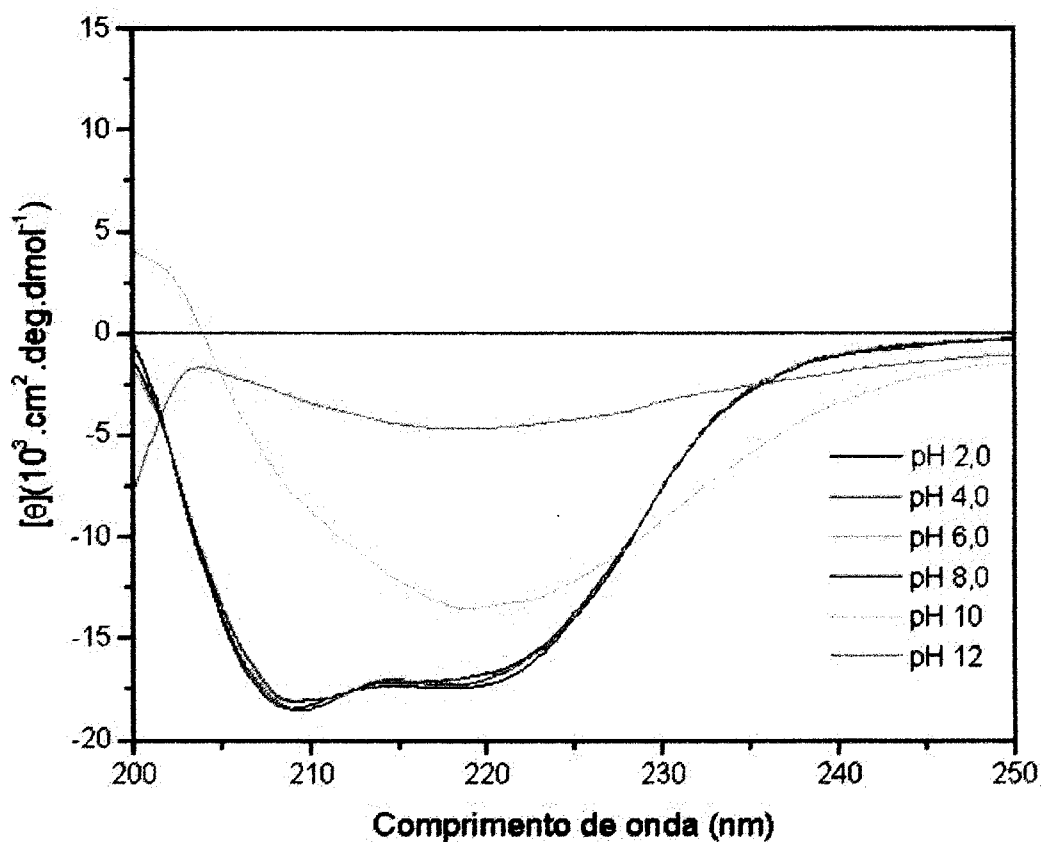
As modificações estruturais na rPAC em função do pH foram investigadas e monitoradas através de técnica de dicroísmo circular (CD). Uma mistura tamponante de glicina/acetato/fosfato/borato foi utilizada para a variação do pH de 2,0 a 12. O uso desta mistura foi preferido ao invés de cada componente separado para evitar possíveis interferências de um ou outro sal nos experimentos. Para cada valor de pH utilizou-se uma concentração da rPAC de 0,3 mg/ml. A figura 15 mostra os espectros de CD da rPAC nos diferentes valores de pH testados. Alterações detectáveis na estrutura secundária da rPAC só foram observadas nos valores de pH 10 e 12. Este resultado sugere fortemente que a estrutura secundária da rPAC não sofre modificações significantes em valores de pH ácido ou básico, exceto em pH extremamente básico.



**Figura 14** – Espectros de dicroísmo circular das amostras referentes aos picos PI (—) e PII (—) obtidos da cromatografia de troca iônica em coluna MonoQ. As medidas foram realizadas com uma solução protéica de aproximadamente 0,3 mg/ml em tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0 contendo NaCl 100 mM. Os espectros foram obtidos variando o comprimento de onda entre 195 a 250 nm e registrados como uma média de 32 varreduras, a temperatura ambiente (25 °C), utilizando cubeta cilíndrica de caminho óptico de 1 mm.

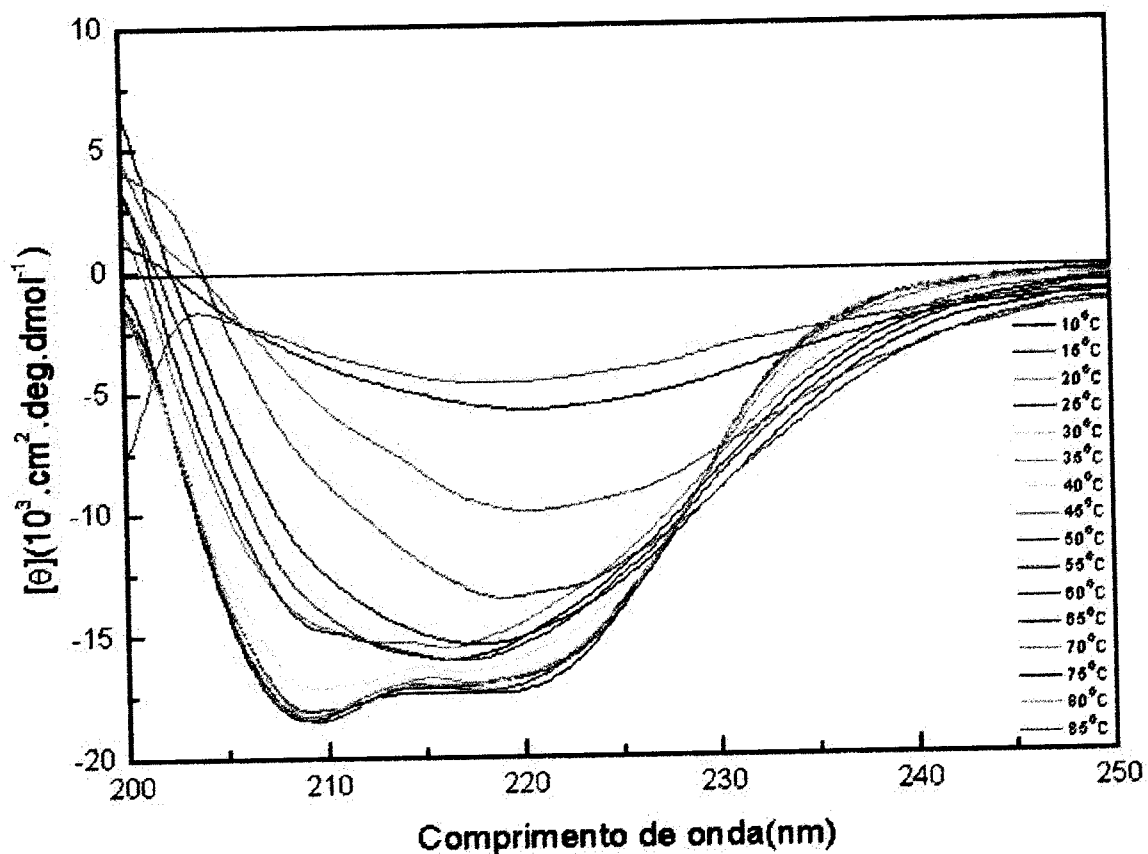
Segundo Sandvig e Olsnes [108], os endossomos são sítios mais prováveis de transferência transmembrana da cadeia A das RIPs para o citosol, sendo que os endossomos geralmente apresentam um pH ácido ( $\approx 5$ ). Isso pode ser um dos motivos pelo qual as RIPs mantêm suas estruturas secundárias estáveis em valores relativamente baixos de pH. Como exemplo, Bushueva e Tonevitsky [109] demonstraram que a atividade catalítica da cadeia A da ricina não foi afetada pela variação de pH numa faixa de 3 a 8. É importante ressaltar

que estudos de CD, também com a ricina, indicaram que o conteúdo de elementos do tipo hélice- $\alpha$  na proteína aumentou após a penetração na membrana, implicando que algumas estruturas desordenadas presentes na proteína nativa eram convertidas a estruturas ordenadas durante o processo, sendo as interações hidrofóbicas as responsáveis pela estabilização conformacional da molécula dentro da membrana [110].

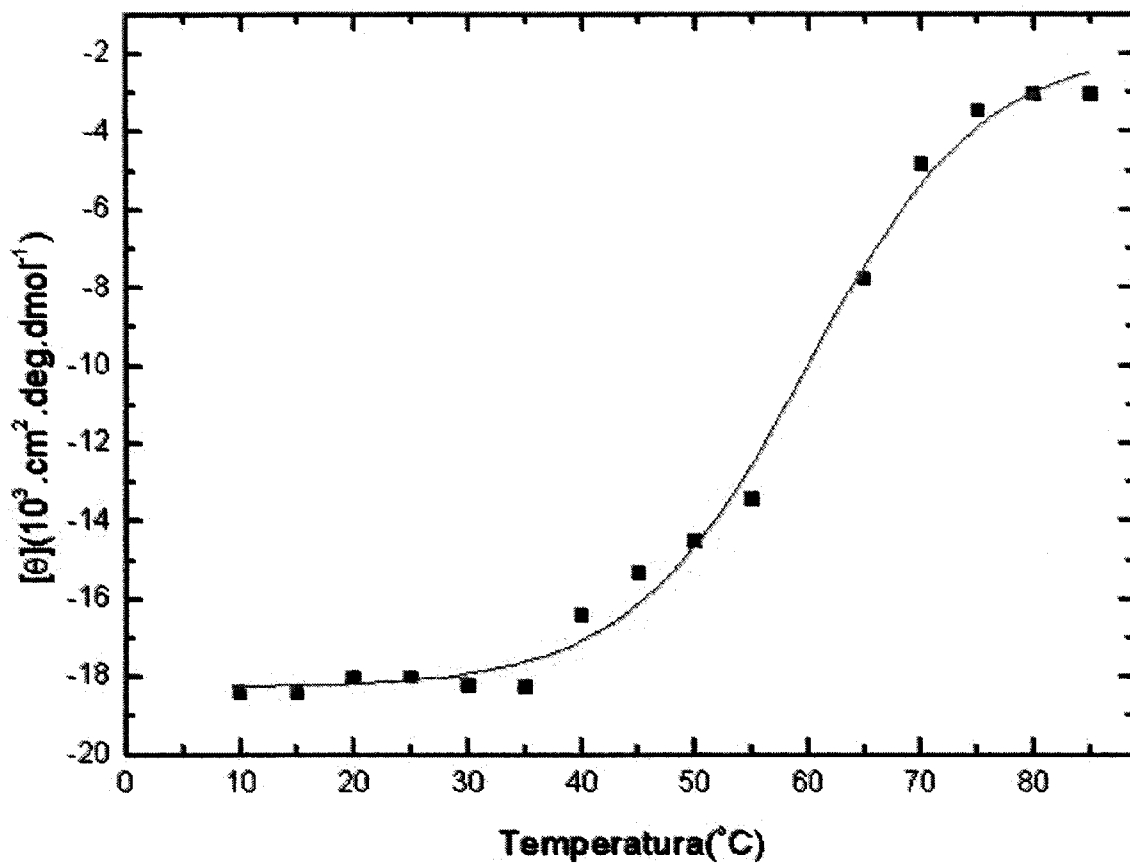


**Figuras 15 – Espectros de dicroísmo circular da rPAC obtidos sob diferentes valores de pH.** As medidas foram realizadas com uma solução proteica de aproximadamente 0,3 mg/ml em tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0 contendo NaCl 100 mM. Os espectros foram obtidos variando o comprimento de onda entre 195 a 250 nm e registrados como uma média de 16 varreduras, utilizando cubeta cilíndrica de caminho óptico de 1 mm.

Objetivando-se investigar as mudanças conformacionais na estrutura secundária, provocadas pelo calor, amostras da rPAC também foram submetidas a temperaturas que variaram entre 10 a 85 °C, em intervalos de 5 °C e tiveram seus espectros de diacromismo circular determinados. A figura 16 mostra os espectros da rPAC sob as diversas temperaturas testadas. Os dados de CD obtidos da variação térmica foram analisados assumindo-se que este é um processo irreversível de dois estados (nativo e desnaturado) [111]. A curva de transição foi determinada em função da temperatura, monitorando-se o ponto em 208 nm. Como resultado, observou-se que a rPAC manteve sua estrutura praticamente estável até 35 °C (Figura 16 e 17). No entanto, significativas mudanças foram observadas a partir da temperatura de 50 °C, na qual também foi observada a descaracterização do espectro de CD da rPAC, sugerindo a perda da estrutura secundária (hélice  $\alpha$ ) e conseqüentemente a desnaturação da proteína recombinante. Resultados semelhantes foram obtidos para a cadeia A da cinnamomina (outra RIP tipo 2 isolada de sementes de *Cinnamomun camphora*) que mostrou-se estável até a temperatura de 37 °C, apresentando um padrão de desenovelamento em temperaturas acima de 45 °C [112]. Fato similar também foi observado para a cadeia A da ricina [113]. É válido ressaltar que ensaios preliminares de termoestabilidade com pulchellina nativa (dados não publicados) demonstraram que a mesma manteve-se estável até a temperatura de 55 °C. O fato da pulchellina nativa ser uma proteína glicosilada e por ser constituída de duas cadeias (lectínica e tóxica) unidas por ligação dissulfeto, pode ser o motivo dessa maior estabilidade em relação a rPAC.



**Figuras 16 – Espectros de dicroísmo circular da rPAC obtidos sob diferentes temperaturas.** As medidas foram realizadas com uma solução protéica de aproximadamente 0,3 mg/ml em tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0 contendo NaCl 100 mM. Os espectros foram obtidos variando o comprimento de onda entre 195 a 250 nm e registrados como uma média de 16 varreduras, utilizando cubeta cilíndrica de caminho óptico de 1 mm.



**Figuras 17 – Curva de termoestabilidade da estrutura secundária obtida dos espectros de dicroísmo circular da rPAC. As medidas foram realizadas com uma solução protéica de aproximadamente 0,3 mg/ml em tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0 contendo NaCl 100 mM. Os espectros foram obtidos variando o comprimento de onda entre 195 a 250 nm e registrados como uma média de 16 varreduras, com temperaturas variando de 10 a 85 °C, utilizando cubeta cilíndrica de caminho óptico de 1 mm.**

### 3.3. Ensaios de fluorescência com a rPAC.

A técnica de espectroscopia de fluorescência baseia-se na propriedade que algumas moléculas possuem de ao serem excitadas emitirem luz em comprimentos de onda mais longos. No caso das proteínas, três resíduos de aminoácidos apresentam esta propriedade: a tirosina, o triptofano e a fenilalanina [114]. Esses resíduos são denominados fluoróforos naturais e sua fluorescência é altamente específica e sensível ao ambiente em que se encontram. Sendo assim, a fluorescência de uma proteína quando devidamente enovelada é resultante da fluorescência de seus resíduos individuais dependendo da vizinhança de cada um deles. Esse fato aliado à facilidade de realizar medidas com amostras pouco concentradas (na ordem de  $10^{-6}$  M para proteínas), torna a fluorescência uma técnica bastante sensível e eficaz para monitorar mudanças conformacionais e interações com ligantes [115].

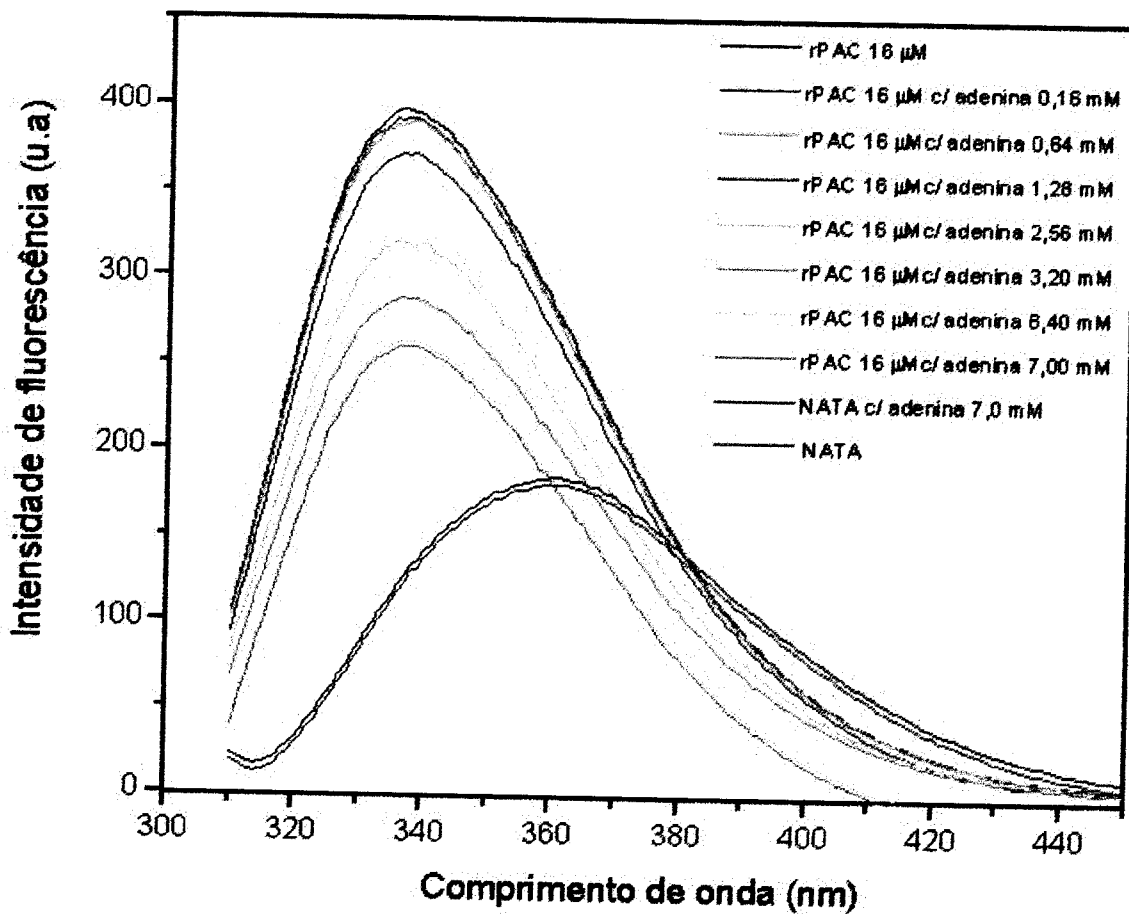
Como foi observado nos resultados de sequenciamento (Figura 8), diferente da cadeia A da ricina, tanto as cadeias A das abrinas quanto a rPAC apresentam dois resíduos de triptofano em suas seqüências [101]. Segundo dados estruturais obtidos com a cadeia A de abrina, um desses resíduos participa do sítio catalítico da proteína [35, 38].

Baseados nessas informações utilizou-se a espectroscopia de fluorescência para monitorar o microambiente do triptofano (W), analisando as possíveis mudanças conformacionais na estrutura terciária da rPAC em função da interação com a adenina (Figura 18). A concentração de rPAC usada neste experimento foi padronizada em 16  $\mu$ M. Para minimizar o efeito do espalhamento de luz pelo tampão, o espectro de cada amostra foi subtraído do espectro do tampão com a adenina. Como resultado, foi observado que o espectro de emissão da rPAC é característico de resíduos de triptofano que se encontram nas porções mais internas da molécula, protegidos do solvente. Resultados semelhantes foram observados para abrina, RTA e cinnamomina [35, 112, 113, 116]. Também pode ser observado que com o aumento da concentração de adenina adicionada a rPAC, houve uma expressiva redução na intensidade de fluorescência. No entanto essa redução diminuiu consideravelmente com a adição de adenina em concentrações acima de 6,4 mM. Esses resultados indicam que a rPAC está numa forma ativa, pois foi capaz de reconhecer e interagir com o seu substrato (no caso, a adenina) até o ponto de inteira ocupação do sítio

ativo pela adenina. Os resultados sugerem ainda que, assim como ocorre na ricina e abrina [35, 38], um dos resíduos de triptofano (posição 198) da rPAC parece fazer parte do sítio ativo. A acentuada redução da intensidade de fluorescência pode ser um indício de que esse resíduo esteja deslocado mais para interior do sítio ativo da rPAC. Foi observado também, que a adenina não interfere no sinal do fluoróforo NATA, descartando assim a possibilidade da interferência da adenina no ensaio. No entanto, a adição de 7 mM de adenina não é mais capaz de reduzir a intensidade de fluorescência, pois provavelmente a intensidade observada seja contribuição do outro resíduo de triptofano (posição 119) presente na seqüência da rPAC.

Resultados obtidos através de estudos estruturais, de interação proteína-RNA e de espectroscopia de fluorescência mostraram que a interação da cadeia A da ricina com o seu substrato (no caso, a porção adenina do RNA) é capaz de causar uma redução na intensidade da fluorescência da proteína e uma mudança na polaridade do ambiente do único triptofano presente na cadeia A (posição 211), sugerindo assim, que este Trp211 participe do sítio ativo catalítico da proteína [4, 35, 38, 117, 118]. Diferentemente, Watanabe *et. al.* [116] observaram que a RTA na presença de 12,5 mM de adenina, apresentou um significativo aumento na intensidade de fluorescência além de um deslocamento do máximo de emissão em 8 nm. Apesar de participar do sítio ativo da proteína, quando Bradley e McGuire [119] através de mutações sítios-dirigidas, substituíram esse resíduo de triptofano na posição 211 da cadeia A recombinante da ricina (rRA) por um de fenilalanina, eles observaram que a atividade catalítica foi reduzida (nove vezes), mas não foi totalmente suprimida. Isto sugere que esse triptofano tenha um papel importante na interação ligante-RNA, mas que não seja essencial para a atividade catalítica da proteína.

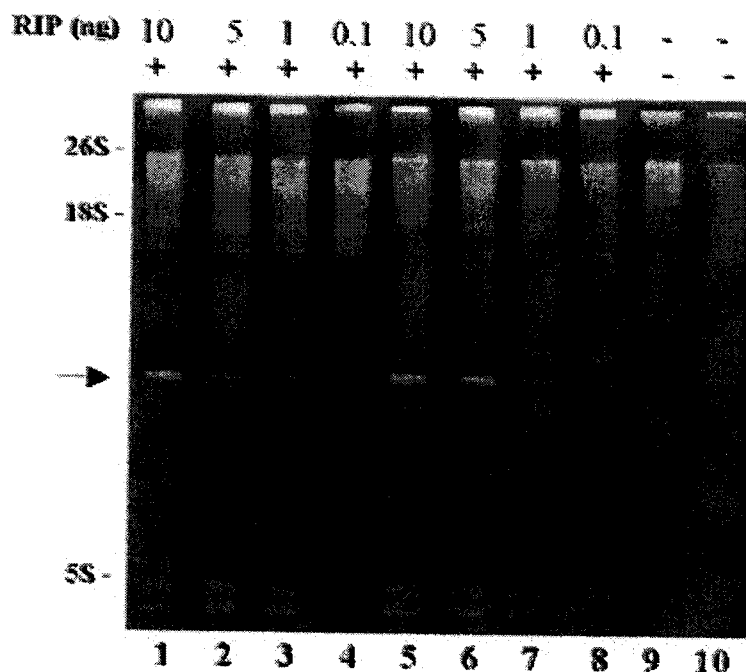




**Figura 18 – Espectros de emissão de fluorescência da rPAC e do NATA na ausência e na presença de adenina.** As amostras de rPAC foram diluídas em tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0 com NaCl 100 mM, mantendo sempre uma concentração final de 16  $\mu$ M. As amostras foram excitadas a 295 nm, a 25 °C, e os espectros foram monitorados no intervalo de 305 a 450 nm. A concentração de 1  $\mu$ g/ml (D.O.<sub>280nm</sub> 0,13) do fluoróforo N-acetil-L-triptofanoamida (NATA), no mesmo tampão da rPAC, foi usado como controle.

#### 4. Atividade RNA *N*-glicosilase (*in vitro*) da rPAC

Apesar dos resultados obtidos através da espectroscopia de fluorescência terem demonstrado indícios sobre a atividade da rPAC, outros testes foram necessários para confirmar se essa proteína recombinante estava numa forma realmente ativa. Para isso utilizou-se um ensaio *in vitro* para verificar a atividade enzimática RNA *N*-glicosilase da rPAC. Nesse ensaio, diferentes concentrações da rPAC e da pulchellina nativa (usada como controle positivo) foram incubadas com ribossomos isolados de levedura (*Pichia pastoris*). Em seguida o RNA ribossomal foi extraído e tratado com anilina. Como resultado, assim como a pulchellina nativa, a rPAC foi capaz de depurar ribossomos até a concentração de 1 ng (Figura 19). Diferentes estudos [1, 4, 118, 120] já demonstraram que as RIPs promovem a depuração da subunidade maior do RNA ribossômico, liberando um pequeno fragmento de 130-400 nucleotídeos da porção 3' do rRNA. Este fragmento, também conhecido como fragmento de Endo [118], é considerado um diagnóstico da atividade enzimática das RIPs e pode facilmente ser observado através de eletroforese em gel de agarose/formamida [91]. De acordo com a figura 19, tanto a rPAC quanto a pulchellina apresentaram uma banda similar ao fragmento de Endo ( $\approx 370$  nucleotídeos) liberado da subunidade 26S do rRNA de levedura e detectado após o tratamento com anilina [120]. Também pôde-se notar a ausência da referida banda nas amostras que não foram incubadas com a rPCA e nem com a pulchellina nativa, confirmando a atividade enzimática RNA *N*-glicosilase das duas proteínas. Resultados similares foram demonstrados pela cadeia A recombinante da abrina-a (ABRaA), no qual 0,1 ng de proteína que foi capaz de depurar a subunidade 28S do rRNA isolado de ribossomos de fígado de rato, liberando um fragmento de aproximadamente 420 ribonucleotídeos.

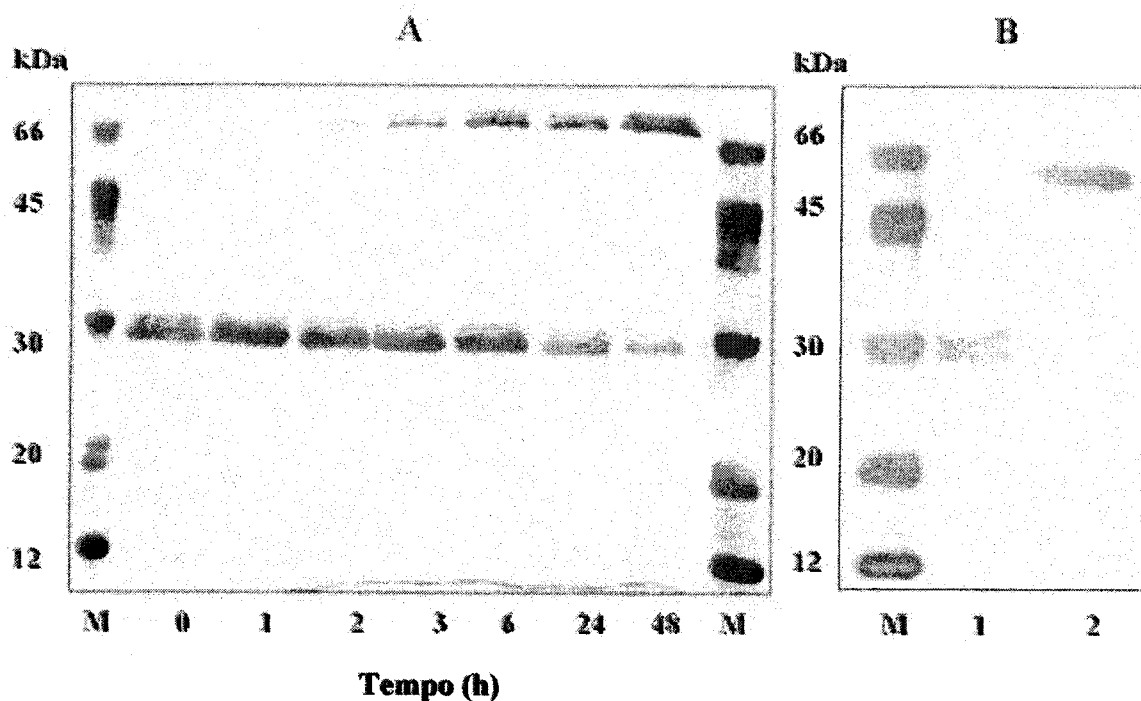


**Figura 19 - Análise da atividade RNA *N*-glicosilase da rPAC e da pulchellina através de eletroforese em gel de agarose/formamida [101].** Colunas: 1-4) Ribossomos de levedura (*Pichia pastoris*) incubados com a rPAC; 5-8) Ribossomos de levedura incubados com a pulchellina nativa (controle positivo); 9-10) Ribossomos sem tratamento (controle negativo). A seta indica o fragmento de Endo [116] liberado e detectado após o tratamento com anilina. Os sinais + e - indicam amostras tratadas e não tratadas com anilina, respectivamente.

### 5. Associação *in vitro* da rPAC com a rPBC

De acordo com os resultados obtidos através do sequenciamento da rPAC (Figura 8) e da cadeia B recombinante da pulchellina (rPAB) [93], pôde-se intuir que ambas apresentam uma cisteína livre nas regiões C- e N-terminal da seqüência de cada cadeia, respectivamente. Dados estruturais obtidos com abrina, também comprovaram a presença de uma cisteína livre em cada uma de suas cadeias e que esses resíduos participam da ligação dissulfeto que une as duas cadeias [35, 38].

Baseados nessas informações, um protocolo de associação da rPAC com a cadeia B recombinante da pulchellina (rPBC)[93] foi montado visando à obtenção de um heterodímero recombinante ativo. A razão de produzir esse heterodímero recombinante teve com objetivo avaliar o potencial tóxico da rPAC, uma vez que essa cadeia precisa estar ligada a sua porção lectínica (cadeia B) para poder ser internalizada pela célula e manifestar a sua atividade tóxica. O protocolo de associação usado foi elaborado com base na metodologia descrita por Eck *et al.* [92]. Esse e outros estudos de associação *in vitro* de proteínas [91, 122] mostraram que a simples presença de oxigênio ou outro agente oxidante forte (cisteína, cistina, glutathiona oxidada) é suficiente para promover a formação de ligações dissulfeto entre as cadeias protéicas ou partes delas.

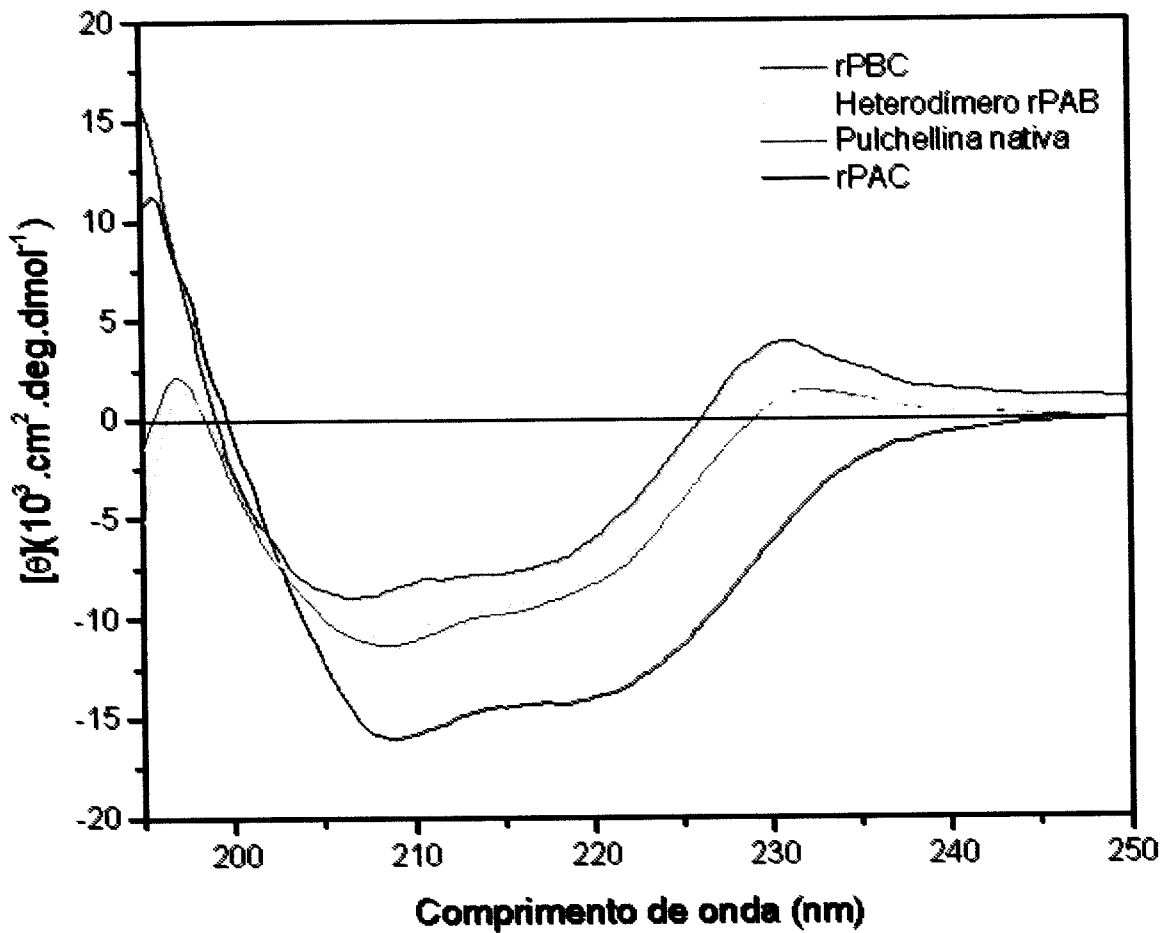


**Figura 20 – Análise da associação *in vitro* da rPAC com a rPBC através de SDS-PAGE 15 % [101]. Gel (A): Padrão de massa molecular (coluna M); rPAC incubada com a rPBC na presença de um sistema óxido/redução (com cisteína/cistina 5:1) a 4 °C, por até 48 h. Gel (B): Padrão de massa molecular (coluna M); Herodímero recombinante (rPAB) obtido após a dialofiltração e sob condições redutoras (coluna 1); Herodímero recombinante (rPAB) obtido após a dialofiltração e sob condições não redutoras (coluna 2).**

Os resultados mostraram que a formação do heterodímero recombinante (denominado rPAB) foi um processo relativamente lento (Figura 20-A). Uma banda protéica (de  $\approx 59$  kDa) correspondente ao heterodímero rPAB somente foi observada após 2 h de incubação [101]. Após 48 h de incubação a  $4^\circ\text{C}$ , a associação das duas cadeias recombinantes foi quase completa, rendendo aproximadamente 0,20 mg da rPAB, ou seja, teoricamente 20% do total de proteína usada para associação. Após esse processo, o heterodímero rPAB foi dialofiltrado em *Centriprep* (30 - Millipore) para eliminar parte das cadeias livres que não foram associadas. A figura 20-B mostra o heterodímero rPAB após a dialofiltragem, sob condições redutoras (com duas bandas protéicas de  $\approx 29$  e 30 kDa referentes a rPAC e rPBC, respectivamente) e não redutoras (com apenas uma banda protéica de  $\approx 60$  kDa), similar aos resultados obtidos com a pulchellina nativa [83].

## 6. Dicroísmo circular utilizando o heterodímero rPAB

Ensaio de espectroscopia de dicroísmo circular (CD) e de toxicidade foram realizados para verificar similaridades estruturais e biológicas entre o heterodímero rPAB e a pulchellina nativa. A figura 21 mostra os espectros de CD obtidos da rPAC, rPBC, rPAB e pulchellina nativa. Como foi citado anteriormente, a rPAC apresenta um padrão conformacional de predominância de estruturas hélice- $\alpha$  [101]: com duas bandas negativas de amplitudes aproximadas com mínimos em 208 e 222 nm, e uma banda positiva em torno de 195 nm. O espectro da rPBC renovelada mostra uma banda máxima a 231 nm, duas mínimas a 214 e 206 nm e um *crossover* negativo positivo a 199 nm. Análises do espectro da rPBC realizadas com os programas *CONTIN* e *SELCON 3* indicaram a predominância de estruturas do tipo folha- $\beta$  [93], em concordância com a estrutura da cadeia B da abrina [35], proteína com a qual compartilha alta identidade (86 %) em termos de estrutura primária. O espectro de CD do heterodímero rPAB mostrou uma grande similaridade com o da pulchellina nativa, sugerindo que ambas apresentam o mesmo padrão conformacional referente a estrutura secundária.

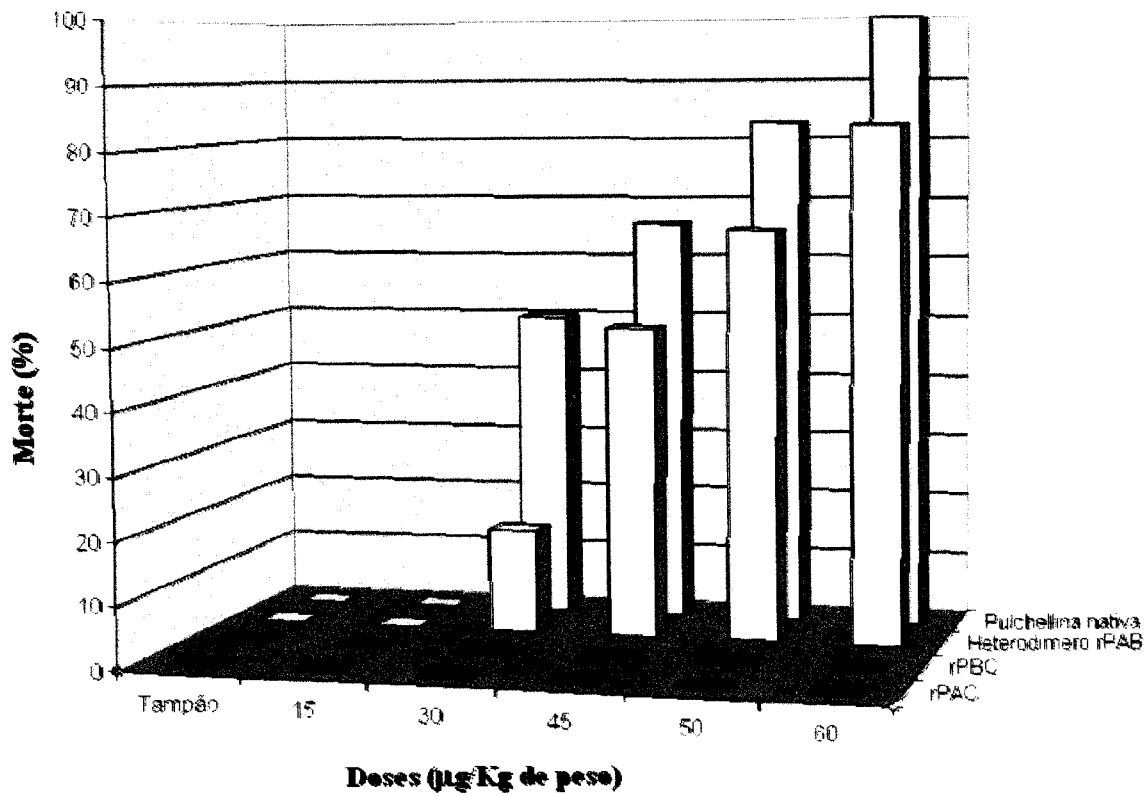


**Figura 21 – Espectros de dicroísmo circular da rPBC, do heterodímero recombinante (rPAB), da pulchellina nativa e da rPAC [101].** As medidas foram realizadas com uma solução protéica de aproximadamente 0,3 mg/ml em tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0 contendo NaCl 100 mM. Os espectros foram obtidos variando o comprimento de onda entre 195 a 250 nm e registrados como uma média de 16 varreduras, a temperatura ambiente (25 °C), utilizando cubeta cilíndrica de caminho óptico de 1 mm.

## 7. Teste de toxicidade

Para avaliar a atividade tóxica do heterodímero rPAB, doses contendo diferentes concentrações da proteína foram injetadas na cavidade intraperitoneal de camundongos adultos e os resultados obtidos foram expressos em termos de dose letal média ( $DL_{50}$ ). As proteínas rPAC, rPBC e pulchellina nativa também foram testadas como controles. Como pode ser observado na figura 22, após 48 h de ensaio a rPAB foi capaz de matar 50% dos animais testados com uma dose 45  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de peso corpóreo. Esse valor foi um pouco maior do que aquele observado para a pulchellina nativa (30  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de peso corpóreo). Esses valores são comparáveis aos obtidos para a abrina-a [122], abrina-b e -d [123]. Foi observado ainda, que doses menores da rPAB também levaram alguns animais a morte, poucos dias após o fim do experimento, igualmente observado para a pulchellina nativa. Tanto a rPAC quanto a rPBC não apresentaram efeitos tóxicos para os animais, quando testadas sob as mesmas condições. É válido ressaltar que os camundongos tratados com a rPAC e com o heterodímero recombinante mostraram-se geralmente, com diarreia, pêlos eriçados, hipoativos e com olhos semi-fechados. Após a morte, alguns desses animais foram necropsiados e quando analisados, observou-se que o fígado e pâncreas apresentavam aparência edematosa e hemorrágica. Esses sintomas são bastante comuns em casos de intoxicação com RIPs tipo 2 [53].

Esses resultados obtidos com o heterodímero rPAB indicam de forma indireta que tanto a rPAC quanto a rPBC são bioativas e que o processo de glicosilação parece não ser essencial para a internalização do heterodímero recombinante, pois mesmo derivado de duas proteínas heterólogas expressas em *E. coli* (ou seja, não glicosiladas), ele apresentou uma atividade tóxica similar à pulchellina nativa. A ausência de glicosilação é uma grande vantagem quando pretende-se produzir imunotoxinas utilizando a cadeia A das RIPs, pois isso reduz bastante o risco de interações inespecíficas dessas imunotoxinas [77, 124]. Portanto, por ser facilmente obtida através de um sistema heterólogo, a rPAC pode ser bastante útil na preparação de imunocombinados para serem utilizados como agentes quimioterapêuticos no tratamento de diferentes tipos de câncer [77, 125].



**Figura 22 – Atividade tóxica determinada por injeção intraperitoneal em camundongos utilizando diferentes concentrações da rPAC, rPAB, heterodímero rPAB e da pulchellina nativa (como controle positivo) [101]. O tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0 contendo NaCl 100 mM foi usado como controle negativo. Para cada dose foi utilizado um grupo de seis animais adultos e o ensaio foi monitorado por 48 h.**



## **VII. CONCLUSÕES**

---

## VII. CONCLUSÕES

O fragmento genômico correspondente ao gene que codifica a cadeia A da pulchellina (PAC) foi clonado com êxito através da utilização de *primers* específicos, resultando numa seqüência completa de 251 resíduos de aminoácidos. Essa seqüência obtida para a PAC mostrou 86 % de identidade seqüencial com a cadeia A da abrina-c e remete uma massa molecular predita para a PAC de 29,2 kDa.

A expressão heteróloga da PAC em *E. coli* (linhagem AD202) foi realizada com sucesso utilizando o vetor pGEX-5X, através do qual pôde-se obter uma proteína de fusão solúvel correspondente a GST ligada a PAC. A proteína de fusão foi facilmente purificada em resina de afinidade, rendendo aproximadamente 9 mg de proteína por litro de cultura bacteriana.

A proteína de fusão foi completamente clivada através da incubação direta com o Fator Xa por 16 h, a 4 °C. Em contraste, a incubação da proteína de fusão com o Fator Xa diretamente na resina de afinidade mostrou-se ineficiente para o processo de clivagem. A cadeia A recombinante da pulchellina (rPAC) foi facilmente separada da GST através de cromatografia de troca iônica em coluna de MonoQ, apresentando um rendimento final de aproximadamente 3 mg de rPAC solúvel/litro de cultura. Porém, os ensaios de dicroísmo circular (CD) mostraram que a rPAC está sendo obtida sob duas formas diferentes, uma apresentando uma estrutura desordenada e outra com espectro similar ao da cadeia A da abrina. Em função dos resultados de CD, a segunda forma da rPAC foi considerada corretamente enovelada e por isso passou a ser utilizada para os demais experimentos.

Ainda, os estudos de CD mostraram que a estrutura secundária da rPAC manteve-se estável em valores de pH ácido ou básico, exceto por modificações significantes em valores muito básicos (pH 10-12). Esses estudos também demonstraram que a estrutura secundária da rPAC manteve sua estabilidade até 35 °C.

Os resultados obtidos a partir de espectroscopia de fluorescência sugerem que a rPAC está numa forma ativa, pois foi capaz de reconhecer e interagir com a adenina. Acredita-se ainda, que assim como ocorre com outras RIPs, um dos resíduos de triptofano presente na seqüência da rPAC faça parte do sítio ativo *N*-glicosilase. Essa atividade pôde

ser confirmada através do ensaio de atividade RNA *N*-glicosilase, no qual 1 ng de rPAC foi capaz de depurar *in vitro* os RNA ribossomais isolados de levedura.

A associação da rPAC com a cadeia B racombinante da pulchellina (rPBC) foi realizada com sucesso após 48 h de incubação das duas cadeias recombinantes na presença de cisteína/cistina. O heterodímero recombinante obtido foi denominado de rPAB e apresentou características bioquímicas, espectroscópicas e toxicidade similares as da pulchellina nativa.

Por fim, os resultados em conjunto indicam que a rPAC é uma molécula promissora para estudos envolvendo a criação de novas imunotoxinas, pois está numa forma ativa e poderá ser ligada quimicamente a anticorpos monoclonais para formar moléculas híbridas ativas capazes de reconhecerem e se ligarem as células alvos do anticorpo usado, funcionando como agentes imunotóxicos.

## **VIII. REFERÊNCIAS**

---

**VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Van Damme, E.J.M., Hao, Q., Chen, Y., Barre, A., Vandebussche, F., Desmyter, S., Rouge, P., Peumans, W.J. Ribosome-inactivating proteins: A family of plant proteins that do more than inactivating ribosomes. *Crit. Rev. Plant Sci.* **20**(5), 395-465, 2001.
2. Olsnes, S. & Pihl, A. Different biological properties of the two constituent peptide chains of ricin, a toxic protein inhibiting protein. *Biochemistry*, **12**, 3121-3126, 1973.
3. Lampe, K.F. Toxic effects of plant toxins. In: Amdur, M.O.; Doull, J.; Klaasen, C.D. Casarett and Doull's Toxicology: the basic science of poisons. 4. ed. New York, Pergamon Press, 2000. p.20-27.
4. Endo, Y., Mitsui, K. Motizuki, M., Tsurugi, K. The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. The site and the characteristics of the modification in 28S ribosomal caused by the toxins. *J. Biol. Chem.* **262**, 5908-5912, 1987.
5. Stirpe, F. & Barbieri, L. Ribosome-inactivating proteins up to date. *FEBS Lett.* **195**, 1-8, 1986.
6. Mundy, J., Leah, R., Boston, R., Endo, Y., Stirpe, F. Genes encoding ribosome-inactivating proteins. *Plant Mol. Biol. Rep.* **12**, 60-62, 1994.
7. Nielsen, K. & Boston, R. S. Ribosome-inactivating proteins: a plant perspective. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* **52**, 785-816, 2001.
8. Cavallaro, U.  $\alpha$ -macroglobulin receptor mediates binding and cytotoxicity of plant ribosome-inactivating proteins. *Eur. J. Biochem.* **232**, 165-171. (1995).
9. Stirpe, F., Gasperi-Campani, A., Barbieri, L., Lorenzoni, E., Montanaro, L., Sperti, S., Bonetti, E. Inhibition of protein synthesis by modeccin, the toxin of *Modecca digitata*. *FEBS Lett.* **85**, 65-67, 1978.
10. Steeves, R. M., Denton, M. E., Barnard, F. C., Henry, A., Lambert, J. M. Identification of three oligosaccharide binding sites in ricin. *Biochemistry.* **38**, 11677-85, 1999.
11. Beaumelle, Alami, M., Hopkins, C. R. ATP-dependent translocation of ricin across the membrane of purified endosomes. *J. Biol. Chem.* **268**, 23661-69, 1993.

12. Bass, H. W., Webster, C., O'Brian, G. R., Roberts, J. K. M., Boston, R. S. A maize ribosome-inactivating protein is controlled by the transcriptional activator Opaque-2. *Plant Cell*, **4**, 225-34, 1992.
13. Girbés, T., Ferreras, J.M., Arias, F.J., Stirpe, F. Description, distribution, activity and phylogenetic relationship of ribosome-inactivating proteins in plants, fungi and bacteria. *Mini-Reviews in Medical Chemistry*, **4**, 461-467, 2004.
14. Hauf, N., Chakraborty, T. Suppression of NF- $\kappa$ B Activation and proinflammatory cytokine expression by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J. Immunol.* **170**, 2074-2082, 2003.
15. Liu, R.S., Yang, J.H., Liu, W.Y. Isolation and enzymatic characterization of lamjapin, the first ribosome-inactivating protein from cryptogamic algal plant (*Laminaria japonica* A.). *Eur. J. Biochem.* **269**, 4746-4552, 2002.
16. Stirpe, F., Barbieri, L., Battelli, M.G., Soria, M., Lappi, D.A. Ribosome-inactivating proteins from plants: present status and future prospects. *Biotechnology*, **10**, 405-412, 1992.
17. Cho, H.J., Lee, S.L., Kim, S., Kim, B.D. Isolation and characterization of cDNAs encoding ribosome inactivating protein from *Dianthus sinensis* L. *Mol. Cells.*, **10**(2), 135-141, 2000.
18. Van Damme, E.J., Hao, Q., Charels, D., Barre, A., Rouge, P., Van Leuven, F., Peumans, W.J. Characterization and molecular cloning of two different type 2 ribosome-inactivating proteins from the monocotyledonous plant *Polygonatum multiflorum*. *Eur. J. Biochem.*, **267**, 2746-2279, 2000.
19. Vivanco, J.M., Savary, B.J., Flores, H.E. Characterization of two novel type I ribosome-inactivating proteins from the storage roots of the Andean crop *Mirabilis expansa*. *Plant. Physiol.*, **119**, 1447-1456, 1999.
20. Zhang, D., Halawiesh, F.T. Isolation and identification of foetidissimin: a novel ribosome-inactivating protein from *Cucurbita foetidissima*. *Plant Sci.*, **164**, 387-393, 2003.
21. Wu, J., Gan, J.H., Xia, Z.X. Crystallization and preliminary crystallographic studies of trichomaglin, novel ribosome-inactivating protein. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, **56**, 1466-1467, 2000.

22. Chen, Y., Rouge, P., Peumans, W.J., Van Damme, E.J. Mutational analysis of the carbohydrate-binding activity of the NeuAc(alpha-2,6)Gal/GalNAc-specific type 2 ribosome-inactivating protein from elderberry (*Sambucus nigra*) fruits. *Eur. J. Biochem.*, **364**, 587-592, 2002.
23. Parkash, A., Ng, T.B., Tso, W.W. Purification and characterization of charantin, a napin-like ribosome-inactivating peptide from bitter melon (*Momordica charantia*) seeds. *Pept. Res.*, **59**(2), 197-202, 2002.
24. Yang, Q., Liu, R.S., Gong, Z.Z., Liu, W.Y. Studies of three genes encoding Cinnamomin (a type II RIP) isolated from the seeds of camphor tree and their expression patterns. *Genes*, **284**, 215-223, 2002.
25. Van Damme, E.J., Barre, A.; Barbieri, L.; Valbonesi, P., Rouge, P., Van Leuven, F., Stirpe, F., Peumans, W.J. Type 1 ribosome-inactivating proteins are the most abundant proteins in iris (*Iris hollandica* var Professor Blaauw) bulbs: Characterization and molecular cloning *Biochem. J.*, **324**, 963-970, 1997.
26. Stirpe, F., Gasperi-Campani, A., Barbieri, L., Falasca, A., Abbondanza, A., Stevens, W.A. Ribosome-inactivating proteins from the seeds of *Saponaria officinalis* L (soapwort), of *Agrostemma githago* L (corn cockle) and of *Asparagus officinalis* L (asparagus), and from the latex of *Hura crepitans* L (sandbox tree) *Biochem. J.*, **216**, 617, 1983.
27. Walsh, T.A., Morgan, A.E., Hey, T.D. Characterization and molecular cloning of a proenzyme form of a ribosome-inactivating protein from maize: novel mechanism of proenzyme activation involving proteolytic removal of a 2.8 kDa internal peptide segment. *J. Biol. Chem.* **266**, 23422-27, 1991.
28. Chaudhry, B., Mueller, U.F., Cameron Mills, V., Gough, S., Simpson, D. The barley 60 kDa jasmonate-induced protein (JIP60) is a novel ribosome-inactivating protein. *Plant J.* **6**: 815-24, 1994.
29. Becker, W. & Apel, K. Isolation and characterization of a cDNA clone encoding a novel jasmonate-induced protein of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Mol. Biol.* **19**(6), 1065-1067, 1992.
30. Barbieri, L., Battelli, M. G., Stirpe, F. Ribosome-inactivating proteins from plants. *Biochim. Biophys. Acta.* **1154**, 237-282, 1993.

31. Falaska, A., Gasperi-Campani, A., Abbondanza, A., Barbieri, L., Stirpe, F. Properties of the ribosome-inactivating proteins gelonin, *Momordica charantia* inhibitor, and dianthins *Biochem. J.*, **207**, 505-509, 1982.
32. Frigerio, L., Vitale, A., Lord, J.M., Ceriotti, A., Roberts, L.M. Free ricin A chain, proricin, and native toxin have different cellular fates when expressed in tobacco protoplasts. *J. Biol. Chem.*, **273**, 14194-14199, 1998.
33. Ling, J., Liu, W., Wang, T.P. Simultaneous existence of two types of ribosome-inactivating proteins in the seeds of *Cinnamomum canphora* – Characterization of enzymatic activities of these cytotoxic proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **1252**, 15-22, 1995.
34. Fong, W.P., Wong, R.N.S, Go, T.T.M., Yeung, H.W. Enzymatic properties of ribosome-inactivating proteins (RIPs) and related toxins. *Life Sci.*, **49**, 1859-1869. 1991.
35. Robertus, J.D., Monzingo, A.F. The structure of ribosome inactivating proteins. *Mini-Rev. Med. Chem.*, **4**(5), 477-486, 2004.
36. Hartley, M.R.; Lord, J.M. Cytotoxic ribosome-inactivating lectins from plants. *Biochim. Biophys. Acta*, **1701**(1-2), 1-14, 2004.
37. Hermann, M.S., Behnke, W.D. A characterization of abrin A from the seeds of the *Abrus precatorius* plant. *Biochim. Biophys. Acta*, **667**, 397-410, 1981.
38. Tahirov, T.H., Lu, T.C., Liaw, Y.C., Chen, Y.L & Lin, J.Y. Crystal structure of abrin-a at 2.14 Å. *J. Mol. Biol.* **250**, 354-367, 1995.
39. Den Hartog, M.T., Lubelli, C., Boon, L., Heerkens, S., Buijisse, A.P.O., de Boer, M., Stirpe, F. Cloning and expression of cDNA coding for bouganin. A type I ribosome-inactivating protein from *Bougainvillea spectabilis* Willd. *Eur. J. Biochem.*, **269**, 1772-1779, 2002.
40. Liu-Ting, Q. & Xiao-Ling, Q. Cloning, expression of the abrin-a in *Escherichia coli* and measurement of the biological activities *in vitro*. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, **34**(4), 405-410, 2002.
41. Chambery, A., Di Maro, A., Monti, M.M., Stirpe, F., Parente, A. Volkensin from *Adenia volkensin* Harms (kilyambiti plant), a type 2 ribosome-inactivating protein.



- Gene cloning, expression and characterization of its A-chain. *Eur. J. Biochem.*, **271**, 108-117, 2004.
42. Kimura, M., Minami, Y., Tokuda, T., Nakajima, S., Takagi, S., Funatsu, G. Primary structures of N-linked oligosaccharides of momordin-a, a ribosome-inactivating protein from *Momordica charantia* seeds. *Agri. Biol. Chem.*, **55**(8), 2031-2036, 1991.
43. Islam, M.R., Hirayama, H., Funatsu, G. Complete amino acid sequence of luffin-b, a ribosome-inactivating protein sponge gourd (*Luffa cylindrica*) seeds. *Agric. Biol. Chem.*, **55**(1), 229-238, 1991.
44. Benatti, L. A saporina-6 cDNA containing a precursor sequence coding for a carboxy-terminal extension. *FEBS Lett.*, **219**, 285-288, 1991.
45. Montfort, W., Villafranca, J.E., Monzingo, A.F., Ernst, S., Katzin, B., Rutenber, E., Xuong, N.H., Hamlin, R., Roberts, J. D. The three-dimensional structure of ricin at 2,8 Å. *J. Biol. Chem.*, **262**, 5398-5403, 1987.
46. Karzin, B.J., Collins, E.J., Robertus, J.D. Structure of ricin A-chain at 2.5 Å. *Proteins: Struct. Funct. Genet.*, **10**, 251-259, 1991.
47. Hartley, M.R., Chaddock, J.A. & Bonness, M.S. (1996). The structure and function of ribosome-inactivating proteins. *Trends in Plant Science*. **1**(8): 254-260.
48. McPherson, A. J., Rich, A. Studies on crystalline abrin: X-ray diffraction data, molecular weight, carbohydrate content and subunit structure. *FEBS Letters*, **35**, 276-261, 1973.
49. Frankel, A.E., Burbage, C., Fu, T., Tagge, E., Chandler, J., Willingham, M.C. Ricin toxin contains at least three galactose-binding sites located in B chain subdomains 1 $\alpha$ , 1 $\beta$  and 2 $\gamma$ . *Biochemistry*, **35**, 14749-14756, 1996.
50. Olsnes, S. The history of ricin, abrin and related toxins. *Toxicon*, **44**(4), 361-370, 2004.
51. Agapov, I.I., Tonevitsky, A.G., Shamshiev, A.T., Pohl, P., Palmer, R.A., Kirpichnikov, M.P. The role of structural domains in RIP 2 toxin model membrane binding. *FEBS Letters*, **402**(1), 91-93, 1997.
52. Funatsu, G., Islam, M.R., Minami, Y., Sung-Sil, K., Kimura, M. Conserved amino acid residues in ribosome inactivating proteins plants. *Biochimie*, **73**, 1157-1161, 1991.

53. Battelli, M.J. Cytotoxicity and toxicity to animals and humans of ribosome-inactivating proteins. *Mini-Rev. Med. Chem.*, **4**(5), 513-521, 2004.
54. Nambiar, M.P. & Wu, H.C. Ilimaquinone inhibits the cytotoxicities of ricin, diphtheria toxin, and other plant toxins in vero cells. *Exp. Cell Research*, **219**, 671-678, 1995.
55. Van Deurs, B., Pedersen, L.R., Sudan, A., Olsnes, S., Sandvig, K. Receptor-mediated endocytosis of a ricin-colloidal gold conjugate in vero cells. *Exp. Cell Research*, **159**, 287-304, 1985.
56. Chan, L.L., Li, J., Liu, S. Differential effects of abrin on normal and tumor cells. *J. Cell. Physiol.*, **123**, 132-138, 1985.
57. Gleeson, P.A. & Hughes, R.C. Binding and uptake of the toxin lectin modeccin by baby hamster kidney (BHK) cells. *J. Cell. Sci.*, **75**: 283-301, 1985.
58. Peumans, W.J. & Van Damme, E.J.M. Plant lectins: specific tools for the identification, isolation and characterization of O-linked glycans. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **33**(3): 209-258, 1998.
59. Magnusson, S., Berg, T., Turpin, E., Frénoy, J.P. Interactions of ricin with sinusoidal endothelial rat liver cells. *Biochem. J.*, **277**, 855-861, 1991.
60. Magnusson, S., Kjekken, R., Berg, T. Characterization of two distinct pathways of endocytosis of ricin by rat liver endothelial cells. *Exp. Cell Research*, **105**, 118-125, 1993.
61. Madan, S. & Ghosh, P.C. Interaction of gelonin with macrophages: effects of lysosomotropic amines. *Exp. Cell Research*, **198**, 52-58, 1992.
62. Crowther, R.A. & Pearse, M.F. Assembly and packing of clathrin into coat. *J. Cell Biol.*, **91**, 790-797, 1981.
63. Sandvig, K. & Van Deurs, B. Endocytosis and intracellular transport of ricin: recent discoveries. *FEBS Lett.*, **452**: 67-70, 1999.
64. Peumans, W.J. & Van Damme, E.J.M. Lectins as plant defence proteins. *Plant Physiol.*, **109**, 347-352, 1995.
65. Van Damme, E. J. M., Peumans, W. J., Barre, A., Rougé, P. Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological role. *Crit. Rev. Plant Sci.* **17**, 575-692, 1998.

66. Barbieri, L., Valbonesi, P., Bondioli, M., Alvarez, M. L., DalMonte, P., Landini, M. P. and Stirpe, F. *FBS Letters*. **25195**, 196-197, 2001.
67. Hartley, M.R & Lord, J.M. Genetics of ribosome-inactivating proteins. *Mini-Rev. Med. Chem.*, **4(5)**, 487-492, 2004.
68. Battelli, M. G., Citores, L., Buonomici, L., Ferreras, J. M., deBenito, F. M., Stirpe, F., and Girbes, T. Toxicity and citotoxicity of nigrin b, a two-chain ribosome-inactivating protein from *Sambucus nigra*: comparison with ricin. *Arch. Toxicol.* **71**, 360-364, 1997.
69. Balint, G.A. Ricin: the toxic protein of castor oil seeds. *Toxicology*, **2**, 77-102, 1974.
70. Christiansen, V.J., Chia-Hsuh, H., Zhang, L., Robinson, C.P. Effects of ricin on the ability of rabbit arteries to contract and relax. *J. Appl. Toxicol.*, **15(1)**, 37-43, 1995.
71. Licastro, F., Morini, M.C., Bolognesi, A., Stirpe, F. Ricin induces the production of tumour necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1 $\beta$  by human peripheral-blood nuclear cells. *Biochem. J.*, **294**, 517-520, 1993.
72. Griffiths, G.D., Leek, M.D., Gee, D.J. The toxic plant proteins ricin and abrin induce apoptotic changes in mammalian lymphoid tissues and intestine. *J. Pathol.*, **151**, 221-229, 1987.
73. Girbés, T. Proteínas inactivadoras de ribossomas (RIPs) y sus aplicaciones en la construcción de inmunotoxinas para la terapia experimental del cáncer. *Anal. Real Acad. Farm.*, **66(3)**, 12-28, 2000.
74. Narayanan, S., Surolia, A., Karande, A.A. Ribosome inactivating protein and apoptosis: Abrin causes cell death via mitochondrial pathway in Jurkat cells. *Biochem J.*, **377**, 233-40, 2004.
75. Fracasso, G.; Bellisola, G.; Castelletti, D; Tridente, G.; Colombatti, M. Immunotoxins and other-conjugates: preparation and general characteristics. *Mini Rev. Med. Chem.*, **4**, 545-562, 2004.
76. Bolognesi, A. & Polito, L. Immunotoxins and Other Conjugates: Pre-clinical Studies. *Mini Rev. Med. Chem.*, **4**, 563-583, 2004.
77. Kreitman, R.J. Immunotoxins in cancer therapy. *Curr. Opin. Immunol.* **11**, 570-578. 1999.

78. Lappi, D.A. & Wiley, R.G. Immunotoxins and neuropeptide-toxin conjugates experimental applications. *Mini Rev. Med. Chem.*, **4**(5), 585-595, 2004.
79. Stirpe, F., Olsnes, S., Pihl, A. Gelonin, a new inhibitor of protein synthesis, nontoxic to intact cells. Isolation, characterization and preparation of cytotoxic complex with concanavalin A. *J. Biol. Chem.*, **255**, 6947-6953, 1980.
80. Zarling, J.N. Inhibitor of HIV replication by pokeweed antiviral protein targeted to CD<sub>4</sub> cells by monoclonal antibodies. *Nature*, **347**, 92-95, 1990.
81. Barbieri, L., Valbonesi, Bonora, E., Gorini, E., Bolognesi, A., Stirpe, F. Polynucleotide: adenosine glycosidase activity of ribosome-inactivating proteins: effect on DNA, RNA and poly(A). *Nucl. Acid Res.*, **25**(3), 518-522, 1997.
82. Park, S.W., Vepachedu, R., Sharma, Neelam, Vivanco, J.M. Ribosome-inactivating protein in plant biology. *Planta*, **219**, 1093-1096, 2004.
83. Ramos, M.V., Mota, D.M., Teixeira, C.R., Cavada, B.S., Moreira, R.A. Isolation and partial characterization of highly toxic lectins from *Abrus pulchellus* seeds. *Toxicon*, **36**(3), 477-484, 1998.
84. Hermann, M.S. & Behnke, W.D. A characterization of abrin A from the seeds of the *Abrus precatorius* plant. *Biochim. Biophys. Acta*, **667**, 370-410, 1981.
85. Wood, K.A, Lord, J.M., Wawrzynczar, E.J., Piatak, M. Preproabrin: genomic cloning and the expression of the A-chain in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.*, **198**, 723-732, 1991.
86. Sambrook, J., Fritsh, E.F., Maniatis, T. In: Molecular cloning: A laboratory manual. 3.ed, Cold Spring Harbor, N.Y. 1989, pp. 10.6-10.12.
87. Ausubel, F. Introduction of plasmid DNA into cells. In: Protocols in molecular biology. 3.ed, John Wiley and Sons, Inc. 1995, pp. 1.21-1.22.
88. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**, 680-685, 1970.
89. Janny, R.J., Mann, K.G., Lundblad, R.L. A critical review of the method for cleavage of fusion proteins with thrombin and factor Xa. *Prot. Exp. Purif.*, **31**, 1-11, 2003.
90. Bradford, M.M. A rapid sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254, 1976.

91. Smith, D.C, Marsden, C.J, Lord, M., Roberts, L.M. Expression, purification and characterization of ricin vectors used for exogenous antigen delivery into the MHC class I presentation pathway. *Biol. Proced. Online* **5**(1), 13-19, 2003.
92. Eck, J., Langer, M., Möckel, B., Witthohon, Zinke, H., Lentzen, H. Characterization of recombinant and plant-derived mistletoe lectin and their B-chains. *Eur. J. Biochem.*, **262**, 788-797, 1999.
93. Goto, S.L., Beltramini, L.M., Moraes, D.I., Moreira, R.A., Araújo, A.P.U. *Abrus pulchellus* type-2 RIP, pulchellin: heterologous expression and refolding of the sugar-binding B chain. *Prot. Exp. Purif.* **31**, 12-18, 2003.
94. Blum, H., Beier, H., Gross, H.J. Improved silver-staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, **8**, 93-99, 1987.
95. Sreerama, N. & Woody, R.W. Estimation of protein secondary structure dichroism spectra: comparison of Contin, Selcon, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal. Biochem.* **287**, 252-260, 2000.
96. Halling, K.C., Halling, A.C., Murray, E.E., Ladin, B.F., Houston, L.L., Weaver, R.F. Genomic cloning and characterization of a ricin gene from *Ricinus communis*. *Nucleic Acids Res.* **13**, 8019-8033, 1985.
97. Van Damme, E.J., Hao, Q., Charels, D., Barre, A., Rougé, P., Van Leuven, F., Peumans, W.J. Characterization and molecular cloning of two different type 2 ribosome-inactivating proteins from monocotyledonous plant *Polygonatum multiflorum*. *Eur. J. Biochem.* **267**, 2746-2759, 2002.
98. Chambery, A., Di Maro, A., Monti, M.M., Stirpe, F., Parente, A. Volkensin from *Adenia volkensii* Harms (kilyambiti plant), a type 2 ribosome-inactivating protein. Gene cloning, expression and characterization of its A-chain. *Eur. J. Biochem.* **271**, 108-117, 2003.
99. Santos, A.R.D. Clonagem genômica e expressão do domínio toxina de uma RIP tipo 2 de *Abrus pulchellus*. São Carlos, 2002. 90p. Dissertação de Mestrado, UFSCar.
100. Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389-3402, 1997.

101. Silva, A.L.C, Goto, L.S., Dinarte, A.R., Hansen, D., Moreira, R.A., Beltramini, L.M., Araújo, A.P.U. Pulchellin, a highly toxic type 2 ribosome-inactivating protein from *Abrus pulchellus*. Cloning, heterologous expression of A-chain and structural studies. *FEBS J.*, **272**, 1201-1210, 2005.
102. Peumans, W.J., Hao, Q., Van Damme, E.J. Ribosome-inactivating proteins from plants more than RNA *N*-glycosidases?. *FASEB J.* **15**, 1483-1506, 2001.
103. Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **24**, 4876-4882, 1997.
104. Smith, D.B & Johnson, K.S. Single step purification of polypeptide expressed in *Escherichia coli* as fusion proteins with glutathione-S-transferase. *Gene* **67**, 31-40, 1988.
105. Hung, C.H., Lee, M.C., Chen, J.K., Lin, J.Y. Cloning and expression of three abrin A-chains and their mutants derived by site-specific mutagenesis in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **219**, 83-97, 1994.
106. Kelly, S.M., Price, N.C. The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding. *Biochim. Biophys. Acta.* **1338**, 161-185, 1997.
107. Woody, R.W. Circular dichroism of peptides and proteins. In: Nakanishi, K.; Berova, N; Woody, R.W. (eds.) **Circular Dichroism. Principles and Applications.** VCH Publishers, Inc., New York, 1994, p. 473-521.
108. Sandvig, K., Olsnes, S. Diphtheria-toxin entry into cells is facilitate by low pH. *J. Cell Biol.* **87**, 828-832, 1980.
109. Bushueva, T.L., Tonesvitsky, A.G. The effect of pH on the conformation and stability of the structure of plant-ricin. *FEBS letters* **215**(1), 155-159, 1987.
110. Ramalingam, T.S, Das, P.K., Podder, S.K. Ricin-membrane interaction: membrane penetration depth by fluorescence quenching and resonance energy transfer. *Biochemistry* **33**(40), 12247-12254, 1994.
111. Arroyo-Reyna, A., Hernández-Arana, A. The thermal denaturation of stem bromelian is consistent with a irreversible two-state model. *Biochem. Biophys. Acta.* **1248**, 1230-1238, 1995.

112. Wang, B.Z., Liu, W.Y. Refolding of partially thermo-unfolded cinnamomin A-chain mediated by B-chain. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **306**, 39-45, 2003.
113. Argent, R.H., Parrott, A.M., Day, P.J, Roberts, L.M., Stockleys, P.G., Lord, M.J., Radford, S.E. Ribosome-mediated folding of partially unfolded ricin A-chain. *J. Biological Chem.* **275**(13), 9263-9269, 2000.
114. Lackowicz, J.R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. Plenum Press, New York, 1983.
115. Lackowicz, J.R. Topics in fluorescence spectroscopy. **Vol.1: Techniques**. Plenum Press, New York, 1992.
116. Watanabe, K., Honjo, E., Tsukamoto, T., Funatsu, G. Fluorescence studies on the interaction of adenine with ricin A-chain. *FEBS Letters* **304**(2), 249-251, 1992.
117. Karpel, R.L, Henderson, L.E., Oroszlan, S. Interactions of retroviral structural proteins with single stranded nucleic acids. *J. Biol.Chem.* **262**, 4961-4967, 1987.
118. Endo Y., Tsurugi, K. 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, 1987.
119. Bradley, J.L., McGuire, P. Site-directed mutagenesis of ricin A chain Trp to Phe. *Int. J. Peptide Protein Res.* **35**, 365-366, 1990.
120. Stirpe, F., Bailey, S., Miller, S.P., Bodley, J.W. Modification of ribosomal RNA by ribosome-inactivating proteins from plants. *Nucleic Acids Res.* **16**(4), 1349-1357, 1988.
121. Kadokura, H., Katzen, F., Beckwith, J. Protein disulfide bond formation in prokaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 111-135, 2003.
122. Wei, C.H., Hartman, F.C., Pfuderer, P., Yang, W.K. Purification and characterization of two major toxic proteins from seeds of *Abrus precatorius*. *J. Biol. Chem.* **10**, 3061-3067, 1974
123. Hegde, R., Maiti, T.K., Podder, S.K. Purification and characterization of three toxins and two agglutinins from *Abrus precatorius* seed by using lactamyl-sepharose affinity chromatography. *Analytical Biochem.* **194**, 101-109, 1991.
124. Foulton, R.J., Toker, T.F., Vitteta, E.S., Uhr, J.W. Pharmacokinetics of tumor-reactive immunotoxins in tumor-bearing mice: effect of antibody valency and

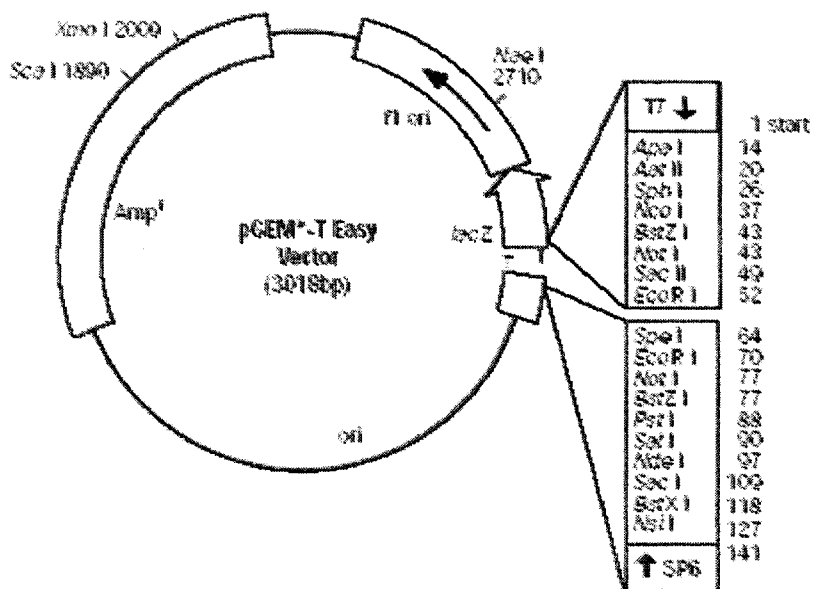
- deglycosylation of the ricin A-chain on clearance and tumor localization. *Cancer Res.* **48**, 2618-2625, 1988.
125. Huang, X.M., Bennett, M., Thorpe, P.E. Anti-tumor effects and lack of side effects in mice of an immunotoxin directed against human and mouse prostate-specific membrane antigen. *Prostate* **61**, 1-11, 2004.
126. Parrotta, J.A. **Healing plants of Peninsular India**. CAB International, Wallingford, UK. 944 p.
127. Guyot, M.J., Helmy, M., Frasca, S.L., Pigno, D., Piéroni, G., Beaumelle. Identification of the ricin lipase and implication in cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* **278**(19), 17006-17011, 2003.
128. Day, P.D., Pinheiro, T.J.T, Roberts, L.M., Lord, M.J. Binding of ricin A-chain to negatively charged phospholipid vesicles leads to protein structural changes and destabilizes the lipid bilayer. *Biochemistry* **41**, 2836-2843, 2002.
129. Mock, J.W., Ng, T.B., Wong, R.N., Yao, Q.Z., Yeung, H.W., Fong, W.P. Demonstration of ribonuclease activity in the plant ribosome-inactivating proteins alpha- and beta-momorcharins. *Life Sci.* **59**, 1853-1859, 1996.
130. Nicolas, E., Beggs, J.M., Haltiwanger, B.M., Taraschi, T.F. Direct evidence for the deoxyribonuclease activity of the plant ribosome-inactivating protein gelonin. *FEBS Lett.* **406**, 162-164, 1997.
131. Remi Shih, N.R., McDonald, K.A., Jackman, A.P., Girbes, T., Iglesias, R. Bifunctional plant defense enzymes with chitinase and ribosome-inactivating activities from *Trichosanthes kirilowii* cell cultures. *Plant Sci.* **130**, 145-150, 1997.
132. Helmy, M., Lombard, S., Pieroni, G. Ricin RCA<sub>60</sub>: evidence of its phospholipase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **258**, 252-255, 1999.



## **IX. APÊNDICES**

---

**APÊNDICE 1 – Vetor pGEM-T easy**

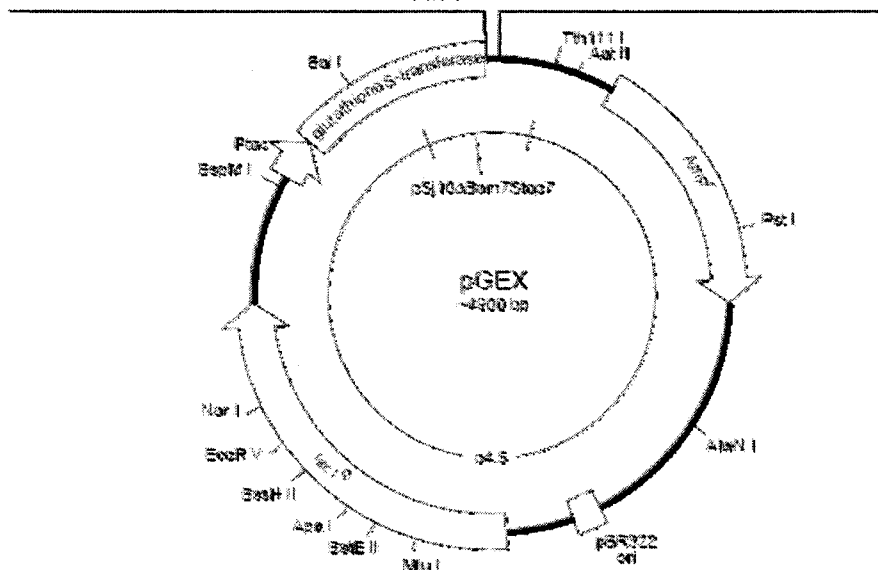


**APÊNDICE 2 – Vetor pGEX-5X-1**

pGEX-5X-1 (27-4584-01)

Factor Xa

Ile Glu Gly Arg<sup>1</sup> Gly Ile Pro Glu Phe Pro Gly Arg Leu Glu Arg Pro His Arg Asp  
 ATC GAA GGT CGT GGG ATC CCC GAA TTC CCG GGT CGA CTC GAG CCG CCG CAT CGT GAC TGA  
 BamH I EcoR I Sna I Sal I Xho I Not I Stop codons



**APÊNDICE 3 – Lista de abreviaturas de aminoácidos**

Ala	A	Alanina
Asn	N	Asparagina
Asp	D	Aspartato
Arg	R	Arginina
Cys	C	Cisteína
Gln	Q	Glutamina
Glu	E	Glutamato
Gly	G	Glicina
His	H	Histidina
Ile	I	Isoleucina
Leu	L	Leucina
Lys	K	Lisina
Met	M	Metionina
Phe	F	Fenilalanina
Pro	P	Prolina
Ser	S	Serina
Thr	T	Treonina
Trp	W	Triptofano
Tyr	Y	Tirosina
Val	V	Valina

## **X. ANEXOS**

---

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

## Cloning, heterologous expression of A-chain and structural studies

André L. C. Silva<sup>1</sup>, Leandro S. Goto<sup>1</sup>, Anemari R. Dinarte<sup>2</sup>, Daiane Hansen<sup>3</sup>, Renato A. Moreira<sup>4</sup>, Leila M. Beltramini<sup>1</sup> and Ana P. U. Araújo<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro de Biotecnologia Molecular Estrutural, Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, Brazil

<sup>2</sup> Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, Brazil

<sup>3</sup> Universidade Federal de São Paulo-EPM, Brazil

<sup>4</sup> 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  $\approx 60$  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; LD<sub>50</sub>, 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  $\approx 970$  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

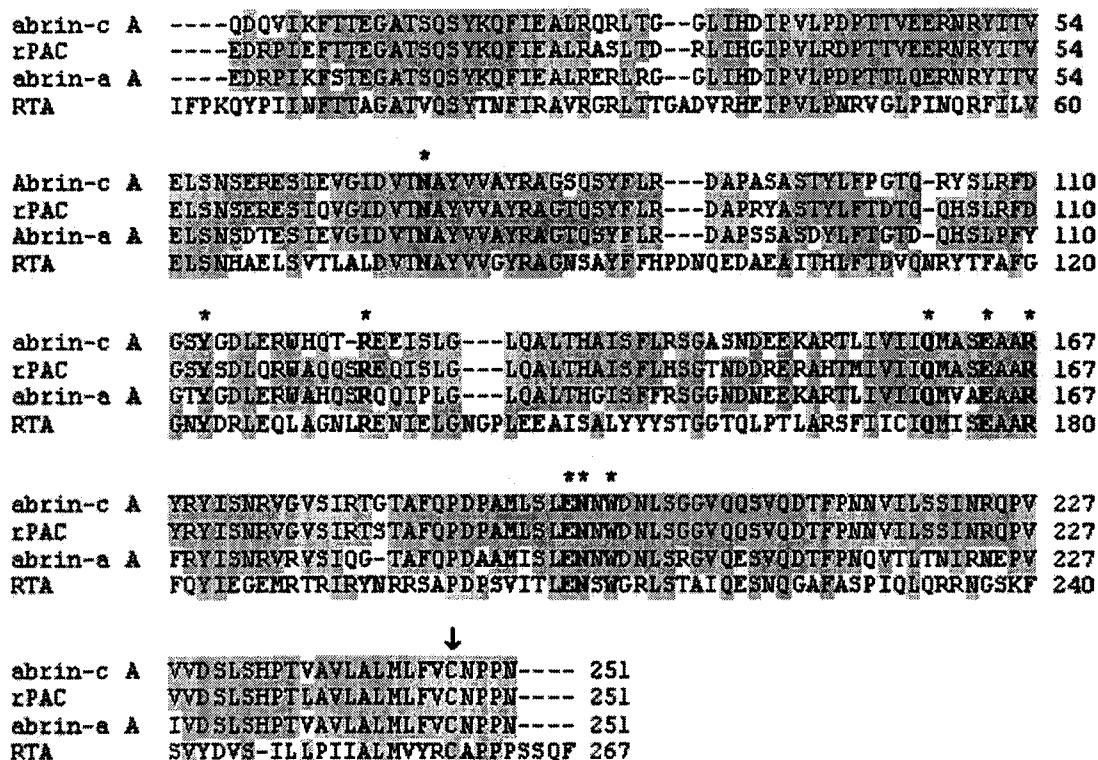
new set of primers giving rise to a product of  $\approx 850$  bp. The deduced amino acid sequence of this gene fragment showed a high identity to abrin-c (86%), abrin-a (78%) and ricin (38%) A-chain sequences (Fig. 1). The PAC sequence encodes a mature protein with a predicted molecular mass of around 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*

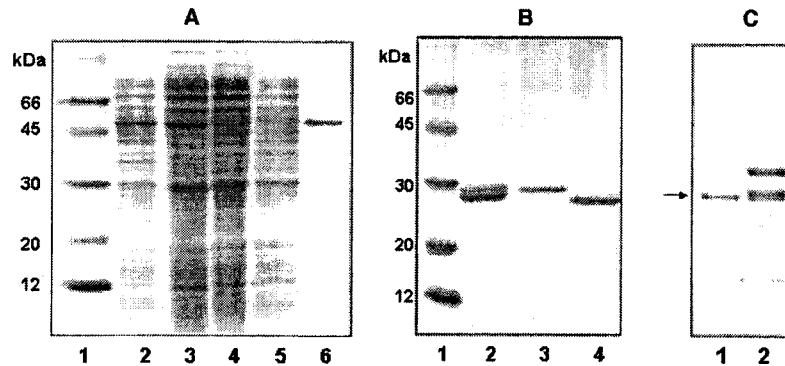
AD 202 harboring pGEX-rPAC was used to produce soluble recombinant fusion protein with the predicted molecular mass ( $\approx 60$  kDa) (Fig. 2A). The fusion protein was purified from the cell lysate by affinity chromatography on a glutathione-Sepharose column. After elution, the fusion protein was 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  $\approx 3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  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

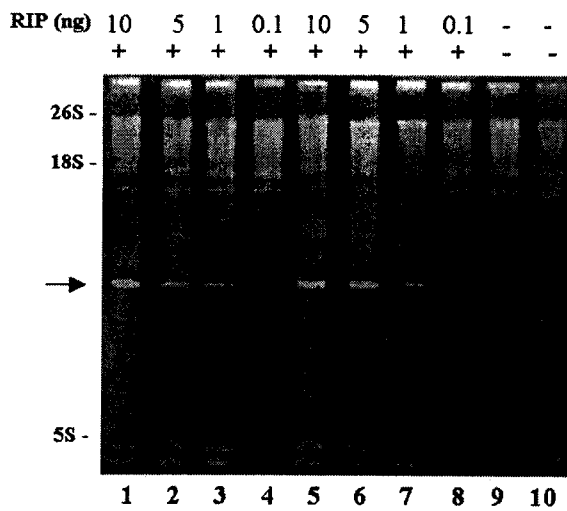
An RNA depurination test was used to confirm the *in vitro* enzymatic activity of rPAC. Figure 3 shows an



**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- $\beta$ -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 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  $\mu$ g) were incubated with different amounts (10, 5, 1 and 0.1 ng) of rPAC and native pulchellin for 1 h at 25 °C. The rRNAs were extracted and treated with 1 M aniline-acetic for 4 min at 60 °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

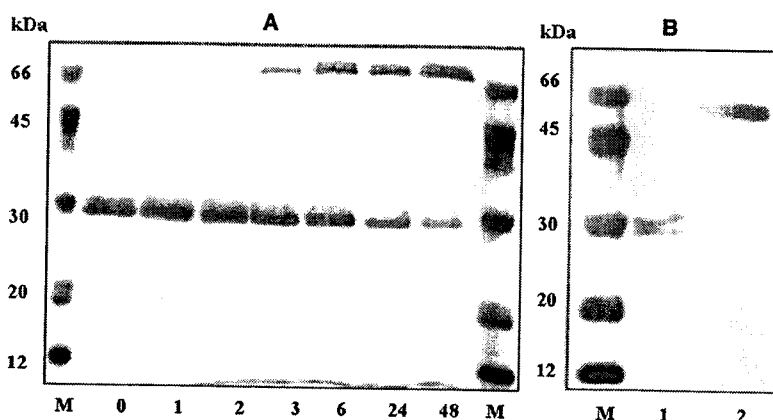
yeast ribosomes incubated with RIP at 10, 5 and 1 ng released a fragment of  $\approx$ 370 nucleotides. In contrast, incubation of ribosome with 0.1 ng did not result in depurination. The depurination assay performed in the absence of rPAC or native pulchellin also failed to generate the RNA fragment. 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 °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



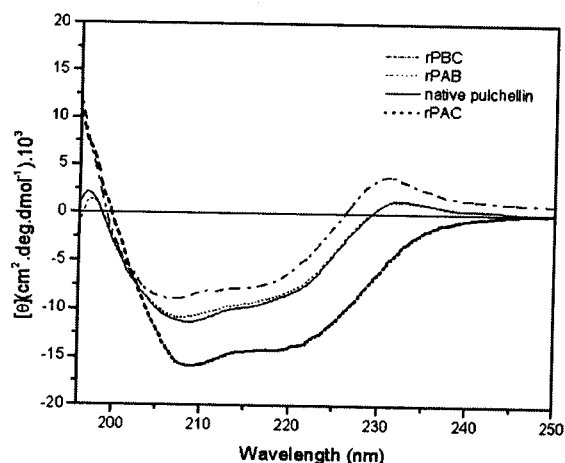
**Fig. 4.** *In vitro* association of rPAC with rPBC. (A) rPAC was incubated with rPBC in the presence of a reduced/oxidized cysteine system at 4 °C for 48 h. The reaction products were analyzed using 15% SDS/PAGE and were silver-stained. Lane M, protein marker; numbered lanes correspond to incubation times. rPAB heterodimer appears as an additional band of  $\approx 60$  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  $\approx 29.2$  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

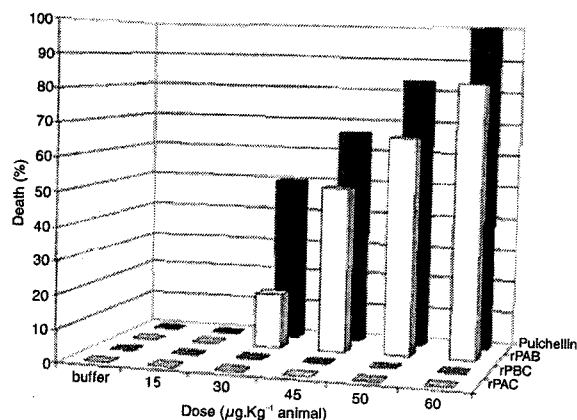
Circular dichroism (CD) measurements and biological tests were used to investigate the similarity between the native pulchellin and the rPAB heterodimer. Figure 5 shows the far-UV CD spectra of rPAC, rPBC, rPAB and native pulchellin. CD analyses for the rPAC



**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  $\alpha$ -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  $\beta$ -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 ( $\text{LD}_{50}$ ) 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  $\approx 370$  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  $\approx 400$  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- $\alpha$  (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- $\beta$ -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  $\mu$ 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 ACTTCAAAAGCTAYAARCARTT-3'; abrin 3: 5'-GGT TAAACACTTCCCGTTGGACCTDATNGT-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  $\mu$ g of *A. pulchellus* DNA template; 200  $\mu$ 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  $\mu$ 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- $\alpha$  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 TCTAGAGCATTTCGTCACATCGATACC-3' with 5'-AA GGAATT(dC)<sub>14</sub> 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 $\alpha$ -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 CCGCCCATTGAATTTACTACTG-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  $\mu$ 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- $\alpha$  competent  $\text{CaCl}_2$  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- $\beta$ -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<sub>i</sub> 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-Sepharose 4 Fast Flow (Amersham-Pharmacia) and the column was washed with 10 vol. of NaCl/P<sub>i</sub>. 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 Fator 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  $\mu\text{g}$ ) 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  $\mu\text{L}$ . 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  $\mu\text{g}$ ) was treated (for 4 min, at 60 °C) with 20  $\mu\text{L}$  of 1 M aniline-acetic (pH 4.5) or 20  $\mu\text{L}$  of H<sub>2</sub>O for nonaniline-treated controls. The reactions were stopped by the addition of 0.1 vol. of NH<sub>4</sub>OAc and 2.5 vol. of 100% ethanol and frozen before centrifugation for 1 h at 4 °C. The pellets were resuspended in 15  $\mu\text{L}$  of 60% formamide/0.1 $\times$  TPE (3.6 mM Tris, 3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 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 LD<sub>50</sub> 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  $\alpha$ -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.

## **CAPÍTULO 2**

---

**“Produção da pulchellina em cultura de tecidos vegetais”**

## I. INTRODUÇÃO

### 1. Considerações gerais sobre cultura de tecidos vegetais

A cultura de tecidos vegetais é definida como uma técnica de crescimento *in vitro* de células, tecidos e órgãos vegetais em um meio nutriente na ausência de microrganismos [1]. Atualmente, essa técnica tem sido extensivamente utilizada como uma ferramenta biotecnológica para o estudo do metabolismo, fisiologia, desenvolvimento e reprodução de plantas com propriedades desejáveis, tais como resistência a pragas e acúmulo de substâncias bioativas [2]. Entre outras aplicações da cultura de tecidos, ressaltamos a de ser um valioso instrumento na minimização e no controle de variáveis relacionadas com fatores ambientais que tanto interferem nas pesquisas envolvendo o estudo de plantas.

Um importante fato estudado por pesquisadores que atuam na área de cultura de tecidos, é a questão da diferenciação de células relacionada à biossíntese de compostos. Sabe-se que nas plantas certos compostos são sintetizados em tecidos e órgãos específicos. O que determina este comportamento característico da planta é o seu genoma [3]. Portanto é necessário elucidar os mecanismo e fatores que influenciam a expressão dos genes relacionados com a síntese de compostos específicos

O desenvolvimento histórico da tecnologia da cultura de tecidos está ligado à tentativa de demonstrar experimentalmente a totipotência. A teoria da totipotencialidade formulada por Shleiden e Theodor Schwann, em 1838, pode ser dita que constitui um dos primeiros fundamentos da cultura *in vitro*, embora seus formuladores nem tenham imaginado uma metodologia como essa. A teoria afirma que a célula é autônoma, portanto, contém todo o potencial necessário para originar um organismo completo; neste caso, uma planta completa (Shleiden & Schwann *apud* Barrueto Cid, 1998<sup>1</sup>). É claro que essa capacidade deve manifestar-se sob especiais condições de estímulo. Hoje, técnicas modernas permitem o cultivo *in vitro* sob condições físicas, químicas e biológicas ótimas e a manipulação dos explantes de formas impossíveis antes do advento da cultura de tecido [4].

---

<sup>1</sup> Shleiden e Theodor Schwann (1838) *apud* Barrueto Cid, L.P. Introdução aos hormônios vegetais. (eds) EMBRAPA, Recursos Genéticos e Biotecnologia, 205 p., 2000.



Haberlandt, um filósofo austro-húngaro, por volta de 1902, imbuído da teoria da totipotencialidade, foi o primeiro a manipular um sistema de cultura de tecidos de plantas, procurando estabelecer e consolidar um método *in vitro* de calogenese e micropropagação, o qual foi baseado na totipotencialidade das células (Haberlandt *apud* Dodds & Roberts, 1995<sup>II</sup>). Infelizmente, devido aos escassos conhecimentos sobre nutrição vegetal e, sobretudo, quanto aos "fitormônios" (compostos até então desconhecidos), impediram que Haberlandt obtivesse divisões celulares nos tecidos cultivados.

A primeira abordagem experimental bem sucedida para cultura de células ocorreu apenas em 1912, quando Burrow e Carrel estabeleceram um método para cultivar tecidos animais (Burrow & Carrel *apud* Dodds & Roberts, 1995<sup>III</sup>). Foram necessários mais alguns anos para que esse sucesso se estendesse para os tecidos vegetais.

Foi White, em 1939, que estabeleceu com êxito o primeiro trabalho de cultura de tecidos vegetais, com a elaboração de um meio (líquido) capaz de manter o crescimento de ápices radiculares de *Lycopersicum esculentum* por um período ilimitado (White *apud* Torres *et al.*, 1998<sup>IV</sup>). Ele também demonstrou a importância da tiamina para o crescimento de raízes *in vitro* e elaborou a "mistura orgânica" que leva o seu nome, utilizada até hoje nas formulações de meios nutritivos.

A importante descoberta e identificação do primeiro fitormônio, a auxina (ácido indolacético), possibilitou o estabelecimento e manutenção de tecidos não organizados de cenoura por período ilimitado de tempo (Gautheret *apud* Dodds & Roberts, 1995<sup>V</sup>).

---

<sup>II</sup> Haberlandt, G. Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien, Math. Nat. Classe 111, Abt.1, p.69-62, 1902, *apud* Dodds, J.H. & Roberts, L.W. Experiments in plant tissue culture. (3rd. ed.). Cambridge. 256p., 1995.

<sup>III</sup> Burrow, M.T. & Carrel, A. On the permanent life of tissues outside of the organism. *J. Exp. Med.*, 15, 516-528, 1912, *apud* Dodds, J.H. & Roberts, L.W. Experiments in plant tissue culture. (3rd. ed.). Cambridge. 256p., 1995.

<sup>IV</sup> White, P.R. Potentially unlimited growth of excised plant callus in an artificial nutrient. *Am. J. Bot.*, 26, 59-64, 1939, *apud* Torres, C., Caldas, L.S., Ferreira, A.T. Retrospectiva da cultura de tecidos. In: Torres, C., Caldas, L.S., Buso, J.A. (eds.). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: EMBRAPA-CNPQ, v.1, p. 11-20, 1998.

<sup>V</sup> Gautheret, R.J. Sur la possibilité de réaliser la culture indéfinie des tissus de turbeccules de carote. *C.R. Heab. Seances Acad. Sc.*, 208, 118-120, 1939, *apud* Dodds, J.H. & Roberts, L.W. Experiments in plant tissue culture. (3rd. ed.). Cambridge. 256p., 1995.

A descoberta da cinetina (primeira citocinina) por Miller, em 1955, também forneceu uma grande contribuição na área de cultura de tecidos e ao estudo da fisiologia de crescimento e desenvolvimento das plantas (Miller *apud* Torres *et al.*, 1998<sup>VI</sup>). O isolamento e a caracterização desse composto possibilitaram a substituição de misturas complexas, como leite de coco, por substâncias simples que promoviam a divisão celular. Auxina e citocinina mostram uma ação sinérgica no crescimento e divisão celular [5].

As propostas de novas composições químicas para os meios de cultura tiveram uma importância fundamental no desenvolvimento das pesquisas de cultura *in vitro*. Murashige e Skoog [6] desenvolveram um importante estudo sobre os requerimentos minerais de culturas de tecidos de tabaco. Como resultado desse estudo obteve-se a formulação de um meio mais concentrado em sais minerais, especialmente  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$ , em detrimento dos meios utilizados até então. Este meio favorecia um maior crescimento das culturas, cerca de cinco a sete vezes mais ativo comparativamente aos outros meios. Acompanhando esse trabalho, outros pesquisadores sugeriram outros meios de cultura, a maioria deles contendo uma alta concentração de sais minerais. A descoberta de novos hormônios e substâncias que podem atuar como reguladores de crescimento também tiveram um papel fundamental para o desenvolvimento da área de cultura de tecidos e células vegetais.

Além dos hormônios, outros fatores podem influenciar a diferenciação celular *in vitro*. Esses fatores são: carboidratos (como por exemplo, sacarose), fontes de nitrogênio inorgânico, aminoácidos, luz, temperatura, pressão osmótica e o genótipo [7].

## 2. Calogênese

Como relatado por Gautheret [8], os primeiros trabalhos com cultura de tecidos eram direcionados para a produção de calos. No contexto da cultura de tecidos, o termo calo é utilizado para denominar um tecido não organizado, formado por células que se multiplicam desordenadamente [9]. Embora, inicialmente, alguns pesquisadores tenham observado estruturas organizadas nos calos, a totipotência de células somáticas foi

---

<sup>VI</sup> Miller, C.O., Skoog, F., Saltz, M., Strong, F.M. Kinetin a cell division factor from desoxyribonucleic acid. *J. Am. Chem. Soc.*, 77, 1392-1398, 1955, *apud* Torres, C., Caldas, L.S., Ferreira, A.T. Retrospectiva da cultura de tecidos. In: Torres, C., Caldas, L.S., Buso, J.A. (eds.). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: EMBRAPA-CNPq, v.1, p. 11-20, 1998.

constatada apenas cerca de vinte anos mais tarde (Nobércourt *apud* Torres *et al.*, 1998<sup>VII</sup>). Posteriormente, vários outros pesquisadores reportaram o fenômeno de regeneração de plantas a partir de cultura de tecidos. Isto ocorria particularmente em algumas famílias de dicotiledôneas, como Solanaceae, Cruciferae e Umbelliferae. Mais recentemente, o sucesso da regeneração de plantas a partir de cultura de tecidos tem se estendido para outras famílias vegetais, incluindo as gramíneas.

Um dos fatores mais importantes para se obter a calogênese é a escolha do explante (tecido vegetal). A indução do calo pode ocorrer usando-se explantes de qualquer parte da planta, sob condições assépticas. Com o estímulo de substâncias endógenas de crescimento adicionadas ao meio, o metabolismo celular é modificado de quiescente para um metabolismo ativo [1, 10].

A adaptação dos calos aos reguladores de crescimento é importante por reduzir os problemas na regeneração de plantas, em decorrência de aberrações cromossômicas causadas por essas substâncias [11]. Além disso, normalmente os calos habituados são mais friáveis e crescem mais rapidamente do que os não adaptados.

Segundo Pasqual *et al.* [4], é possível estudar os padrões de crescimento e diferenciação da cultura de calos, que apresenta três estádios de desenvolvimento: indução da divisão celular, um período de ativa divisão celular e um período de diferenciação celular. Durante a fase de indução, as células preparam-se para se dividirem, o metabolismo é ativado e a célula permanece com o tamanho constante. A duração desta fase varia com o estagio fisiológico das células no explante inicial e das condições de cultivo empregadas. A divisão celular caracteriza-se por apresentar uma fase de síntese ativa, com diminuição do tamanho das novas células, graças às divisões sucessivas que acontecem no explante. Durante esta fase, ocorre rediferenciação das células para características parenquimáticas, resultando na formação do crescimento padrão. Eventualmente alguns pontos do calo rediferenciam-se em “pró-sistemas”, seguindo-se a diferenciação e formação de novas estruturas, e um novo ciclo é formado.

---

<sup>VII</sup> Nobércourt, P. Sur les radicles naissant des cultures de tissus de tubercule de carote. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 130, 1271-1272, 1939, *apud* Torres, C., Caldas, L.S., Ferreira, A.T. Retrospectiva da cultura de tecidos. In: Torres, C., Caldas, L.S., Buso, J.A. (eds.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: EMBRAPA-CNPq, v.1, p. 11-20, 1998.

Diferentes tipos de calos podem ser induzidos em leguminosas e em cereais, sendo que os mesmos podem diferir entre si pelas características morfológicas e pelo potencial de regeneração das plantas [12]. Entre os tipos de calos, podemos citar e definir os seguintes: o calo denominado embriogênico apresenta a formação de pequenos embriões somáticos capazes de regenerarem plantas completas, com raiz e parte aérea, visto que os mesmos são bipolares; o calo organogênico que apresenta pontos verdes correspondentes a centros meristemáticos capazes de regenerarem plantas através do processo de organogênese, a partir de órgãos; e o calo aquoso, formado de um tecido esponjoso, branco, translúcido e sem consistência. Segundo Nabors *et al.* [13] e Rashid e Quaraishi [14] este último tipo de calo não apresenta a capacidade de regenerar plantas. Na maioria dos cereais, inclusive aveia, o tipo de calo e o seu potencial regenerativo são influenciados por vários fatores incluindo: tipo de explante, genótipo, composição do meio e a seleção do tecido para subcultivo.

Historicamente, as monocotiledôneas são mais problemáticas quanto à indução de calos, quando comparadas às dicotiledôneas. Entretanto, trabalhos com várias espécies de cereais têm mostrado resultados satisfatórios [15, 16].

A cultura de calos apresenta as seguintes vantagens: 1) ela pode ser conduzida em ambientes controlados reduzindo a influência de fatores ambientais; 2) a produção de metabólitos secundários é bastante superior em tecidos maduros e o tempo necessário para o amadurecimento do tecido de calos é mínimo; 3) a purificação de certos metabólitos a partir de calos é mais simples uma vez que esses não possuem quantidades elevadas de pigmentos e de outros componentes; 4) a produção de calos está imune a interferências políticas relacionadas à preservação do meio ambiente [17]; 5) a produção de calos é mais facilmente ajustada para suprimir a demanda de substâncias químicas do mercado [18]. Segundo Balandrin e Klocke [19], no Japão, Alemanha e Canadá, pesquisas vêm sendo realizadas utilizando a técnica de cultura de células de plantas para produzir compostos medicinais de alto valor.

Os calos produzidos com a finalidade de estudos biossintéticos devem ser friáveis e não clorofilados (por isso são mantidos no escuro), o que pode dificultar bastante a extração de metabólitos secundários.

Para indução de calos, pode-se utilizar a injúria física dos tecidos do explante ou, mais comumente, a suplementação do meio de cultura com reguladores de crescimento. Estes agem na expressão gênica, fazendo com que a partir de células de tecidos organizados, se forme uma massa desorganizada de células cujo crescimento é geralmente rápido e bastante irregular.

Na cultura de calos, um suprimento exógeno de reguladores de crescimento é frequentemente necessário na indução em um explante qualquer. O requerimento exógeno de regulador (tipo, concentração e balanço auxina-citocinina) depende fortemente do genótipo e do conteúdo endógeno de hormônios. Estes requerimentos podem ser de três tipos principais: apenas as auxinas, apenas as citocininas ou ambas podem ser exigidas [1].

É comum o balanceamento de auxinas e citocininas no processo de diferenciação e acúmulo de metabólitos em tecidos vegetais, e quando usados juntamente, estimulam a divisão celular e controlam a morfogênese [20]. Porém este balanço varia grandemente com relação ao tipo de explante, tais como folhas, cotilédones, raízes, etc., e a espécie de planta com a qual se está trabalhando. A manipulação dos níveis adequados de auxina e citocininas é fundamental para definir o balanço de reguladores de crescimento para que haja indução de calogênese nos explantes [21].

A maioria dos meios de cultura utilizados na indução de calos, contém pelo menos um regulador de crescimento do grupo das auxinas e outro do grupo das citocininas. Estas duas classes de reguladores, em concentrações relativamente baixas, promovem respectivamente o crescimento das células diferenciadas e a divisão celular [22].

Os primeiros estudos sobre cultura de tecidos estabeleceram os padrões básicos de estímulo e resposta das células cultivadas *in vitro*. Os calos são submetidos a uma seqüência de mudanças de meios que permitem a sua manutenção e proliferação, bem como a subsequente morfogênese. Com a evolução das pesquisas nessa área, foram observadas mais profundamente, as respostas das células cultivadas *in vitro* em um número maior de espécies, constatando-se que as vias de desenvolvimento de plantas nessas culturas ocorrem de maneira bem mais complexa.

Atualmente sabe-se que existem duas vias básicas de regeneração de plantas a partir de cultura de tecidos: organogênese e embriogênese. O termo organogênese pode ser definido como a diferenciação e o desenvolvimento "de novo" de órgãos, parte aérea e

raízes, a partir de células meristemáticas de tecidos cultivados *in vitro* [5]. Ainda existem dúvidas se a origem dessas células meristemáticas provém de uma única célula ou de um grupo de células. Baseado em observações de quimeras, Stewart [23] sugeriu que a formação de um meristema apical envolve um grupo de três ou mais células que, por sua vez, podem ou não ser derivadas de uma única célula. No entanto, a baixa frequência ou ausência de quimeras em gemas adventícias e a alta frequência de mutantes não-quiméricos em plantas regeneradas sugerem sua origem a partir de uma célula única [24]. A embriogênese somática, por sua vez, define-se como um processo assexuado de desenvolvimento de embriões a partir de células somáticas, ou seja, células que não são produto de fusão gamética. Como discutido por Sharp *et al.* [25], podem ser distinguidos dois tipos de embriogênese somática: a direta e a indireta. Embriogênese direta refere-se ao desenvolvimento de um embrião diretamente a partir do tecido original do explante. A embriogênese somática indireta refere-se à formação de embriões a partir de calos ou suspensão celular ou de células ou grumos de células de embriões somáticos. Qualquer célula que possua a capacidade de se diferenciar em um embrião somático é dita com tendo competência embriogênica. Entretanto, ainda é desconhecido, se apenas são células alvo que respondem a sinais específicos, ou se todas as células somáticas possuem esta capacidade. Vários explantes podem ser utilizados para induzir a embriogênese somática, como exemplo: cotilédones, óvulos, folhas, embriões, hipocótilos, suspensões celulares, pólen e endospermas [26]. A seleção de explantes em estágios de desenvolvimento específicos, a escolha de meios de cultura específicos, a seqüência das subculturas e as condições do ambiente são essenciais para se obter sucesso no processo de embriogênese somática.

A aquisição de novos conhecimentos biotecnológicos na área de cultura de tecidos vegetais tem permitido o desenvolvimento da metodologia para diferentes espécies. Conforme definido por Costabel [27], a biotecnologia vegetal é um instrumento pelo qual se pode aumentar a formação e acúmulo de metabólitos desejáveis, modificando os produtos finais do metabolismo das espécies vegetais em questão. Os avanços na biotecnologia, particularmente dos métodos de cultivo celular de plantas e tecidos, permitem a utilização desses sistemas nas áreas de morfologia, patologia, bioquímica e genética, incluindo-se a agricultura. Essas novas tecnologias estão sendo ampliadas,

tornando possível a utilização de plantas e células vegetais como fontes renováveis de substâncias químicas valiosas [28].

### 3. Biossíntese de RIPs e outras proteínas vegetais em cultura de tecidos de plantas

Compreender os detalhes da biossíntese de proteínas específicas e dos mecanismos de controle envolvidos é fundamental para se obter a caracterização detalhada destas proteínas. Estudos deste tipo envolvem basicamente o isolamento, purificação, definição do comportamento físico-químico, determinação da composição e seqüência de aminoácidos, estrutura secundária e interações entre subunidades.

Estudos sobre a síntese e o acúmulo de macromoléculas são mais facilitados quando compreendidos *in vitro* do que *in vivo*. A elucidação de compostos-chave desses processos, a definição e controle das condições ambientais e variações experimentais são todas facilmente conseguidas sob circunstâncias pré-estabelecidas.

Várias técnicas podem ser utilizadas para o estudo *in vitro* da síntese de proteínas vegetais, entre elas, cultura de cotilédones imaturos e formação de calos a partir de explantes vegetais, incluindo órgãos de reserva.

A regulação do processo de diferenciação celular, do desenvolvimento de tecidos e órgãos completos em plantas está longe de ser inteiramente compreendido. Porém, sabe-se que entre as funções e influências das moléculas regulatórias, os papéis que as proteínas desempenham no evento da diferenciação celular são de extremo interesse. Entretanto poucos estudos sobre síntese de proteínas têm sido feito em calos.

Nos últimos anos, várias publicações têm relatado a presença de RIPs em cultura de calos e suspensões celulares [30, 31, 32, 33]. Segundo D'Silva *et al.* [34], as RIPs possivelmente participam na regulação da síntese de proteínas, multiplicação celular, mecanismo de defesa e reconhecimento celular.

Bhattacharay *et al* [35] foram os primeiros a estudarem a presença de RIP em cultura de tecidos de *Abrus precatorius*. Seis anos após a publicação desse trabalho, D'Silva *et al.* [34] também verificaram a presença de RIPs em calos e em cultura de suspensão celular obtidos a partir de cotilédones de *Ricinus communis* e *Abrus precatorius*.

RIPs também têm sido detectadas em cultura de calos obtidos utilizando além de cotilédones, outros explantes como raízes e hipocótilos. Por exemplo, Vivanco e Flores [36] verificaram a presença de uma RIP em calos e suspensões celulares obtidos a partir de raízes de *Mirabilis expansa*.

Outras proteínas também têm sido estudadas em calos de diferentes espécies vegetais. Etzler *et al.* [37], estudando a presença de lectina em calos de *Dolichos biflorus*, observou que a lectina presente nos calos de hipocótilos, de folha e de raiz era diferente da lectina presente na semente, e que, apresentava propriedades moleculares semelhantes àquela isolada do caule e folha.

Saare-Sierminski *et al.* [38], estudando a síntese de proteínas em calos de cotilédones e de hipocótilos de *Euphorbia pulcherrima*, verificaram a presença de um grupo de proteínas arabinogalactanas (APGs) envolvidas no processo de diferenciação e consiste de um grupo heterogêneo de proteoglicanos largamente distribuído no reino vegetal. O papel da APGs durante a diferenciação celular ainda é incerto, mas acredita-se que este seja um grupo multifuncional [30].

Estudos com lectinas via tecidos de plantas e cultura de células também têm sido realizados no intuito de elucidar sua biossíntese. Gupta e Srivastava [40] purificaram e caracterizaram uma lectina de calos de *Zizyphus mauritiana*. Jayarvardha *et al.* [41], também verificaram a biossíntese da lectina via calogênese, utilizando calos cotiledonares de *Canavalia virosa*.

Apesar do crescente número de estudos, pouco se sabe a respeito dos mecanismos de síntese das proteínas em cultura de tecidos, sendo necessária uma avaliação mais ampla em diferentes espécies, utilizando diferentes metodologias bioquímicas e de biologia molecular.



## **II. OBJETIVO**

---

## **II. OBJETIVO**

O principal objetivo dessa etapa do trabalho foi induzir a calogênese *in vitro* em cotilédones de *Abrus pulchellus* visando avaliar o potencial produção da pulchellina durante o desenvolvimento dos calos.

### **III. ESTRATÉGIA**

---

### III. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

Para alcançarmos o objetivo dessa segunda etapa, foi traçada a seguinte estratégia experimental:

- 1) Elaborar protocolos para a desinfestação dos explantes de *A. pulchellus*.
- 2) Avaliar o efeito de diferentes concentrações de auxinas, citocininas e sacarose na indução e na manutenção de calos em cotilédones de *A. pulchellus*.
- 3) Estabelecer uma curva de crescimento dos calos induzidos a partir de cotilédones de *A. pulchellus*.
- 4) Determinar o teor de proteínas solúveis dos calos obtidos
- 5) Detectar a presença da pulchellina nos calos através de ensaios de imunodeteção, testes de atividade hemaglutinante e de atividade tóxica.
- 6) Acompanhar a síntese da pulchellina durante o crescimento dos calos através ensaios eletroforéticos e de imunodeteção.
- 7) Isolar a pulchellina dos calos através de cromatografia de afinidade.
- 8) Detectar a presença do RNA mensageiro da pulchellina nos calos através de RT-PCR (Transcriptase Reversa - Reação em Cadeia da Polimerase) no intuito de verificar a síntese da pulchellina nos calos.

## **V. MÉTODOS**

---

## V. MÉTODOS

### 1. Esterilização dos cotilédones de sementes de *Abrus pulchellus*.

Visando a posterior indução de calogênese em cotilédones imaturos (45 dias) de sementes de *A. pulchellus*, um ensaio de esterilização dos explantes foi realizado de acordo com a metodologia de controle da contaminação por fungos ou bactérias, descrita por Silva *et al.* [42]. Foram utilizados os seguintes tratamentos para a descontaminação: lavagem em água corrente por 3 min, fricção com detergente neutro, imersão em hipoclorito de sódio 2,5 % por 5; 10; 15 e 20 min. Após esses tratamentos, os cotilédones foram lavados (3X) com água destilada estéril e inoculados ainda em câmara de fluxo laminar, em placas de Petri contendo apenas o meio básico MS suplementado apenas com Phytigel®, previamente autoclavado e com pH ajustado em 5,8. Após a inoculação, as placas foram mantidas em câmara incubadora no escuro, à temperatura de  $27 \pm 2$  °C por um período de 7 dias, durante o qual foi avaliada a contaminação dos explantes, através da percentagem de explantes intactos. Para cada tratamento foram utilizadas 4 placas contendo 25 explantes em cada placa.

### 2. Indução e manutenção de calos em cotilédones de *Abrus pulchellus*.

Após a retirada do tegumento das sementes, os cotilédones esterilizados foram cortados transversalmente, com auxílio de pinça e bisturi estéreis, em secções com aproximadamente as mesmas dimensões ( $8 \pm 2$  mm) para serem usados como explantes.

Com o objetivo de se obter um meio de cultura ideal para induzir calos, os explantes obtidos foram transferidos para placas de Petri (100 X 15 mm<sup>2</sup>) contendo 25 ml do meio básico MS [6] (apêndice I) contendo Phytigel® e suplementado com diferentes concentrações de reguladores de crescimento e sacarose (tabela 1). Em seguida foram incubados no escuro a uma temperatura de aproximadamente  $27 \pm 2$  °C, por cerca de 5 semanas. Após este período, foram calculadas as médias percentuais de formação de calos. Os calos obtidos foram removidos dos explantes e transferidos para novas placas contendo o meio de mesma composição utilizado para a indução\*.

---

\* Esse procedimento é denominado repicagem.

**Tabela 1** - Meios MS suplementados com diferentes concentrações de reguladores de crescimento e sacarose, utilizados para a indução de calos em cotilédones de *A. pulchellus*.

Meios	Reguladores de crescimento (mg.l <sup>-1</sup> )				Sacarose (g.l <sup>-1</sup> )
	Kin <sup>a</sup>	2,4-D <sup>b</sup>	BA <sup>c</sup>	ABA <sup>d</sup>	
MS1	-	-	-	-	2
MS2	-	-	-	-	3
MS3	0,1	-	-	-	2
MS4	0,1	2,0	-	-	2
MS5	0,1	3,0	-	-	2
MS6	-	2,0	-	-	2
MS7	-	3,0	-	-	2
MS8	0,1	-	-	-	3
MS9	0,1	2,0	-	-	3
MS10	0,1	3,0	-	-	3
MS11	-	2,0	-	-	3
MS12	-	3,0	-	-	3
MS13	-	-	2,2	-	2
MS14	-	-	2,2	0,6	2
MS15	-	-	-	0,6	2
MS16	-	-	2,2	-	3
MS17	-	-	2,2	0,6	3
MS18	-	-	-	0,6	3

<sup>a</sup>Cinetina; <sup>b</sup>Ácido 2,4-diclorofenoxiacético; <sup>c</sup>6-benzilamino-purina e <sup>d</sup>Ácido abscísico

### 3. Curva de Crescimento dos calos

O desenvolvimento dos calos no meio MS17 (contendo 2,2 mg.L<sup>-1</sup> de BA + 0,6 mg.L<sup>-1</sup> de ABA + 3% de sacarose) foi acompanhado através do estabelecimento de uma curva de crescimento tomando-se por base, as medidas de peso fresco e peso seco. Foram utilizados calos de cotilédones previamente estabelecidos, fazendo medidas com intervalos de 4 dias (0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28 e 32 dias). Para cada dia foi utilizada uma amostra de 25 calos para a determinação das médias e desvios padrões.

### 4. Extração e determinação do teor de proteínas solúveis dos calos.

Os calos obtidos do meio MS17 foram macerados e submetidos a extrações (1:10 p/v) com tampões a diferentes valores de pH (tampão glicina 100 mM pH 2,6; tampão acetato 100 mM pH 4,0; tampão acetato 100 mM pH 6,0; tampão Tris-HCl 100 mM pH 8,0 e tampão borato 100 mM pH 10,0) todos contendo NaCl 150 mM, durante 3 horas sob agitação, a temperatura ambiente. Em seguida, cada extração foi centrifugada (12.000 g) por 20 min, a 4 °C. O teor de proteínas solúveis nos extratos foi determinado pelo método de Bradford [43], usando BSA como padrão.

### 5. Acompanhamento da síntese protéica nos calos.

A síntese protéica nos calos de *A. pulchellus* foi acompanhada através do teor de proteínas solúveis pelo método de Bradford [43] e por eletroforese em SDS-PAGE, segundo a técnica de Laemmli [44]. Os calos removidos durante os diferentes dias (0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28 e 32 dias) da curva de crescimento foram submetidos a extrações de proteínas solúveis (1:10 p/v) com tampão Tris-HCl 100 mM pH 8,0 contendo NaCl 100 mM durante 3 h, sob agitação, à temperatura ambiente. Em seguida, os extratos foram centrifugados a 12.000 g durante 20 min, a 4 °C, os sobrenadantes foram utilizados na dosagem de proteínas.

Para os ensaios eletroforéticos foi usado um gel de aplicação de 3,5 % de acrilamida em tampão Tris-HCl 500 mM pH 6,8 e um gel de separação contendo 15 % de acrilamida em tampão Tris-HCl 3 M pH 8,8. A corrida foi desenvolvida a uma temperatura de 5 °C. As farinhas dos calos de cotilédones e de hipocótilos foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 62.5 mM pH 8,3 contendo SDS 1 % e β-mercaptoetanol, em seguida foram incubadas a 100 °C por 15 minutos. Alíquotas (15 µl) das amostras tratadas foram aplicadas no gel, que foi



submetido a uma corrente de 25 mA. As bandas protéicas foram reveladas com nitrato de prata, segundo a metodologia descrita por Blum *et al.* [45].

#### **6. Purificação da pulchellina dos calos.**

O extrato de calos obtido com o tampão Tris-HCl 100 mM pH 8,0 contendo NaCl 150 mM foi aplicado numa coluna de afinidade Sepharose-4B, previamente equilibrada com o tampão de extração. O extrato foi incubado junto à matriz cromatográfica por 30 min a temperatura ambiente. Inicialmente a coluna foi lavada com o tampão de extração para a remoção da fração protéica não retida. Em seguida, a fração retida (contendo a pulchellina) foi eluída com D-galactose 100 mM contendo NaCl 150 mM. Essa fração foi coletada e dialisada contra água destilada e/ou NaCl 150 mM para a retirada do açúcar ligante. A concentração protéica foi monitorada através de espectrofotômetro pela medida da absorbância a 280 nm. O grau de pureza e as atividades biológicas foram verificadas através de ensaios eletroforéticos, imunodeteção (*Western blot*), ensaios de hemaglutinação e de toxicidade.

#### **7. Ensaio de imunodeteção.**

A técnica de *Western blot* foi utilizada para a imunodeteção e conseqüente confirmação das bandas correspondentes à pulchellina. As amostras (pulchellina de sementes e pulchellina de calos) foram aplicadas no gel SDS-PAGE 15 %. Após a eletroforese, as proteínas presentes no gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Em seguida, a membrana foi colocada para reagir com o anticorpo primário (anti-pulchellina, com um título de 1:5000). A reatividade foi detectada pelo anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina, e, para o processo de coloração foram utilizados os agentes cromogênicos *NBT* e *BCIP* (BioRad). Para o procedimento de transferência utilizou-se o aparelho *TransBlot SemiDry* (BioRad).

#### **8. Ensaio de atividade hemaglutinante.**

O ensaio de atividade hemaglutinante foi realizado conforme a metodologia descrita por Moreira e Perrone [46]. Esse ensaio foi realizado em placa de microtitulação através de diluições seriadas. Resumidamente, 50 µl da amostra testada (extrato total dos calos e

### 9. Ensaio de toxicidade

Para os testes de atividade tóxica, diferentes diluições (1:5, 1:10, 1:20, 1:30 e 1:40 peso/volume) do extrato de calos obtido com o tampão Tris-HCl 100 mM pH 8,0 contendo NaCl 150 mM foram injetadas na cavidade intraperitoneal de camundongos sendo observadas as sintomatologias e o tempo de sobrevivência. A mortalidade foi expressa em termos de  $DL_{50}$  sendo esta definida como a quantidade de proteína capaz de matar 50% dos animais testados. Foram usados grupos de seis animais machos adultos, entre 20 – 25 g de peso. Após a injeção de cada dose, os efeitos tóxicos foram observados até um período de 72 h.

### 10. Isolamento de RNA total dos calos.

O RNA total dos calos foi isolado com o auxílio do *kit* comercial *RNeasy Plant* (QIAGEN) seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, 50 mg de calos foram congelados com nitrogênio líquido e macerados num almofariz até a consistência de pó fino. Em seguida o pó foi transferido para um tubo *ependorf* (*RNase-free*) e posteriormente usado para o isolamento do RNA através do *kit*. A concentração do RNA obtido foi determinada espectrofotometricamente pela medida da absorbância a 260 nm. A integridade o RNA foi checada através de eletroforese em gel de agarose (0,8 %) contendo 10 ml do tampão FA gel (200 mM de MOPS, 50 mM de NaOAc, 10 mM de EDTA, pH 7,0).

### 11. Síntese do cDNA da cadeia tóxica da pulchellina através de RT-PCR.

RT-PCR é uma técnica que permite a síntese de cDNA a partir do RNA através da ação da enzima transcriptase reversa. Para esse ensaio foi utilizada uma mistura de reação (20  $\mu$ l) contendo: RNA total (~ 3  $\mu$ g); 15 pmol. $\mu$ l<sup>-1</sup> do *primer* PucA reverse (5'-ATAGTTTAGCGGCCGCTCAATTTGGCGATTGCAGAC-3'); tampão de reação (Tris-HCl 250 mM, pH 8,3 com 375 mM de KCl e 15 mM de MgCl<sub>2</sub>); 100 mM de dNTP *mix* e 200 U de transcriptase reversa. Essa mistura foi incubada por 1h a 37 °C. Para a reação de amplificação (PCR) foi utilizado: 5  $\mu$ l do produto da reação da transcriptase reversa com o cDNA específico para a cadeia A da pulchellina; tampão do PCR (Tris-HCl 200 mM, pH 8,4 com 500 mM de KCl e 50 mM de MgCl<sub>2</sub>); 10 mM de dNTP *mix*; 15 pmol. $\mu$ l<sup>-1</sup> de cada

*primer PucA-blunt sense* (5'- GGAGGACCGGCCCATTTGAATTTACTACTG – 3') e *PucA reverse* (5'- ATAGTTTAGCGGCCGCTCAATTTGGCGATTGCAGAC – 3') e 5 U da enzima *Taq* DNA polimerase. A reação de amplificação foi realizada num termociclador PTC-100 (M.J. Reseach Inc.) sob as seguintes condições: 1 ciclo de 94 °C por 5 min; 40 ciclos de 96 °C (1 min), 57 °C (1 min) e 72 °C (1 min); e um ciclo de 72 °C por 10 min. A visualização do fragmento amplificado foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 0,8 % em tampão TAE (1X), corado com brometo de etídio e visualizado sob luz UV. O padrão utilizado foi 1 Kb DNA *Ladder* (GibcoBRL)

## **VI. RESULTADOS E DISCUSSÕES**

---

## VI. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 1. Esterilização dos cotilédones de sementes de *Abrus pulchellus*.

A cultura de tecidos compreende um conjunto de técnicas que necessitam ser realizadas sob rigorosas condições assépticas [1, 4]. Portanto, qualquer agente (fungos e/ou bactérias) contaminante que entrar em contato com o meio de cultura terá condições de se desenvolver e, como consequência, inviabilizar a cultura. Várias substâncias com ação germicida podem ser utilizadas para realizar a desinfestação dos explantes. As mais comuns são os compostos a base de cloro, por exemplo, o hipoclorito de sódio, devido à sua facilidade de remoção e sua alta eficiência. Em experimentos com cultura de tecidos, o hipoclorito geralmente é utilizado na concentração de 0,5 a 2,5% e mantido em contato com os explantes durante 5 a 20 min [4].

Dos períodos de imersão em hipoclorito de sódio (2,5%) testados em explantes (cotilédones) de *A. pulchellus*, os que apresentaram os melhores resultados foram os de 5 e 10 minutos, obtendo-se 85 e 100% de explantes intactos, respectivamente. Este resultado indica que a adequação dos procedimentos para a desinfestação permitiu um controle satisfatório da contaminação dos explantes. Os demais tempos testados não se mostraram eficientes. Isto se deve, provavelmente a danificação do tecido durante o tratamento, o que pode causar a morte do tecido e também facilitar a ação dos microrganismos contaminantes.

### 2. Indução e manutenção de calos em cotilédones de *A. pulchellus*.

Os resultados mostraram que 35 dias após a inoculação dos explantes, quase todos os meios testados foram capazes de induzir calos nos cotilédones de *A. pulchellus*, com exceção dos meios MS1 e MS2, os quais na sua composição não continham reguladores de crescimento (Tabela 2). Os meios que continham apenas cinetina e sacarose (MS3 e MS8), não foram capazes de induzir a formação de calos ou então apresentaram mais baixas taxas de indução, ocorrendo sutil aumento em relação à concentração de sacarose no meio. Isso pode ser um indicativo de que a adição apenas de cinetina ao meio básico MS, não seja suficiente para induzir eficientemente a formação de calos em cotilédones de *A. pulchellus*.

Outra possível explicação para o pequeno aumento na taxa de indução de calos nos meios MS3 e MS8 seria que, como as células de tecidos vegetais cultivados *in vitro* são praticamente todas heterotróficas [4, 9], além do estímulo hormonal para induzir o início da multiplicação celular e conseqüente formação de calos, é preciso a incorporação de uma fonte externa fornecedora de energia, rica em carbono (no caso a sacarose), necessária para formação de macromoléculas celulares. Segundo Pasqual *et al.* [47], o nível ótimo de sacarose que contribui para induzir morfogênese ou crescimento celular difere entre genótipos, mas geralmente está entre 2 a 4 %. No caso de *A. pulchellus*, verificou-se um moderado aumento no percentual de calos em meios contendo 3% de sacarose, igualmente a resultados obtidos em outros trabalhos [48]. O uso de concentrações mais altas de sacarose é mais comum quando se trata do estabelecimento e manutenção de calos e não da indução de formação de calos, já que estudos envolvendo a indução da calogênese em explantes de diferentes espécies, mostraram que os meios de cultura contendo baixas concentrações ou que não continham sacarose foram capazes de induzir a formação de calos [21]. Resultados obtidos por outros autores, mostraram que em níveis adequados, os reguladores de crescimento, isolados ou interagindo, são capazes de induzir a formação de calos e que provavelmente as novas células produzidas nos calos utilizariam minerais e outras fontes de carbono diferentes da sacarose, contidas no meio básico MS, no agente gelificante do meio ou no próprio explante [9, 21, 22].

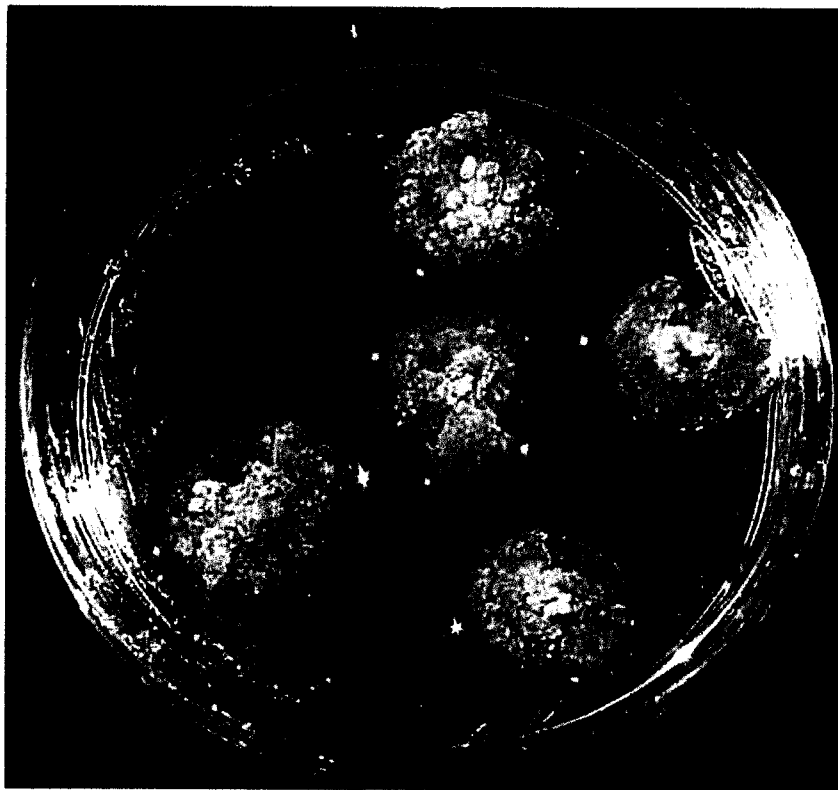
De um modo geral, os meios contendo 2,4-D e/ou cinetina não foram tão eficientes para a indução de calos em cotilédones de *A. pulchellus* quanto aqueles que continham BA e/ou ABA. Devido à capacidade de estimular eficientemente a divisão celular em tecidos de diversas plantas [20, 49], o 2,4-D é uma das auxinas mais utilizadas para induzir a formação de calos em sementes de leguminosas. Porém D'Silva *et al.* [34] mostraram que meios suplementados com BA e ABA, ou somente com BA, foram significativamente mais eficientes do que os meios suplementados com 2,4-D e/ou cinetina para induzir calos em *Abrus precatorius*, outra espécie do gênero *Abrus*. Esses resultados concordam os que foram obtidos para *Abrus pulchellus* [50], nos quais os meios MS13, MS14, MS16, MS17 mostraram-se mais eficientes na indução do processo de calogênese. Vale ressaltar que os calos obtidos nos meios contendo 2,4-D e/ou cinetina eram pouco friáveis e parcialmente oxidados, características que afetam e/ou inviabilizam o subcultivo e a manutenção da

cultura. O meio MS17 foi escolhido para o subcultivo da cultura, pois além promover uma maior taxa de indução, os calos (Figura 2) obtidos desse meio eram mais friáveis, menos oxidados e apresentavam uma maior massa celular [50], fatores favoráveis para a manutenção da cultura.

**Tabela 2** – Percentagem de calos em meios MS suplementados com diferentes concentrações de reguladores de crescimento e sacarose, utilizados para a indução de calos em cotilédones de *A. pulchellus*.

Meios	Reguladores de crescimento (mg.l <sup>-1</sup> )				Sacarose (g.l <sup>-1</sup> )	Calos (%)
	Kin <sup>a</sup>	2,4-D <sup>b</sup>	BA <sup>c</sup>	ABA <sup>d</sup>		
MS1	-	-	-	-	2	0
MS2	-	-	-	-	3	0
MS3	0,1	-	-	-	2	20
MS4	0,1	2,0	-	-	2	53,3
MS5	0,1	3,0	-	-	2	55,5
MS6	-	2,0	-	-	2	57,7
MS7	-	3,0	-	-	2	60
MS8	0,1	-	-	-	3	26,6
MS9	0,1	2,0	-	-	3	55,5
MS10	0,1	3,0	-	-	3	60
MS11	-	2,0	-	-	3	64,4
MS12	-	3,0	-	-	3	66,6
MS13	-	-	2,2	-	2	71
MS14	-	-	2,2	0,6	2	80
MS15	-	-	-	0,6	2	22,6
MS16	-	-	2,2	-	3	73,3
MS17	-	-	2,2	0,6	3	100
MS18	-	-	-	0,6	3	28,8

<sup>a</sup>Cinetina; <sup>b</sup>Ácido 2,4-diclorofenoxiacético; <sup>c</sup>6-benzilamino-purina e <sup>d</sup>Ácido abséscico



**Figura 2 – Calos friáveis de cotilédones de *A. pulchellus* induzidos e subcultivados no meio de cultura MS17 (suplementado com 2,2 mg/ml de BA, 0,6 mg/ml de ABA e 3 g/l de sacarose) após um período de 35 dias.**



### 3. Curva de Crescimento

Após o segundo subcultivo da cultura de calos cotiledonares de *A. pulchellus* em meio MS17, o desenvolvimento dos calos foi acompanhado através da elaboração de uma curva de crescimento. Segundo Dodds e Roberts [7], pode-se distinguir no crescimento dos calos 5 diferentes fases bem como os eventos metabólicos que lhes são peculiares (Figura 3). Com base nessas fases pode-se estudar os padrões de crescimento e diferenciação a partir de uma determinada cultura de calos ou suspensão celular.

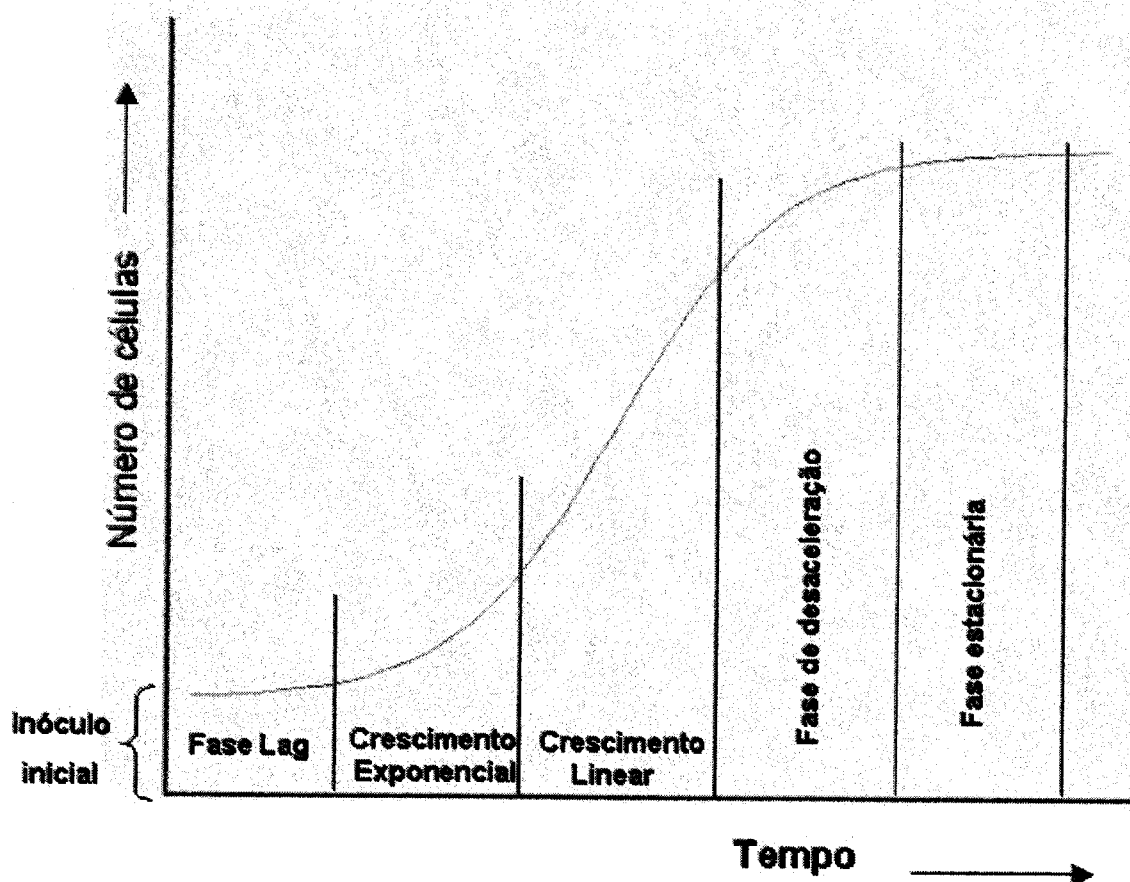


Figura 3 – Diagrama das fases de crescimento de uma cultura de células em calos ou em suspensão celular [7].

A figura 4 mostra a curva de crescimento dos calos de *A. pulchellus*, obtida a partir do peso fresco. Pode-se observar nesta figura que a curva de crescimento também apresenta um padrão sigmoidal, possibilitando a identificação de cada fase conforme o diagrama de

Dodds e Roberts [7]. A fase lag, na qual as células preparam-se para a divisão celular, ocorreu até o 6º dia. O período de máxima divisão celular ocorre na fase exponencial [4]. De acordo com o gráfico de crescimento, a fase exponencial ocorreu entre o 6º e o 14º dia. Nesta fase pode-se observar um rápido crescimento dos calos devido à intensa divisão celular característica deste período. De acordo com Scragg e Allan [51], a fase lag é considerada como uma fase produtora de energia e a fase exponencial como uma fase biossintética. A fase linear ou período de crescimento é aquela na qual as células crescem, porém a divisão celular diminui, conforme cita Krikorian [52]. Essa fase ocorreu entre o 14º e o 22º dia. A fase de desaceleração do crescimento é o período em que se deve fazer a transferência do cultivo para um novo meio nutritivo, devido à exaustão de nutrientes no meio, presença de produtos tóxicos, desidratação do agente gelificante e redução de O<sub>2</sub> no interior das células [53]. Conforme foi observado, a fase de desaceleração ocorreu entre o 22º e o 28º. Por fim, a fase estacionária acontecendo entre 28º e o 36º dia. Essa fase estacionária é o período no qual o número de células se mantém constante, e geralmente, ocorre o maior acúmulo de proteínas e metabólitos secundários. Porém este acúmulo pode ocorrer em fases distintas do crescimento celular [54]. Os nutrientes do meio podem influenciar a passagem de uma fase para outra, acelerando-a ou retardando-a. Sendo assim, torna-se importante obter informações sobre a existência de algum componente limitante (reguladores ou nutrientes), pois, através dele pode-se ter um controle sobre a longevidade da fase estacionária [7]. Com base nessas informações decidiu-se utilizar calos de *A. pulchellus* obtidos 35 dias após o subcultivo para a determinação de proteínas solúveis.

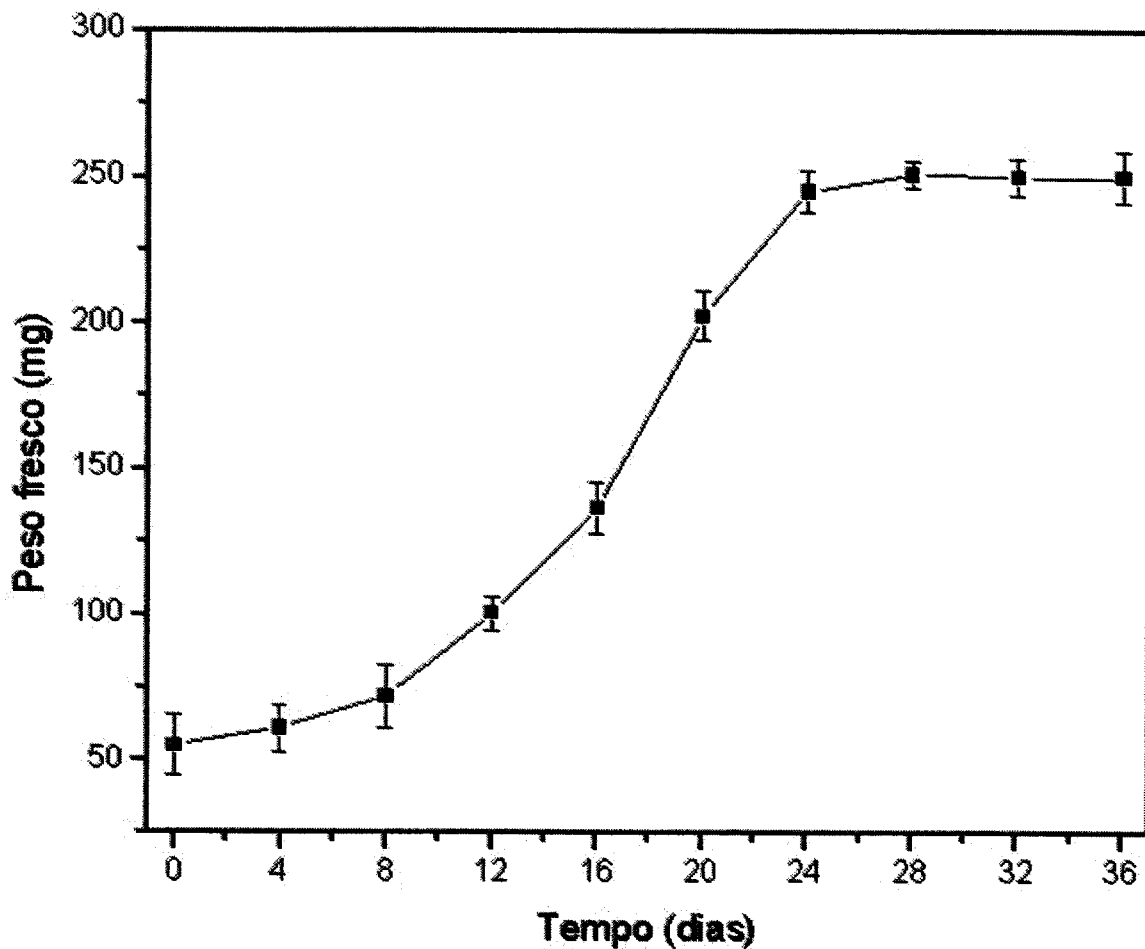


Figura 4 – Curva de crescimento baseada no peso fresco dos calos cotiledonares de *A. pulchellus*.

#### 4. Dosagem de proteínas solúveis e testes de atividade com os extratos de calos.

Quando os extratos totais dos calos de cotilédones foram submetidos a ensaios de dosagem de proteínas utilizando o método de Bradford [43], verificou-se que o pH 2,6 apresentou o menor teor de proteínas solúveis extraídas (0,06 mgProteína/gCalos) e o pH 10, o maior teor (0,7 mgProteína/gCalos) (Figura 5). Esses valores são expressivamente baixos quando comparados a teores de proteínas solúveis obtidos para calos de outras espécies, como por exemplo, de *Zizyphus mauritiana*, cujos calos de cotilédones apresentaram um teor de proteínas solúveis de 28,74 mgProteína/gCalos [40].

Como o objetivo central de trabalho era verificar a presença da pulchellina [55] nos calos, resolveu-se testar a atividade hemaglutinante dos extratos protéicos obtidos nos diferentes valores de pH. No entanto, quando esses extratos protéicos foram testados, apenas os extratos nos valores de pH 6 e 7,6 foram capazes de aglutinar eritrócitos de coelho, ambos com uma atividade de 64 UH/ml. Esses resultados concordam com os obtidos para pulchellina de semente, a qual teve sua atividade lectínica abolida ou reduzida em valores extremos de pH [56].

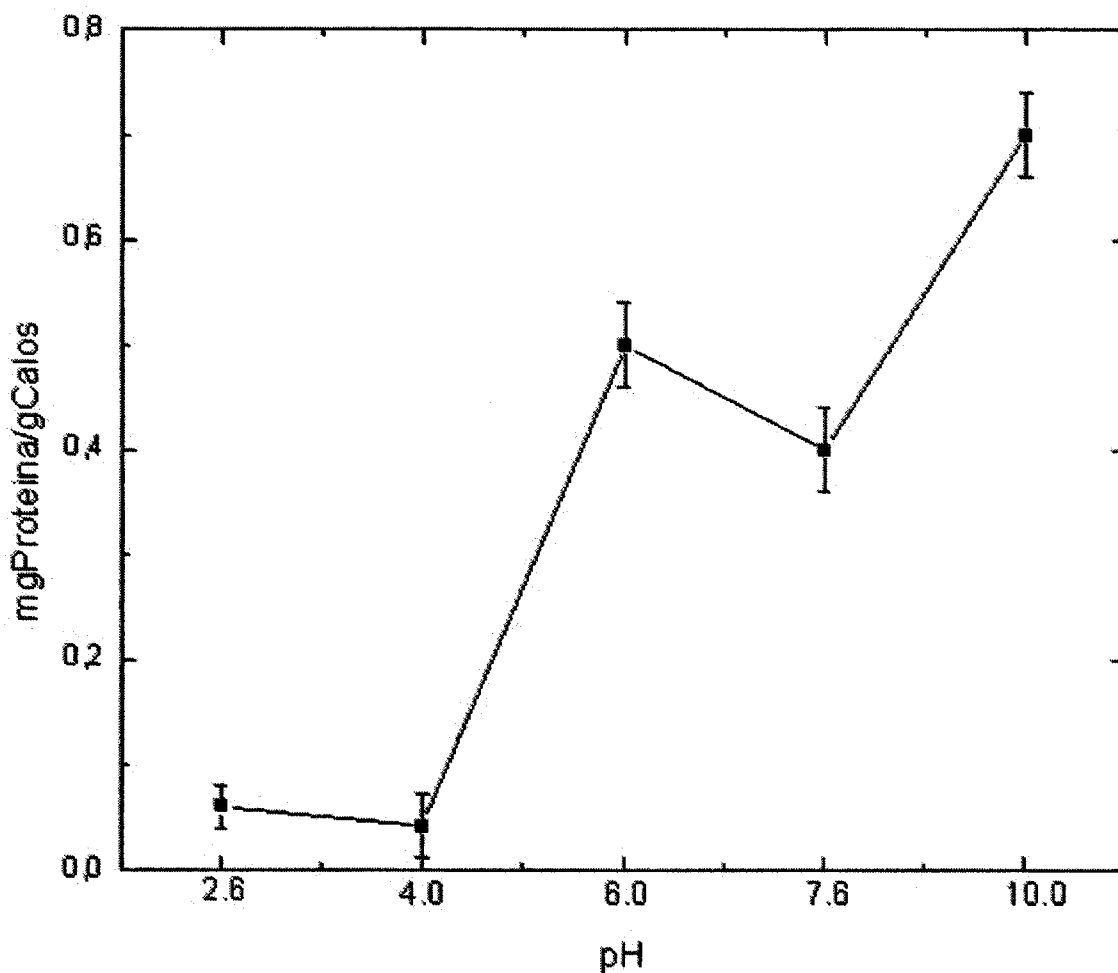


Figura 5 – Dosagem de proteínas solúveis dos calos de *A. pulchellus* extraídas em diferentes valores de pH. Os ensaios foram realizados pelo método de Bradford [43].

Para avaliar a atividade tóxica do extrato obtido a pH 7,6, doses contendo diferentes diluições desse extrato protéico foram injetadas na cavidade intraperitoneal de camundongos adultos e os resultados obtidos foram expressos em termos de dose letal média ( $DL_{50}$ ). O motivo da escolha do extrato nesse pH, foi simplesmente para manter o padrão comparativo, uma vez que a pulchellina de sementes (usada como controle positivo) estava em tampão Tris-HCl 100 mM pH 7,6 contendo NaCl 150 mM. Como pode ser observado na tabela 3, após 48 h de ensaio o extrato dos calos diluído 1:20 (v/v) foi capaz de matar 50% dos animais testados com uma dose 5  $\mu$ g Proteína total/g de peso corpóreo do animal. Esse valor foi significativamente maior do que aquele observado para a pulchellina nativa (0,03  $\mu$ g/g de peso corpóreo) [55]. Esses dados sugerem que as células estão sintetizando a pulchellina, porém em baixíssimas quantidades. Foi observado ainda, que doses subletais também levaram alguns animais a morte após 72 h de experimento, igualmente ao observado para a pulchellina nativa. Os efeitos de intoxicação mais comuns apresentados pelos animais foram: diarreia, olhos semi-fechados, pêlos eriçados e hipoatividade. Esses sintomas foram anteriormente apresentados por animais intoxicados com a pulchellina isolada de sementes e são bastante comuns em casos de intoxicação com RIPs tipo 2 [57].

**Tabela 3** – Atividade tóxica determinada através de injeção intraperitoneal em camundongos, utilizando diferentes diluições do extrato total de calos de *A. pulchellus*.

<b>Extrato total de calos*</b> <b>(diluição)</b>	<b><math>\mu</math>gProteína/gAnimal</b>	<b>Mortalidade</b> <b>(%)</b>
1:5	22.2	100
1:10	10.8	80
1:20	5.6	50
1:30	3.5	-
1:40	2.8	-

\*Obtido com tampão Tris-HCl 100 mM pH 7,6 contendo NaCl 150 mM

### 5. Acompanhamento da síntese protéica nos calos.

Os resultados obtidos com a dosagem de proteínas solúveis nos diferentes dias da curva de crescimento dos calos de *A. pulchellus* indicam que no período de 0 a 12 dias houve uma redução no teor protéico dos calos (Figura 6). Essa redução pode ter ocorrido pelo fato dos calos necessitarem de um período de adaptação ao meio, ou seja, um período para começarem a absorver os nutrientes presentes no meio de cultura. Possivelmente, a elevada atividade metabólica das células durante este período aliada à necessidade de adaptação para começar a nutrir-se do meio tenha levado os calos a utilizarem parte das reservas protéicas para investir no crescimento. Segundo Sacchi *et al.* [58], para manter a taxa de crescimento, os calos de *Actinea deliciosa* mantidos *in vitro*, adaptaram seu metabolismo em relação à disponibilidade de nutrientes no meio ou acúmulo de produtos catabólitos. Como pôde ser observado, os calos de *A. pulchellus* atingiram os maiores teores de proteínas totais a partir do 24<sup>o</sup> dia, havendo um decréscimo moderado após 28<sup>o</sup> dia. Lal *et al.* [59] também observaram um aumento no conteúdo de proteínas durante a fase de crescimento dos calos induzidos em cana-de-açúcar e decréscimo destes teores durante a fase de diferenciação. Rajyalakshimi *et al.* [60], mostraram que o conteúdo de proteínas solúveis em relação ao peso fresco diferem entre os tipos de calos induzidos a partir de diferentes tipos de explantes.

Através dos resultados obtidos com os ensaios eletroforéticos dos calos coletados nos diferentes dias da curva de crescimento, pôde-se observar uma redução no número de bandas protéicas até 12<sup>o</sup> dia em relação ao dia zero (Figura 7). Esta aparente diminuição na intensidade de algumas bandas protéicas pode ser uma confirmação dos resultados obtidos no ensaio de dosagem de proteínas, ou seja, que realmente ocorre uma redução do teor de proteínas nesse período. O aumento observado na curva de crescimento dos calos após o 12<sup>o</sup> dia deve-se provavelmente à síntese de componentes estruturais e de outros metabólitos, o que é característico desse período. Pôde-se observar ainda, que no intervalo entre o 4<sup>o</sup> e o 28<sup>o</sup> dia algumas bandas protéicas aumentam de intensidade e/ou reaparecem sugerindo que certas proteínas possam estar sendo consumidas e novamente sintetizadas sugerindo a ocorrência do processo de "síntese de novo". Esses resultados confirmam os obtidos com os testes de dosagem de proteínas solúveis. Além disso, as bandas protéicas

de massas moleculares equivalentes a da pulchellina nativa ( $\approx 29$  e  $31$  kDa) [55] são preservadas durante o crescimento dos calos, ocorrendo uma aparente redução da banda equivalente a cadeia lectínica ( $\approx 31$  kDa). Para identificar quais das bandas protéicas eram referentes pulchellina, um ensaio de imunodeteção foi realizado usando-se a técnica de *Western blot* conforme foi descrito no item Métodos. Na figura 8 pode ser observado que os anticorpos anti-pulchellina nativa foram capazes de reconhecer e interagir fortemente com as bandas protéicas referentes às cadeias tóxica e lectínica da pulchellina presente nos calos.

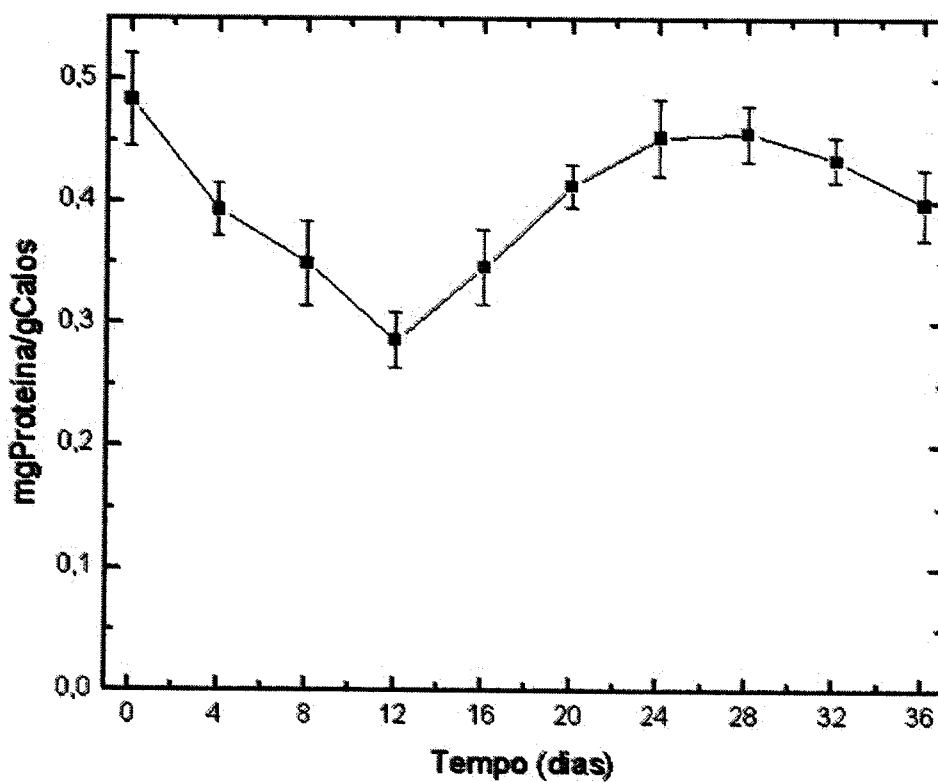
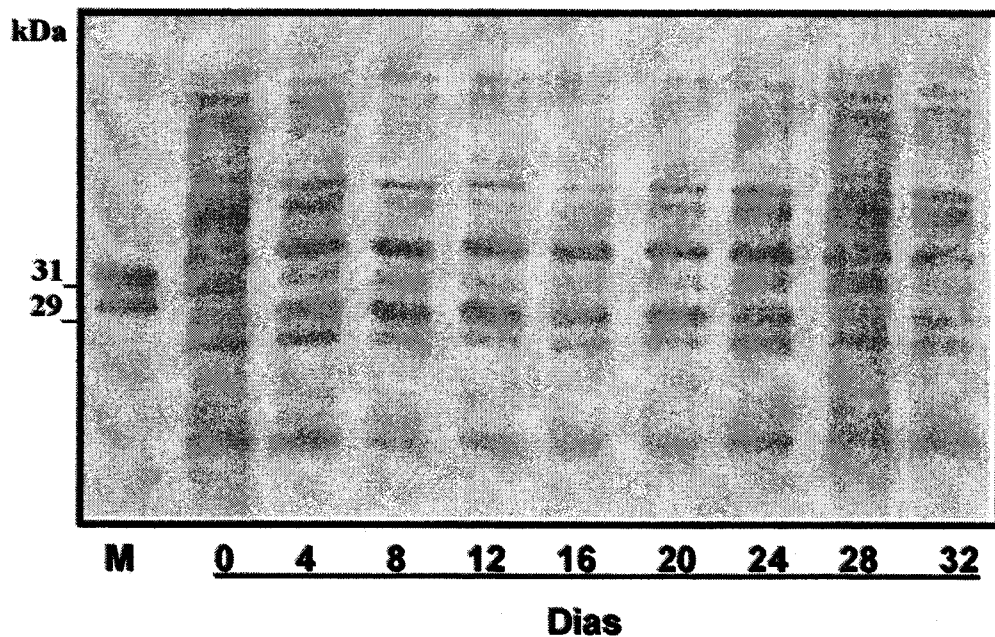
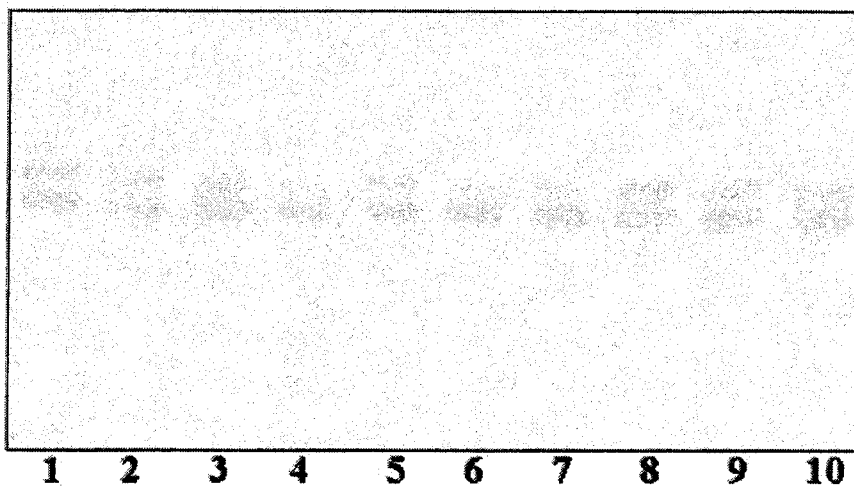


Figura 6 – Dosagem de proteínas dos calos cotiledonares de *A. pulchellus* obtidos durante os diferentes dias de crescimento. Os ensaios foram realizados pelo método de Bradford [43].



**Figura 7 – Análise dos extratos totais dos calos cotiledonares de *A. pulchellus* obtidos durante os diferentes dias de crescimento através de SDS-PAGE 15 %. A pulchellina nativa (M) foi usada como referência. O gel foi revelado com nitrato de prata conforme o método de Blum [45].**



**Figura 8 – Imunodeteccção da pulchellina em calos através da técnica de *Western blot*. Colunas: 1) Controle positivo (pulchellina nativa); 2 a 10) Extratos totais dos calos obtidos nos diferentes dias de crescimento (0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28 e 32 dias).**

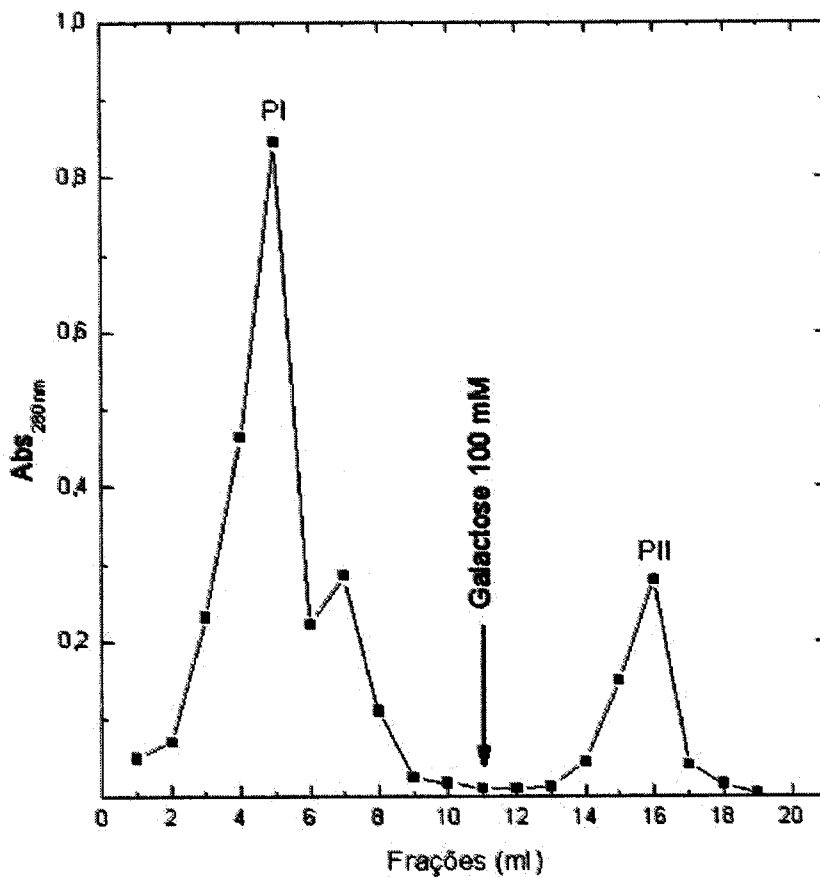


## 6. Purificação da pulchellina a partir dos calos.

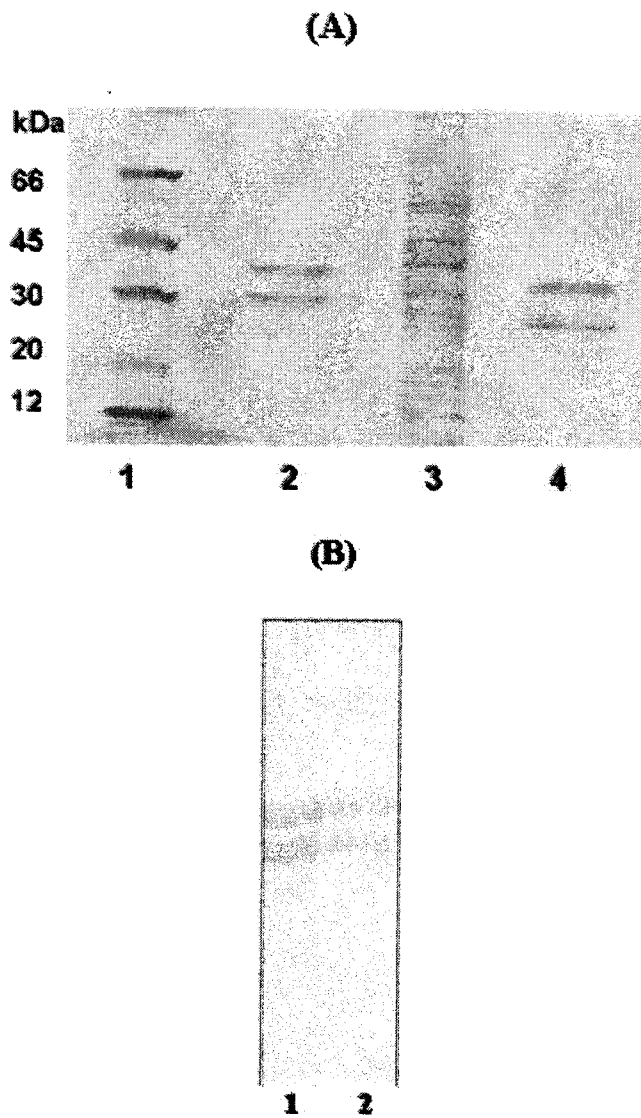
Uma vez confirmada a presença da pulchellina nos calos, a próxima etapa foi tentar purificá-la através de cromatografia na coluna de afinidade Sepharose-4B. O extrato total protéico dos calos de *A. pulchellus* foi obtido conforme o procedimento descrito na metodologia. Como já era previsto, a coluna de Sepharose-4B mostrou-se bastante eficiente na separação da pulchellina das demais proteínas presentes no extrato total dos calos. Na Figura 9 pode-se observar 2 picos cromatográficos majoritários (denominados PI e PII), referentes ao pico não retido (PI) e ao pico retido eluído com galactose (PII). As frações correspondentes ao PI e PII foram coletadas separadamente, sendo que uma alíquota de 40 µl do PII foi submetida a ensaios eletroforéticos e de imunodeteção para confirmar a presença da pulchellina. Uma alíquota do extrato protéico total dos calos e outra da pulchellina de sementes (controle positivo) também foram usadas nos ensaios eletroforéticos.

A análise em SDS-PAGE das alíquotas revelou que tanto o extrato protéico total dos calos quanto o PII apresentaram bandas protéicas equivalentes às da pulchellina de sementes, com massas moleculares aparentes de 31 e 29 kDa (Figura 10-A). A alíquota correspondente ao PII, mostrou que a proteína foi facilmente separada das demais através de uma única etapa cromatográfica.

Para a inteira certificação de que o PII era mesmo referente pulchellina dos calos, um novo ensaio de imunodeteção foi realizado usando-se a técnica de *Western blot*. Esse resultado confirmou realmente a presença da pulchellina, uma vez que os anticorpos anti-pulchellina nativa foram capazes de reconhecer e interagir fortemente com as bandas protéicas referentes ao PII (Figura 10-B). Como os resultados confirmaram a presença e purificação da pulchellina nos calos, uma tabela foi elaborada para demonstrar o rendimento final da proteína após a etapa de purificação (Tabela 4). Nota-se que, diferentemente dos resultados obtidos para pulchellina de sementes [56], a pulchellina de calos apresenta um baixo rendimento, porém satisfatório em relação a outras lectinas isoladas de culturas de tecido. Bhattacharay *et al.* [61] observaram que purificação da lectina obtida a partir da cultura de tecidos de *Abrus precatorius* também apresenta um rendimento bastante reduzido.



**Figura 9 – Purificação da lectina de calos de *A. pulchellus* através de cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose-4B [50].** A coluna foi equilibrada e eluída com o tampão Tris-HCl 100 mM pH 7,6 contendo NaCl 100 mM para retirar a fração não retida (PI). A fração retida contendo a pulchellina (PII) foi eluída com Galactose 100 mM contendo NaCl 100 mM.



**Figura 10 – Análise da purificação da pulchellina dos calos através de SDS-PAGE e *Western blot* [50]. (A) SDS-PAGE 15%: 1) Padrão de massa molecular; 2) Pulchellina isolada dos calos; 3) Extrato protéico total obtido dos calos de *A. pulchellus*; 4) Pulchellina obtida de sementes. O gel foi revelado com nitrato de prata conforme o método de Blum [45]. (B) *Western blot*: 1) Pulchellina de sementes e 2) Pulchellina de calos. O ensaio de imunodeteção foi realizado utilizando o anticorpo policlonal anti-pulchellina (título 1:5000).**

**Tabela 4** – Rendimento da pulchellina de calos após as etapas de purificação.

Fração <sup>a</sup>	Volume <sup>b</sup> (ml)	Proteína <sup>c</sup> (mg)	Proteína Total (mg)	UH <sup>d</sup>	Atividade Específica <sup>e</sup>	Índice de Purificação <sup>f</sup>
Extrato total	60	0,44	26,4	64	2,4	1
Pulchellina	3	0,28	0,84	16	19	8

<sup>a</sup>Extrato total preparado a partir de 20 g de calos cotiledonares de *A. pulchellus*

<sup>b</sup>Volume obtido de solução de proteína

<sup>c</sup>Concentração de proteína por ml

<sup>d</sup>Unidade hemaglutinante por ml (concentração mínima de lectina capaz de causar aglutinação visível de uma suspensão a 2% de eritrócitos de coelho)

<sup>e</sup>UH/mg de proteína

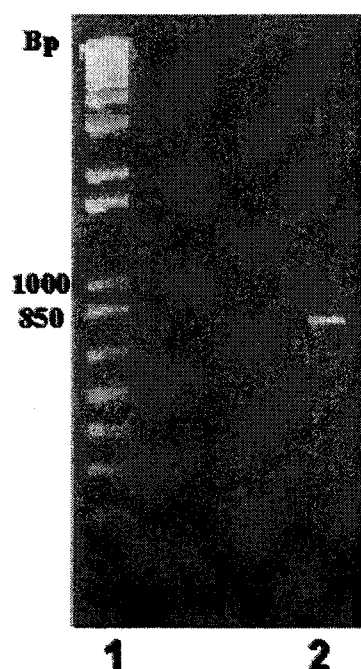
<sup>f</sup>Índice de purificação calculado a partir da razão entre a concentração mínima de proteína no extrato total e da fração protéica capaz de causar aglutinação visível.

Diferentes lectinas têm sido isoladas e purificadas a partir de cultura de tecidos (calogênese e suspensão celular) de diferentes espécies vegetais. Ikeda *et al.* [62] purificaram uma RIP a partir de culturas de calos e de suspensão celular de *Mirabilis jalapa*, e observaram que a cadeia tóxica dessa proteína apresenta 25% de identidade com a cadeia A da ricina-D. Ishizaki *et al.* [63] também conseguiram isolar e purificar uma RIP de cultura de calos de *Spinacia oleracea* L., porém obtendo um baixo rendimento. Segundo Doran [54], a cultura de tecidos vegetais pode ser um sistema experimental *in vitro* promissor para estudos envolvendo a regulação e a síntese de proteínas.

#### 7. Síntese do cDNA da cadeia tóxica da pulchellina através de RT-PCR.

No intuito de verificar se a síntese da pulchellina estava ocorrendo nos calos, a presença de seu RNA mensageiro foi investigada através da técnica de RT-PCR. Essa técnica permitiu a síntese do cDNA a partir do RNA total dos calos através dos processos de transcrição reversa e de amplificação (PCR) específica da cadeia A da pulchellina. Os resultados obtidos foram satisfatórios, pois de acordo com a figura 11, uma única banda de aproximadamente 800 pb (correspondente ao fragmento gênico codificador da cadeia A da pulchellina) foi amplificada. Este resultado demonstra que a pulchellina é realmente

produzida nos calos, excluindo a hipótese de que a proteína purificada a partir dos calos exclusivamente relativa à pulchellina nativa presente nos explantes iniciais.



**Figura 11 – Análise do produto do RT-PCR a partir do RNA total dos calos de *A. pulchellus*. Colunas: 1) 1 kb plus DNA Ladder-Promega e 2) cadeia A da pulchellina amplificada utilizando o RNA total extraído dos calos cotiledonares e *primers* específicos para a cadeia A da pulchellina..**

## **VII. CONCLUSÕES**

---

## VII. CONCLUSÕES

De posse dos resultados experimentais obtidos, pode-se concluir que:

- Dentre os meios de culturas testados, o meio MS17 (suplementado com 2,2 mg/l de BA, 0,6 mg/l de ABA e 3 g/l de sacarose) mostrou-se ideal tanto para indução quanto para a manutenção da cultura de calos cotiledonares de *A. pulchellus*.
- O desenvolvimento dos calos de *A. pulchellus* apresenta fases distintas de crescimento.
- Durante o crescimento da cultura ocorrem diferenças no teor protéico dos calos, sugerindo o consumo e síntese de algumas proteínas durante o desenvolvimento desses calos.
- Aparentemente a pulchellina parece ser conservada durante o período de desenvolvimento dos calos, embora a banda protéica referente à cadeia B apresente uma aparente redução de intensidade.
- De acordo com os resultados obtidos com ensaios de toxicidade, hemaglutinação, imunodeteção, purificação e RT-PCR, pode-se afirmar seguramente que a pulchellina também é sintetizada na sua forma ativa pelos calos cotiledonares. Isso reforça a idéia de que a produção *in vitro* da pulchellina através da cultura de tecidos pode ser um sistema promissor para produção dessa proteína independente da disponibilidade de sementes. Além disso, esse sistema pode ser utilizado como um modelo para estudos relacionados à regulação e biossíntese de proteínas.

## **VIII. REFERÊNCIAS**

---



## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rout, G.R., Das, S.P. *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. *Biotech. Advan.* **18**, 91-120, 2000.
2. França, S.C. Abordagens biotecnológicas para obtenção de substâncias ativas. In: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G. (ed.) *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Porto Alegre, Florianópolis: UFRGS/UFSC, 1999. p.101-112.
3. Alferman, A.W. & Petersen, M. Natural product formation by plant cell biotechnology. *Plant Cell Tiss. Org.*, **43**, 199-205, 1995.
4. Pasqual, M., Hoffmann, A., Ramos, J.D. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações** - introdução: fundamentos básicos. 2. ed. Lavras, UFLA/FAEPE, 1998. 159p.
5. Torres, C., Caldas, L.S., Ferreira, A.T. Retrospectiva da cultura de tecidos. In: Torres, C., Caldas, L.S., Buso, J.A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. 1.ed. Brasília: EMBRAPA-CNPH, 1998. v.1, p. 11-20.
6. Murashige, T. & Skoog, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, **15**, 473-479, 1962.
7. Dodds, J.H. & Roberts, L.W. *Experiments in plant tissue culture*. 3.ed. Cambridge, 1995. 256p.
8. Gautheret, R.J. History of plant tissue and cell culture: A personal account. In: I.K. Vasil. *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*. 1. ed. New York, Academic Press, 1985. v.2, p.2-59.
9. Caldas, L.S., Haridasan, R., Ferreira, M.E.. Meios nutritivos. In: Torres, A. C. & Caldas, L.S. 1.ed. *Técnicas e aplicações de cultura de tecidos de plantas*. Brasília, ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1990. p.37-70.
10. Rao, R.S., Ravishankar, G.A. Plant cell cultures: chemical factores of secondary metabolities. *Biotech. Advan.* **20**, 101-153, 2002.
11. Oliveira, R.P., Mendes, B.J.M., Neto, A.T. Obtenção e cultura de calos nucleares de limão cravo, tangerina cleopatra e *Poncirus trifoliata*. *Rev. Bras. Fisol. Veg.*, **6**(2), 115-119, 1994.

12. Grando, M.F., Eichler, L., Tanabe, C.R., Santos, J.F., Santos, C.M. Callus induction and plant regeneration in three oat genotypes. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.*, **5**(2), 139-144, 1993.
13. Nabors, M. W., Heyser, J.W.; Dykes, T.A.; de Mott, K.J. Long-duration high frequency plant regeneration from cereal tissue culture. *Planta*, **157**(3), 385-391, 1983.
14. Rashid, H. & Quaraishi, A. High frequency embryogenic callus induction and its regeneration in three wheat cvs. In: Mujeeb, K. Review of advances in plant biotechnology. 1.ed., Cimmyt and Irri, 1989. p.205-215.
15. He, D.G., Yang, Y.M., Scott, K. J. Plant regeneration from protoplasts of wheat (*Triticum aestivum* cv. hartog). *Plant Cell Rep.*, **1**, 16-19, 1992.
16. Salarini, V.J. Micropropagação, indução de calos e isolamento de protoplastos de bananeira (musa sp.). Lavras, 1995. p.07-09. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras.
17. Marques, I. & Brodelius, P. Elicitor-induce l tyrosine descarboxylase from plant cell suspension. *Plant Physiol.*, **88**, 22-25, 1998.
18. Fowler, M.H. Process strategies for plant cell. *Trends Biotechnol.*, **4**, 214-219. 1986.
19. Balandrin, M.F & Klocke, J.A. Natural plant chemicals: source of industrial and medicinal materials. *Science*, **288**, 1154-1160, 1995.
20. Gaspar, T., Kevers, C., Penel, C., Greppin, H., Reid, D.M., Thorpe, T.A. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, **32**, 272-289, 1996.
21. Franklin, C.I. & Dixon, R.A. Initiation and maintenance of callus and cell suspension culture. In: Dixon, R.A. & Gonzales, R.A. Plant Cell Culture: a practical approach. 3.ed. Oxford, Oxford University Press, 1994. p.1-26.
22. Paula, M.A., Pinto, J.E.P., Siqueira, J.O., Pasqual, M. Obtenção de calos e suspensão de células de diferentes tecidos vegetais. *Pesq. Agropec. Bras.*, **25**, 889-895, 1990.
23. Stewart, R.N. Ontogeny of the primary body in chimeral forms of higher plants. In: Subtelny, S. & Sussex, I.M. The clonal basis of development. New York, Academic Press, 1978. p.131-160.

24. Broertjes, C. & Keen, A. Adventitious shoots: do they development from one cell?. *Euphytica*, **29**, 73-87, 1990.
25. Sharp, R., da Evans, Ammirato, P.V., Yamada, Y. Handbook of plant cell culture. 2.ed. New York, MacMillan, 1998. 644p.
26. Tisserat, B. & Demason, D.A. A histological study of development of adventive embryosin organ culture of *Phoenix dactylifera*. *Ann. Bot.*, **46**, 465-472, 1990.
27. Costabel, F. Medicinal plant biotechnonology. *Plant Med.*, **56**, 421-425, 1990.
28. Illg, R.D. Plant tissue culture techniques. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **86**(2), 21-24, 1991.
29. Shewry, P. R., Napier, J.A., Tatham, A. S. Seed storage proteins: structure and biosynthesis. *The Plant Cell*, **7**, 945-956, 1995.
30. Barbieri, L., Bolognesi, A., Cenini, P., Falasca, A.I., Minghetti, A., Garofano, L., Guicciardi, A., Lappi, D., Miller, S.P., Stirpe, F. Ribosome-inactivating proteins from plant cells in culture. *Biochem. J.*, **257**, 801-807, 1989.
31. Bonness, M.S. & Mabry, T.J. Tissue culture of endod (*Phytolacca dodecandra* L'Herit) growth and production of ribosome-inactivating proteins. *Plant Cell. Rep.*, **11**, 66-70, 1992.
32. Thorup, J.E., McDonald, K.A., Jackman, A.P., Bathia, N., Dandekar, A.M. Ribosome-inactivating protein production from *Trichosanthes kirilowii* plant cell cultures. *Biotechnol. Prog.*, **10**, 345-352, 1994.
33. Stoner, M.R., Humphrey, C.A., Coutts, D.J., Remi, S.N.J., McDonald, K.A., Jackman, A.P. Kinetics of growth and ribosome-inactivating protein production from *Trichosanthes kirilowii* plant cell cultures in 5-L bioreactor. *Biotechnol. Prog.*, **13**, 799-804, 1997.
34. D'Silva, I., Vaidyanathan, C.S., Podder, S.K. Ribosome-inactivating proteins and agglutinins from callus and suspension cultures of *Ricinus communis* L. and *Abrus precatorius* L. *Plant Science*, **94**, 161-172, 1993.
35. Bhattacharya, P.S., Miati, T.K., Bhattacharyya, B. Tissues culture of *Abrus precatorius* and *in vitro* *Abrus* lectin production: A new report. In: Whelan, W.J., Ahmed, F., Bialy, H., Black, S., King, M.L., Rabin, M.B., Solomonson, L.P., Vasil, I.K. Proceedings of the 1992 Miami Biotechnology winter Symposium. Miami, 1992. v.1, 34p.

36. Vivanco, J.M. & Flores, H.E. Biosynthesis of ribosome-inactivating proteins from callus and cell suspension cultures of *Mirabilis expansa* (Ruiz & Pavon). *Plant Cell Rep.*, **19**, 1033-1039, 2000.
37. Etzler, E.M., James, D.W., Ghosh, M. Production of a lectin in tissue cultures of *Dolichos biflorus*. *Plant Physiol.*, **7**, 630-634, 1984.
38. Saare-Sierminski, K., Preil, W., Knox, J.P., Liebriei, R. Arabinogalactan proteins in embryogenic and non-embryogenic callus cultures of *Euphorbia pulcherrima*. *Physiol. Plant.*, **108**, 180-187, 2000.
39. Chasan, R. Arabinogalctan-proteins: getting to the core. *Plant Cell*, **6**, 1519-1521, 1994.
40. Gupta, N. & Srivastava, P.S. Purification of a lectin from seeds and cotyledonary callus of *Zizyphus mauritiana*. *Plant Cell Rep.*, **17**, 552-556, 1998.
41. Jayarvardha, K.K., Padikkala; Pandikkar, K.R. Lectin biosynthesis in callus culture established from seeds of *Canavalia virosa*. *Biol. Plant.*, **38**(3), 329-334, 1996.
42. Silva, A.L.C, Caruso, C.S., Moreira, R.A., Horta, A.C.G. *In vitro* induction of callus from cotyledon and hypocotyl explants of *Glycine wightii* (Wight & Arn.) Verdc. *Ciênc. Agrotec.*, **27**(6), 1277-1284, 2003.
43. Bradford, M.M. A rapid sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254, 1976.
44. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685, 1970.
45. Blum, H., Beier, H., Gross, H.J. Improved silver-staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, **8**, 93-99, 1987.
46. Moreira, R.A. & Perrone, J.C. Purification and parcial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol.*, **59**, 783-787, 1977.
47. Pasqual, M.; Hoffmann, A.; Ramos, J.D. Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações - meios de cultura. 2. ed. Lavras, UFLA/FAEPE, 1998. 127p.
48. Bespalhok, J.C., Hatorri, F.K.. Friable embryogenic callus and somatic embryo formation from cotyledon explants of African marigold (*Tagetes erecta* L.). *Plant Cell Rep.* **17**, 870-875, 1998.

49. Horgan, R. (1985). Auxin. In: Wilkins, M.B. (ed.). *Advanced Plant Physiology*. Pitman Publishing Inc. London, 1985. p.53-75.
50. Silva, A.L.C., Horta, A.C.G., Moreira, R.A., Beltramini, L.M., Araújo, A.P.U. Production of *Abrus pulchellus* ribosome-inactivating protein from seeds callus culture. *Toxicon* **41**, 841-849, 2003.
51. Scragg, A.H. & Allan, E.J. *Picrasma quassioides* Bennet (Japanese quassia tree): *in vitro* culture and production of quassin. In: Bajaj, Y.P.S. (ed.), *Biotechnology in agriculture and forestry: medicinal and aromatic plants IV*. Berlin: Springer-Verlag, v.21. 1993. p.249-268.
52. Krikorian, A.D. Hormones in tissue culture and micropropagation. In: Davies, P.J. (ed). *Plant hormones*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. p.774-796.
53. Smith, R.M. *Plant tissue culture: techniques and experiments*. San Diego: Academic Press, 1992. 71p.
54. Doran, P. M.. Foreign protein production in plant tissue cultures. *Curr. Opin. Biotech.* **11**, 199-204, 2000.
55. Ramos, M.V., Mota, D.M., Teixeira, C.R., Cavada, B.S., Moreira, R.A. Isolation and partial characterization of highly toxic lectins from *Abrus pulchellus* seeds. *Toxicon*, **36**(3), 477-484, 1998.
56. Mota, D.M. Pulchellinas, lectinas galactose-específicas, de sementes de *A. pulchellus*: Purificação e estudos de propriedades químicas e biológicas. UFC, 1997. Dissertação de mestrado, 127p.
57. Battelli, M.J. Cytotoxicity and toxicity to animals and humans of ribosome-inactivating proteins. *Mini-Rev. Med. Chem.*, **4**(5), 513-521, 2004.
58. Sacchi, G.A.; Morguttis, S.; Abruzzese A. Changes in some physiological and biochemical parameters during two subcultures in kiwi (*Actinia deliciosa*) callus. *Plant Sci.* **106**(1),107-113, 1995.
59. Lal, N.; Chandra, P.; Singh, J.; Singh, H.N. Changes in nucleic acid and protein contents during plant regeneration from callus in sugarcane. *Ind. J. Plant Physiol.* **35**(4), 389-392, 1992.
60. Rajyalakshimi, K.; Grover, A.; Maheshwari, N.; Maheshwari, S.C.; Tyagi, A.K. High frequency regeneration of plantlets from leaf-basis via somatic

- embriogenesis and comparison of polypeptide profiles from morphogenic and non-morphogenic calli in wheat (*Triticum aestivum*). *Physiol. Plantarum*. 82 (4), 617-603, 1991.
61. Bhattacharya, P.S., Maiti, T.K., Bhattacharya, B.C. Tissue culture of *Abrus precatorius* and *in vitro* *Abrus* lectin production: A new report. In: Whelan, W.J., Ahemd, F., Bialy, H., Black, S., King, M.L, Rabin, M.B., Solomonson, L.B., Vasil, I.K. (eds) Proceedings of the 1992 Maime Bio/Technology Winter Symposium, v.I. 1992, 34p.
62. Ikeda, T. The callus induced from leaves of *Mirabilis jalapa* and its suspension cultured cells established to accumulate the protein intracellularly. *Plant Cell Cult. Japan* 24, 45-57, 1991.
63. Ishizaki, T., Megumi, C., Komai, F., Masuda, K., Oosawa, K. Accumulation of a 31-kDa glycoprotein in association with the expression of embryogenic potential by spinach callus in culture. *Physiol Plant*. 114(1), 109-115, 2002

## **IX. APÊNDICES**

---

## APÊNDICE 1 - Composição do meio básico MS

Componentes	Concentrações	
	mg.L <sup>-1</sup>	mM
<b>Macronutrientes</b>		
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	20,6
KNO <sub>3</sub>	1900	18,8
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440	2,99
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370	1,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	1,25
<b>Micronutrientes</b>		
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22,3	0,100
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,6	0,0299
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	0,100
KI	0,83	0,005
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,025	0,0001
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025	0,0001
<b>FeEDTA</b>		
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	37,3	0,100
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,8	0,100

## APÊNDICE 2 – Vitaminas presentes no meio básico MS

Componentes	Concentrações	
	mg.L <sup>-1</sup>	mM
Glicina	2,0	0,0266
Ácido Nicotínico	0,5	0,004
Pitidoxina.HCl	0,5	0,0024
Tiamina.HCl	0,1	0,0003
Mio-Inositol	100	0,55



## **X. ANEXOS**

---

## Production of *Abrus pulchellus* ribosome-inactivating protein from seeds callus culture

André Luis C. Silva<sup>a,\*</sup>, Ana Cecília G. Horta<sup>b</sup>, Renato A. Moreira<sup>b</sup>,  
Leila M. Beltramini<sup>a</sup>, Ana Paula U. Araújo<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Grupo de Biofísica Molecular e Espectroscopia, Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, Caixa Postal 369, São Carlos, SP CEP 13560-970, Brazil

<sup>b</sup>Laboratório de Lectinas e Glicoconjugados, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Caixa Postal 6020, Fortaleza, CE CEP 60455-900, Brazil

Received 28 October 2002; accepted 19 February 2003

### Abstract

Ribosome inactivating proteins (RIPs) were isolated from callus culture that were established from seed explants of *Abrus pulchellus*. Cotyledon segments of immature seeds were inoculated in basal medium MS supplemented with different concentrations of auxin (2,4-D), cytokinin (kinetin and BA) and sucrose in order to determine the best callus induction. *A. pulchellus* type 2 RIP (pulchellin) expression was monitored in callus cultures by RT-PCR and biological activity. The calli obtained after 35 days were freeze dried, macerated and submitted to extraction of total RNA and proteins (0.1 M Tris–HCl pH 7.6 buffer, containing 0.15 M NaCl, 3 h at room temperature). A specific DNA fragment codifying the A-chain pulchellin was amplified from callus RNA suggesting the presence of the protein. This was confirmed in the calli crude extract that showed haemagglutinating activity against rabbit blood cells and a high intraperitoneal toxicity to mice. The crude extract was also submitted to affinity chromatography on a Sepharose-4B column. The retained protein, peak released by 0.1 M galactose, appeared to be composed of two main bands in polyacrylamide gel electrophoresis, in denaturing conditions, with a similar pattern to that obtained with seeds.

© 2003 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** *Abrus pulchellus*; Leguminosae; Callus; Lectin; Ribosome-inactivating protein

### 1. Introduction

*Abrus pulchellus*, sub-species *tenuiflorus*, belonging to the family Leguminosae, sub-family Papilionoideae, contains a seed lectin (pulchellin), specific for galactose and galactose-containing sugars, showing haemagglutinating and toxic activities (Ramos et al., 1998). Pulchellin is a ribosome inactivating protein (RIP) type 2. Type 2 RIPs are a combination of lectin B subunit and toxic A subunit held together via a disulfide bond (Olsnes and Pihl, 1981; Hedger and Podder, 1997). Each subunit plays a distinct role during their action on eukaryotic cells (Olsnes and Sandvig, 1988;

Leah et al., 1991; Swimmer et al., 1992; Steeves et al., 1999). The B subunit, which contains two galactose binding sites, binds the toxin to cell surface glycoproteins and/or glycolipids containing terminal galactose and helps endocytosis and subsequent transport of the A subunit into cytosol (Olsnes and Pihl, 1982; Beaumelle et al., 1993; Sandvig and VanDeurs, 1994). The A subunit is an enzyme that, when free in cytosol, depurinates a single base, adenine 4324, of the 28S rRNA in mice, thereby inactivating protein synthesis (Endo et al., 1987; Endo and Tsurugi, 1987).

The detection of RIPs and agglutinins in tissues and organs of unrelated plants has been widely reported (Pratt et al., 1990; Datta et al., 1991; Singh and Singh, 2000). The highest concentrations have been found in plants belonging to families of Asparagaceae (Bolognesi et al., 1990),

\* Corresponding author. Tel./fax: +55-16-271-53-81.

E-mail address: alcoelho@ifsc.usp.br (A.L.C. Silva).

Caryophyllaceae (Stirpe et al., 1983), Cucurbitaceae (Stirpe et al., 1986), Euphorbiaceae (Stirpe et al., 1980), Nyctaginaceae (Ikeda et al., 1987), Phytolaccaceae (Parente et al., 1993), Poaceae (Asano et al., 1984) and Leguminosae (Olsnes and Pihl, 1982). Studies regarding the specific properties and distribution of RIPs and agglutinins in plants have led to the formulation of a number of hypothesis concerning the physiological role of plant lectins. It has been suggested that RIPs may function in the regulation of protein synthesis of plants and in cell multiplication while agglutinins may be involved in defense mechanism, as well as in cell recognition, transport, immobilization and storage (Chrispeels and Raikhel, 1991; Nielsen and Boston, 2001).

There has been considerable interest in RIPs in recent years due to their potential use in the development of therapeutic agents (Spooner and Lord, 1990; Stirpe et al., 1992; Pastan et al., 1996), such as toxin-antibody conjugates targeted against tumour cells (Frankel et al., 1997; Pastan et al., 1996). The RIPs also display a variety of biological activities such as antiviral (Vivanco et al., 1999) and antifungal (Selitrechnikoff, 2001) activity. The enzymatic domain of ricin and abrin A-chain immunotoxins exhibits selective anti-tumour effects in animal tumour models (Thorpe et al., 1987; Kreitman and Pastan, 1998). In addition, various activities of RIPs against different viruses have been noted but the exact mechanism of action is unclear. Recent studies have shown that some RIPs possess strong anti-human immunodeficiency virus (HIV) activity (Zarling et al., 1990; Au et al., 2000).

Plant tissue and cell cultures could be an alternative continuous source of RIPs and could also be a useful and important tool to study their regulation and biosynthesis. The *in vitro* production of RIPs and lectin from *Abrus precatorius* culture has been already reported (D'Silva et al., 1993).

The aim of our work was to investigate whether RIPs could be synthesized in callus culture from *A. pulchellus* immature cotyledons. The interest in the present study is based on the fact that RIPs have been employed as immunotoxins and that *A. pulchellus* callus cultures could represent a convenient system to obtain and purify considerable amounts of sterile RIPs for biotechnology applications.

## 2. Materials and methods

### 2.1. General

*A. pulchellus* immature seeds were collected from plants growing in the city of São Carlos-SP (Brazil). The botanical identification was carried out in the Department of Biology, Federal University of Ceará (UFC). Growth regulators, MS medium, vitamins and standard molecular weight markers were from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA).

The Rneasy Plant mini Kits was obtained from QIAGEN (USA). Sepharose-4B was obtained from Pharmacia (Sweden). All other chemicals were of analytical grade.

### 2.2. Callus induction and maintenance

Segments ( $16 \pm 2$  mm) were taken from cotyledons of the immature seeds and placed on solidified medium consisted of MS salts (Murashige and Skoog, 1962) containing (in  $\text{mg l}^{-1}$ ) 1.0 thiamine-HCl, 1.0 pyridoxine-HCl, 1.0 nicotinic acid, 2.0 glycine, 100.0 myo-inositol and  $2.0 \text{ g l}^{-1}$  Phytigel (Sigma Chemical Co.). The media also were supplemented with 2,4-D, kinetin, BA, ABA and sucrose, according to the treatments: (1)  $0.1 \text{ mg l}^{-1}$  kinetin,  $2.0 \text{ mg l}^{-1}$  2,4-D and sucrose  $20 \text{ g l}^{-1}$ ; (2)  $0.2 \text{ mg l}^{-1}$  kinetin,  $3.0 \text{ mg l}^{-1}$  2,4-D and sucrose  $20 \text{ g l}^{-1}$ ; (3)  $2.2 \text{ mg l}^{-1}$  BA,  $0.6 \text{ mg l}^{-1}$  ABA and  $30 \text{ g l}^{-1}$  sucrose; (4)  $2.2 \text{ mg l}^{-1}$  BA and  $30 \text{ g l}^{-1}$  sucrose. The media were adjusted to pH 5.8 with 1N NaOH, autoclaved and dispensed in  $100 \times 15 \text{ mm}^2$  petri dishes (25 ml medium for dish). The cultures were incubated at  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  in the dark. After 5 weeks, the developed calli of cotyledons were separated from explants and transferred to fresh medium of the same composition. The calli obtained were sub-cultured for an additional 5 weeks.

### 2.3. Callus crude extract preparation

Cotyledon calli obtained from treatment 3 (35 days after) were macerated and extracted with 0.1 M pH 2.6 glycine-HCl, 0.1 M pH 4.0 Na-acetate, 0.1 M pH 6.0 Na-phosphate, 0.1 M pH 7.6 Tris-HCl and 0.1 M pH 10.0 Na-borate buffers, all containing 0.15 M NaCl. The mixture was stirred for 2 h and clarified by centrifugation at  $12,000g$  for 20 min at  $4^\circ\text{C}$ . The clear supernatants were used for determination of soluble protein content. The measurement of protein concentration in the different fractions was performed according to Bradford (1976), using bovine serum albumin as standard.

### 2.4. Affinity chromatography

The crude extract obtained with 0.1 M pH 7.6 Tris-HCl buffer containing 0.15 M NaCl was loaded on a Sepharose-4B matrix affinity column equilibrated with same buffer. Unbound material was eluted with extraction buffer whereas the bound proteins were eluted with 0.1 M galactose or alternatively with 0.1 M glycine-HCl (pH 2.6) buffer containing 0.15 M NaCl. The fractions were pooled, dialyzed (against several changes of distilled water) and stored at  $-20^\circ\text{C}$ . Pulchellin from seeds was isolated according to the procedures of Ramos et al. (1998) and submitted to electrophoresis along with the pulchellin obtained from callus culture.

Table 1

Percent of calli obtained in the treatments used for induction of callogenesis in cotyledons of *A. pulchellus* in relation to different combinations of growth regulators

Treatment	Growth regulators (mg l <sup>-1</sup> )				Sucrose (g l <sup>-1</sup> )	Callus (%)
	Kin <sup>a</sup>	2,4-D <sup>b</sup>	BA <sup>c</sup>	ABA <sup>d</sup>		
1	0.1	2.0	-	-	2	53.3
2		3.0	-	-	2	60
3			2.2	0.6	3	100
4			2.2	-	3	73.3

<sup>a</sup> Kinetin.

<sup>b</sup> 2,4-dichlorophenoxyacetic acid.

<sup>c</sup> 6-benzylamino-purine.

<sup>d</sup> Abscisic acid.

### 2.5. SDS-PAGE and western blot analysis

This was carried out on vertical 2 mm gel slabs of 15% polyacrylamide separation gel and 3.5% stacking gel. The samples were dissolved in 0.0625 M Tris-HCl (pH 6.8) buffer with 1% of 2-mercaptoethanol and incubated at 100 °C for 15 min. The protein bands were visualized by staining the gel with Coomassie Brilliant Blue R-250. Estimation of molecular weight of proteins was determined by comparing the electrophoretic mobility with those of standard molecular weight marker proteins. Proteins were electroblotted onto nitrocellulose membranes (Protan, Keene, N.H.), using a Bio-Rad electrotransfer cell, for 1 h

at 150 V (constant voltage). Membranes were developed with a secondary antibody-alkaline phosphatase detection system (Promega, Wis.), using rabbit polyclonal antibodies produced against *A. pulchellus* seed lectin with type 2 RIP activity. An antiserum titer of 1:5000 was used for all experiments.

### 2.6. Haemagglutination activity

Haemagglutination assays were performed by standard methods (Moreira and Perrone, 1977) using native rabbit erythrocytes (2%). The degree of agglutination was monitored visually after the tubes had been left at 37 °C for 30 min and subsequently left at room temperature for further 30 min. One haemagglutinating unit (HU) was defined as the reciprocal of the highest dilution still giving a visible agglutination.

### 2.7. Toxic activity

The toxic activity was determined by intraperitoneal injection in mice using different dilutions (1:5; 1:10; 1:20; 1:30 and 1:40 v/v) obtained from callus crude extract. Groups of six animals and different doses of the callus crude extract were prepared. Each group represented a dose and each animal in the same group received the same proportion toxin/mass body. After injection of each dilution, the toxic effects were determined after for 72 h and acute LD<sub>50</sub> value was calculated.

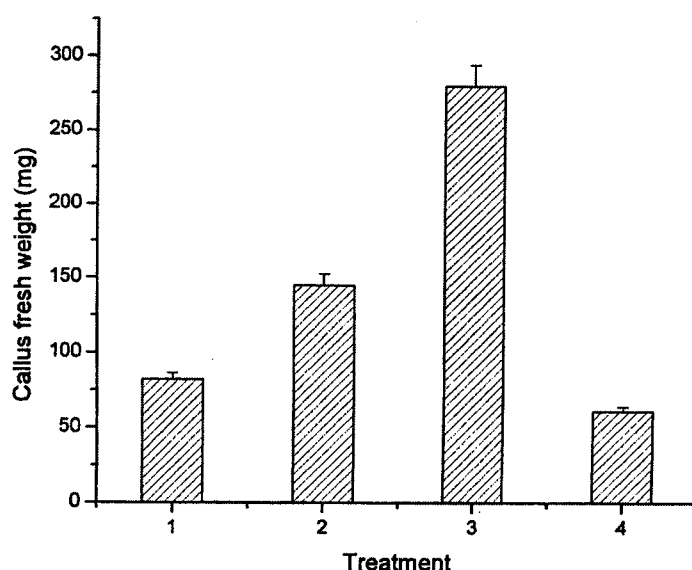


Fig. 1. Fresh weight averages of cotyledon calli subcultured in medium under different treatment tested: treatment 1 (0.1 mg l<sup>-1</sup> kinetin, 2.0 mg l<sup>-1</sup> 2,4-D and 2 g l<sup>-1</sup> sucrose); treatment 2 (0.2 mg l<sup>-1</sup> kinetin, 3.0 mg l<sup>-1</sup> 2,4-D and 2 g l<sup>-1</sup> sucrose); treatment 3 (2.2 mg l<sup>-1</sup> BA, 0.6 mg l<sup>-1</sup> ABA and 3 g l<sup>-1</sup> sucrose) and treatment 4 (2.2 mg l<sup>-1</sup> BA and 3 g l<sup>-1</sup> sucrose).

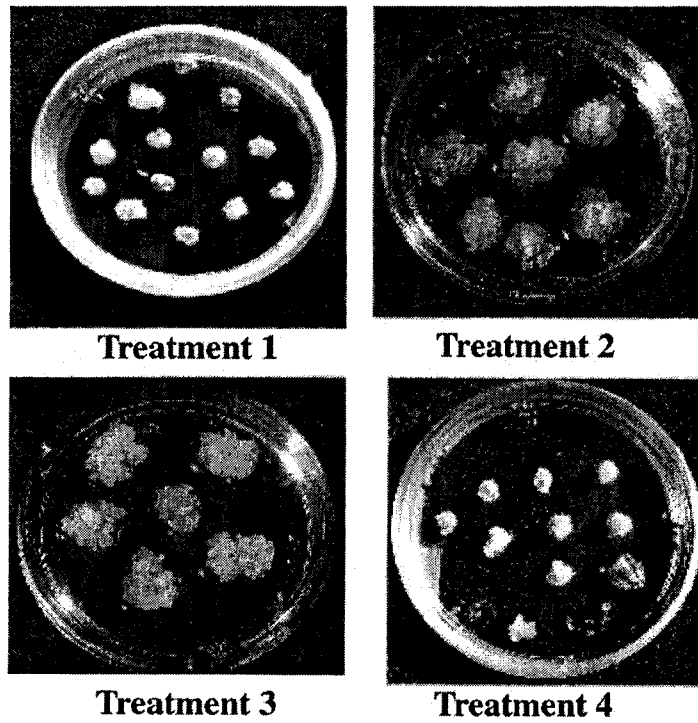


Fig. 2. Callus culture from *A. pulchellus* subcultured in medium under different treatments: Treatment 1 ( $0.1 \text{ mg l}^{-1}$  kinetin,  $2.0 \text{ mg l}^{-1}$  2,4-D and  $2 \text{ g l}^{-1}$  sucrose); treatment 2 ( $0.2 \text{ mg l}^{-1}$  kinetin,  $3.0 \text{ mg l}^{-1}$  2,4-D and  $2 \text{ g l}^{-1}$  sucrose); treatment 3 ( $2.2 \text{ mg l}^{-1}$  BA,  $0.6 \text{ mg l}^{-1}$  ABA and  $3 \text{ g l}^{-1}$  sucrose) and treatment 4 ( $2.2 \text{ mg l}^{-1}$  BA and  $3 \text{ g l}^{-1}$  sucrose).

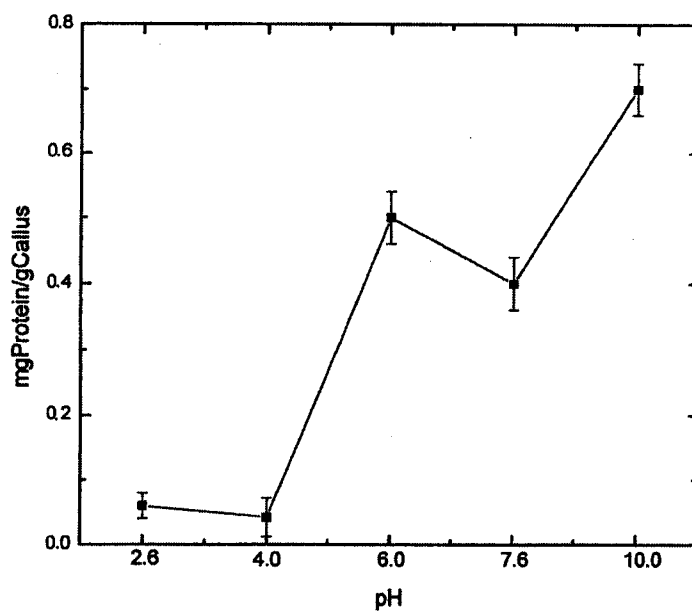


Fig. 3. Influence of the pH on the solubility of *A. pulchellus* callus proteins.

Table 2  
Lethal activity determined by intraperitoneal injection in mice, using different dilutions of callus crude extract from *A. pulchellus*, after 72 h of treatment

Crude extract dilution	$\mu\text{g}$ Protein ( $\text{g animal}^{-1}$ )	% of death
1:5	22.2	100
1:10	10.8	80
1:20	5.6	50
1:30	3.5	–
1:40	2.8	–

### 2.8. Callus RNA isolation

Total RNA was isolated from callus (50 mg) using Rneasy Plant Mini Kit (QIAGEN). The concentration of RNA was determined by measuring the absorbance at 260 nm. The integrity and size distribution of total RNA purified from callus, was checked by denaturing agarose gel (0.8%) and staining by ethidium bromide.

### 2.9. cDNA synthesis

The pulchellin A-chain amplification was carried through reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). This was possible, since recombinant clones containing the complete pulchellin gene were available in our laboratory (data not published). The first strand cDNA was synthesized by a reverse transcriptase (RT) reaction. RT was performed with callus RNA ( $\sim 3$  mg) in a 20  $\mu\text{l}$  reaction containing: PucA reverse primer ( $15 \text{ pmol } \mu\text{l}^{-1}$ ), first strand buffer (250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 375 mM KCl, 15 mM  $\text{MgCl}_2$ ), 0.1 M dNTP mix and 200 U of RT (Life Technologies, Grand Island, NY) for 1 h at 37 °C. PCR application was then performed with 5  $\mu\text{l}$  of reaction product in a 50  $\mu\text{l}$  reaction containing PCR buffer (200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl, 50 mM  $\text{MgCl}_2$ ), 10 mM dNTP mix, Sense PucA-blunt ( $5'$ -GGAG-GACCGGCCATTGAATTTACTACTG- $3'$ ) and PucA reverse ( $5'$ -ATAGTTTAGCGCCGCTCAATTTGGC-GATTGCAGAC- $3'$ ) primers ( $15 \text{ pmol } \mu\text{l}^{-1}$  each) and 5 U *Taq* DNA polymerase (Life Technologies, Grand Island,

NY). PCR was carried out for one cycle at 94 °C for 5 min, 40 cycles at 96 °C, 1 min; 57 °C, 1 min and 72 °C for 1 min and 72 °C for 10 min in a DNA thermal Cycle (MJ Research, Inc.)

### 3. Results and discussion

The callus cultures were initiated on MS medium supplemented with different growth regulators (Table 1). All treatments showed callus formation after 35 days of inoculation. The higher percentages of callus formation (100%) were found in the presence of  $2.2 \text{ mg l}^{-1}$  BA and  $0.6 \text{ mg l}^{-1}$  ABA (treatment 3). Callogenesis appeared in less than 80% of the explants, when the medium did not contain ABA. As reported by D'Silva et al. (1993), *Abrus precatorius* cultures exhibited maximum growth on MS medium supplemented with  $2.2 \text{ mg l}^{-1}$  BA. In the presence of 2,4-D and kinetin, the percentages of callus formation ranged from 52 up to 60%. The callus obtained from treatment 3, subcultured in the same medium, presented the highest mean values of fresh weight and the smallest mean values were observed in the treatments 1 and 2 containing 2,4-D and kinetin (Figs. 1 and 2). It was also observed that, in these treatments, the calli presented dark yellow coloration and friable consistency, unlike the calli obtained from medium containing BA and ABA, which presented white coloration and hardened consistency.

Fig. 3 shows the influence of pH on the solubility of the callus proteins, obtained from treatment 3. It was found a maximum protein content at pH 10.0 and a minimum content at pH 2.6. It was also found the highest haemagglutinating activity ( $64 \text{ HU ml}^{-1}$ ) at pH 6.0 and 7.6 (Table 2). The pH sensitivity of *Zizyphus mauritiana* callus lectin also lies in the same range (Gupta and Srivastava, 1998), although the optimal pH range for pulchellin callus activity is much more restricted.

The lethal effect induced by different dilutions of crude extract from *A. pulchellus* callus culture was investigated (Table 3). After 48 h, the 1:20 dilution was found to kill 50% of mice tested with a dose of  $5.6 \mu\text{g g}^{-1}$ . This is less toxic than that found for pulchellin ( $37 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) from seeds (Ramos et al., 1998). Therefore, the amount of toxin expressed in callus in less than that obtained from the seeds.

Table 3  
Purification of lectin from cotyledonary callus (20 g) of *A. pulchellus* immature seeds

Fraction	Volume (ml)	Protein ( $\text{mg ml}^{-1}$ )	Total protein (mg)	HU <sup>a</sup>	Specific activity <sup>b</sup>	Fold purification	Recovery (%)
Callus crude extract	60	0.44	26.4	64	2.4	1	100
PII (Sepharose-4B)	3	0.28	0.84	16	19	8	3.18

<sup>a</sup> Haemagglutinating unit.

<sup>b</sup> Minimum dose capable to agglutinate a 2% erythrocyte suspension ( $\text{HU mg}^{-1}$ ).

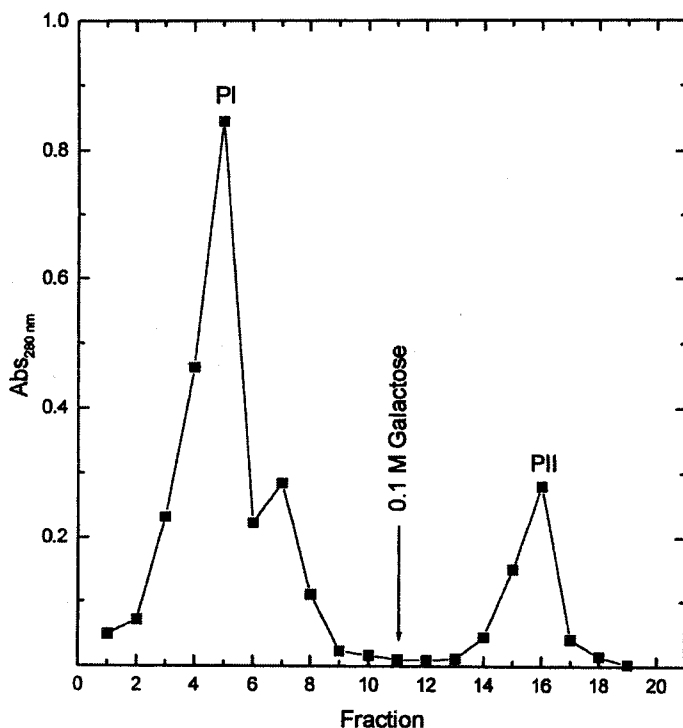


Fig. 4. Purification of the lectin from *A. pulchellus* callus by affinity chromatography on Sepharose-4B column. The column was equilibrated and eluted with 0.1 M Tris-HCl pH 7.6 containing 0.15 M NaCl to remove the unbound proteins (PI). The pulchellin (PII) was recovered by elution with 0.1 M galactose containing 0.15 M NaCl.

It was expected since the seeds are reserve organs and, therefore, have a higher level of total proteins than callus.

Different amounts of lectins have been isolated and purified from tissue cultures of the plants under investigation (Borebaeck and Linsefors, 1985; D'Silva and Podder, 1994; Jayvardhanan et al., 1996). According to Doran (2000), plant tissue culture may provide a useful experimental system for studying the regulation and synthesis of proteins. Bhattacharya and workers (Bhattacharya et al., 1992) reported the *in vitro* lectin production from *Abrus* cultures, however, the amount of total lectins isolated was not very great.

Pulchellin was purified from callus culture obtained from treatment 3 using an affinity matrix as described in Section 2. The results obtained in the extraction and purification of pulchellin from callus culture are listed in Table 3. These results showed that the specific haemagglutinating activity from callus crude ( $2.4 \text{ HU mg}^{-1}$ ) extract is comparable to that obtained starting from seeds ( $3.2 \text{ HU mg}^{-1}$ ). A single peak (PII) of the galactose-binding lectin was obtained from cultures of *A. pulchellus* on a Sepharose 4B matrix (Fig. 4). This fraction exhibited haemagglutinating and toxic activities ( $\text{LD}_{50} = 38 \mu\text{g kg}^{-1}$ ). The animals tested with

the fraction PII often died within 24 h after intraperitoneal administration. As reported by D'Silva et al. (1993), single peaks of galactose-binding lectins were also obtained from cultures from *A. precatorius* and *Ricinus communis* using a Lactamyl-Sepharose 4B matrix. The pulchellin of the callus culture was expressed in similar levels as observed with ricin and abrin callus culture by D'Silva et al. (1993).

Polyacrylamide gel electrophoresis of the PII fraction, treated with SDS and 2-mercaptoethanol resulted in two protein bands (a fast-moving A chain and a slow-moving B chain) of apparent molecular masses of 31.5 and 29 kDa, respectively (Fig. 5). These results agree with the physico-chemical properties of other toxic plant proteins with *N*-glycosidase activity (type 2 RIPs), which are composed of two different chains linked by disulphide bond (Franz, 1993; Ramos et al., 1998; Nielsen and Boston, 2001). Using antibody produced against pulchellin from seeds, we detected a strong reaction of the antibody with protein obtained from callus, which corresponds to 31.5 and 29 kDa protein bands (Fig. 6).

The total RNA obtained from *A. pulchellus* callus showed a high purity and was free from genomic DNA contamination. The cDNA synthesis of the chain A from

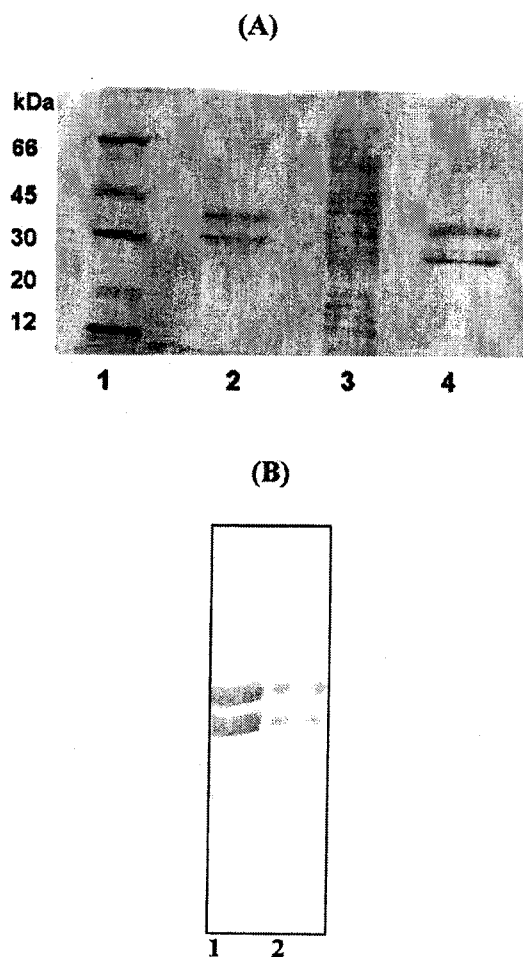


Fig. 5. (A) SDS–polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of 2-mercaptoethanol. Samples: standard (lane 1), (PII) callus pulchellin (lane 2), *A. pulchellus* callus crude extract (lane 3) and Seeds pulchellin. (B) Western blot analysis from using rabbit polyclonal antibodies produced against pulchellin (seed lectin). Samples: seed pulchellin (lane 1) and callus pulchellin (lane 2).

pulchellin can be shown through the RT-PCR. This technique allowed synthesis of cDNA from callus total RNA by reverse transcription and amplification of a band around 800 bp corresponding to the pulchellin A chain (Fig. 6). These data show that the pulchellin is produced in callus culture and allows us exclude the hypothesis of the toxic activity as function of residual proteins from seed explants.

The pulchellin synthesized in culture was found to be biologically active and comparable to the seed lectin. In vitro culture provided a means to studying the regulation of the pulchellin, as well as a model system to investigate the regulation of the biosynthesis of protein through

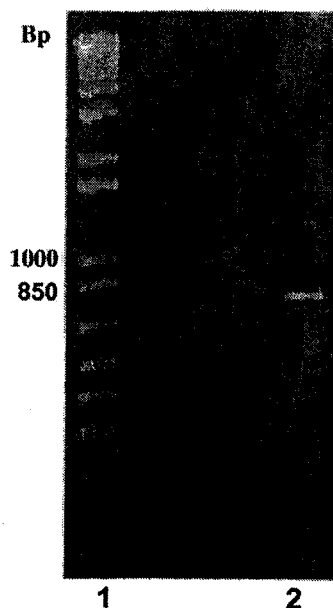


Fig. 6. RT-PCR callus analysis. Samples: 1 kb plus DNA Ladder—Promega (lane 1) and A-chain amplification using callus cDNA as template (lane 2).

exogenously supplied growth regulators, thus providing a clue to their physiological functions. *A. pulchellus* callus cultures also represent a convenient system to obtain and purify considerable amounts of sterile RIPs for pharmaceutical applications.

#### Acknowledgements

To Dr Antônio José da Costa Filho for revising the translation of manuscript to English. 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

- Asano, K., Svensson, B., Powsen, F.M., 1984. Isolation and characterization of inhibitors of animal cell-free protein-synthesis from barley-seeds. *Calsberg Research Community* 49, 619–626.
- Au, T.K., Collins, R.A., Lam, T.L., Ng, T.B., Fong, W.P., Wan, D.C.C., 2000. The plant ribosome inactivating proteins luffin and saporin are potent inhibitors of HIV-1 integrase. *FEBS Lett* 471, 169–172.
- Beaume, B., Alami, M., Hopkins, C.R., 1993. ATP-dependent translocation of ricin across the membrane of purified



- endosomes. *Journal of Biological Chemistry* 268, 23661–23669.
- Bhattacharya, P.S., Maiti, T.K., Bhattacharya, B.C., 1992. Tissue culture of *Abrus precatorius* and in vitro *Abrus* lectin production: A new report. In: Whelan, W.J., Ahmed, F., Bialy, H., Black, S., King, M.L., Rabin, M.B., Solomonson, L.B., Vasil, I.K. (Eds.), *Proceedings of the 1992 Maime Bio/Technology Winter Symposium*, Vol. I, p. 34.
- Bolognesi, A., Barbieri, L., Abbondanza, A., Battelli, M.G., 1990. Purification and properties of new ribosome-inactivating proteins with RNA *N*-glycosidase activity. *Biochimica et Biophysica Acta* 1087 (3), 293–302.
- Borebaeck, C.A.K., Linsefors, L., 1985. Hormonal regulation of the lectin biosynthesis in callus culture of the *Phaseolus vulgaris* plant. *Plant Physiology*, 79, 659–662.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254.
- Chrispeels, M.J., Raikhel, N.V., 1991. Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. *Plant Cell* 3 (1), 1–9.
- D'Silva, I., Podder, S.K., 1994. Peanut agglutinin from callus and cell suspension cultures of *Arachis hypogae* L. *Plant Cell*, 14, 50–54.
- D'Silva, I., Vaidyanathan, C.S., Podder, S.K., 1993. Ribosome-inactivating proteins and agglutinins from callus and suspension cultures of *Ricinus communis* L. and *Abrus precatorius* L. *Plant Science* 94, 161–172.
- Datta, P.K., Figueroa, M.O.D.C.R., Lajolo, F.M., 1991. Purification and characterization of 12 major lectins from *Araucaria brasiliensis* syn *Araucaria angustifolia* seeds (Pinhao). *Plant Physiology* 97 (3), 856–862.
- Doran, P.M., 2000. Foreign protein production in plant tissue cultures. *Current Opinion in Biotechnology* 11, 199–204.
- Endo, Y., Tsurugi, K., 1987. RNA *N*-glycosidase activity of ricin A-chain: mechanism of action of the toxic lectin ricin on eukaryotic ribosomes. *Journal of Biological Chemistry* 262, 8128–8130.
- 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 28-S ribosomal-RNA caused by the toxins. *Journal of Biological Chemistry* 262 (12), 5908–5912.
- Frankel, A.E., Fu, T., Burbage, C., Tagge, E., Harris, B., 1997. Lectin-deficient ricin toxin intoxicates cells bearing the D-mannose receptor. *Carbohydrate Research* 300, 251–258.
- Franz, H., 1993. The in vivo toxicity of toxin lectins is a complex phenomenon. In: Van Driessche, E., Franz, H., Beeckmans, S., Pfuller, U., Kalliform, A., Bog-Hansen, T.C. (Eds.), *Lectins: Biology-Biochemistry, Clinical Biochemistry*, Textop DK, vol. 8., pp. 5–9.
- Gupta, N., Srivastava, P.S., 1998. Purification and characterization of a lectin from seeds and cotyledonary callus of *Zizyphus mauritiana*. *Plant Cell Reports* 17, 552–556.
- Hedger, R., Podder, S.K., 1997. A- and B- subunit variant distribution in the holoprotein variants of protein toxin abrin: variants of abrin I and III have constant toxic A subunits and variant lectin B subunits. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 344 (1), 75–88.
- Ikeda, T., Takanami, Y., Imaizumi, S., Matsumoto, T., Mikami, Y., Kubo, S., 1987. Formation of anti-plant viral protein by *Mirabilis jalapa* L. cells in suspension culture. *Plant Cell Reports* 6 (3), 216–218.
- Jayavardhanan, K.K., Padikkala, J., Panikkar, K.R., 1996. Lectin biosynthesis in callus established from seeds of *Canavalia virosa*. *Biologia Plantarum* 38 (3), 329–334.
- Kreitman, R.J., Pastan, I., 1998. Immunotoxins for targeted cancer therapy advanced. *Drug Delivery Reviews* 31 (1–2), 53–88.
- Leah, R., Tommerup, H., Svendsen, I., Mundy, J., 1991. Biochemical and molecular characterization of 3 barley seed proteins with antifungal properties. *Journal of Biological Chemistry* 266 (3), 1564–1573.
- Moreira, R.A., Perrone, J.C., 1977. Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiology* 59, 783–787.
- Nielsen, K., Boston, R.S., 2001. Ribosome-inactivating proteins: a plant perspective. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52, 785–816.
- Olsnes, S., Pihl, A., 1982. Toxic lectins and related proteins. In: Cohen, P.C., Van Heyningen, S. (Eds.), *Molecular Action of Toxins and Viruses*, vol. 2. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, pp. 51–105.
- Olsnes, S., Pihl, A., 1981. Chimeric toxins. *Pharmacology and Therapeutics* 15 (3), 355–381.
- Olsnes, S., Sandvig, K., 1988. How protein toxins enter and kill cells. *Cancer Treatment Research* 37, 39–73.
- Parente, A., Deluca, P., Bolognesi, A., Barbieri, L., Battelli, M.G., Abbondanza, A., Sande, M.J.W., Gigliano, G.S., Tazzari, P.L., Stirpe, F., 1993. Purification and partial characterization of single-chain ribosome-inactivating proteins from the seeds of *Phytolacca dioica* L. *Biochimica et Biophysica Acta* 1216 (1), 43–49.
- Pastan, I., Pai, L.H., Brinkmann, U., FitzGerald, D., 1996. Recombinant immunotoxins. *Breast Cancer Research and Treatment* 38 (1), 3–9.
- Pratt, R.C., Singh, N.H., Shade, R.E., Murdock, L.L., Bressan, R.A., 1990. Isolation and partial characterization of a seed lectin from tepary bean that delays bruchid beetle development. *Plant Physiology* 93, 1453–1459.
- Ramos, M.V., Mota, D.M., Teixeira, C.R., Cavada, B.S., Moreira, R.A., 1998. Isolation and partial characterization of highly toxic lectins from *Abrus pulchellus* seeds. *Toxicon* 36 (3), 477–484.
- Sandvig, K., Vandeurs, B., 1994. Endocytosis and intracellular sorting of ricin and shiga toxin. *FEBS Letters* 346 (1), 99–102.
- Selitrennikoff, C.P., 2001. Antifungal proteins. *Applied and Environmental Microbiology* 67 (7), 2883–2894.
- Singh, R.C., Singh, V., 2000. Current status of ribosome inactivating proteins. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics* 37, 1–5.
- Spooner, R.A., Lord, J.M., 1990. Immunotoxins: status and prospects. *Trends in Biotechnology* 8, 189–193.
- Steeves, R.M., Denton, M.E., Barnard, F.C., Henry, A., Lambert, J.M., 1999. Identification of three oligosaccharide binding site in ricin. *Biochemistry* 38, 11677–11685.
- Stirpe, F., Barbieri, L., Battelli, M.G., Soria, M., Lappi, D.A., 1992. Ribosome-inactivating proteins from plants: present status and future prospects. *Biotechnology* 10, 405–412.
- Stirpe, F., Gasperi-Campani, A., Barbieri, L., Falasca, A., Abbondanza, A., Stevens, W.A., 1983. Ribosome-inactivating proteins from the seeds of *Saponaria officinalis* L. (Soapwort), of *Agrostemma githago* L. (Corn cockle) and of

- Asparagus officinalis* L. (*Asparagus*), and from the latex of *Hura crepitans* L. (Sandbox tree). *Biochemical Journal* 216 (3), 617–625.
- Stirpe, F., Barbieri, L., Battelli, M.G., Falasca, A.I., Abbondanza, A., Lorenzoni, E., Stevens, W.A., 1986. A ribosome-inactivating protein from the roots of *Bryonia dioica* L. (White Bryony). *Biochemical Journal* 240 (3), 659–665.
- Stirpe, F., Olsnes, S., Pihl, A., 1980. Gefonin, a new inhibitor of protein-synthesis, nontoxic to intact-cells-isolation, characterization, and preparation of cytotoxic complexes with concanavalin-A. *Journal of Biological Chemistry* 255 (14), 6947–6953.
- Swimmer, C., Lehar, S.M., McCafferty, J., Chiswell, D.J., Blatter, W.A., Guild, B.C., 1992. Phage display of ricin B chain and its single binding domains: system for screening galactose binding mutants. *Proceedings of National Academy of Science, USA* 89, 3756–3760.
- Thorpe, P.E., Blakey, D.C., Brown, A.N.F., Knowles, P.P., Knyba, R.E., Wallace, P.M., Watson, G.J., Wawrzynczak, E.J., 1987. 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. *Journal of the National Cancer Institute* 79 (5), 1101–1112.
- Vivanco, J.M., Querci, M., Salazar, L.F., 1999. Antiviral and antiviroid activity of MAP-containing extracts from *Mirabilis jalapa* roots. *Plant Disease* 83 (12), 1116–1121.
- Zarling, J.M., Maran, P.A., Haffar, D., Sias, J., Richman, D.D., Spina, C.A., Myers, D.A., Kuebelbeck, J.A., Uckum, F.M., 1990. Inhibition of HIV replication by pokeweed antiviral protein targeted CD4<sup>+</sup> cells by monoclonal antibodies. *Nature* 347, 92–95.