

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

LUIS FERNANDO REYES

**Proteínas inativadoras de ribossomos:
identificação de novas proteínas e estudos de interação da cadeia-A
da pulchellina (PAC) com monocamada de Langmuir**

São Carlos

2011

LUIS FERNANDO REYES

**Proteínas inativadoras de ribossomos:
identificação de novas proteínas e estudos de interação da cadeia-A
da pulchellina (PAC) com monocamada de Langmuir**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Física Aplicada

Opção: Física Biomolecular.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Ulian de Araújo

Versão Corrigida

(versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos

2011

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação IFSC/USP

Reyes, Luis Fernando

Proteínas inativadoras de ribossomos: identificação de novas proteínas e estudos de interação da PAC (pulchellin A-chain) com monocamada lipídica./ Luis Fernando Reyes;orientadora Ana Paula Ulian de Araujo.—versão corrigida --São Carlos, 2011.

144 p.

Tese (Doutorado em Ciências - Área de concentração: Física Aplicada - Opção: Biomolecular) – Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo.

1. RIP. 2. Pulchellina. 3.Expressão heterológa . 4. Cana-de-acúcar. 5. Monocamada Langmuir. I.Título.

Dedico esta tese aos meus pais, Pedro e
Genoveva, exemplos de vida.

AGRADECIMENTOS

Aproveito este espaço para expressar a minha gratidão para todas aquelas pessoas que me acompanharam durante este longo e por vezes difícil momento da minha vida profissional.

Agradeço à Professora Ana Paula Ulian Araújo pela oportunidade oferecida, pela paciência e pela valiosa contribuição durante a finalização do trabalho.

Agradeço aos Drs. Tathiane Murimoto Nobre e Maximiliano Juri Ayub, pelo estímulo constante e pelo esforço e contribuição para que este trabalho fosse concluído.

Agradeço a professora Dra. Heloisa Selistre de Araújo (UFSCar) pela ajuda oferecida com este e outros projetos realizados.

Agradeço a colaboração do Professor Dr. Ricardo De Marco (IFSC) e do Dr. Napolão Valadares (IFSC) pela enriquecedora discussão sobre identificação das novas RIPs.

Agradeço aos colegas e amigos do laboratório pela colaboração, amizade e pelos gratos momentos vividos, em especial ao Zé pela enorme paciência e ajuda com os experimentos com vesículas e também a Jocy, pela ajuda com os experimentos “em paralelo” realizados.

Agradeço ao corpo técnico do laboratório, Andressa e Bel, exemplos de profissionais, altamente eficientes e organizados, capazes de aguentar mais de 100 vezes a mesma pergunta: em um mesmo dia!

Agradeço também ao Prof. Osvaldo Novais de Oliveira Júnior e ao Dr. Felipe Pavinatto, IFSC Grupo de Polímeros “Bernard Gross”, pela contribuição nos estudos com IRRAS.

Agradeço a minha namorada e fiel companheira Débora pelo amor, paciência e compreensão, principalmente nos momentos mais difíceis.

Agradeço aos amigos e familiares em geral pelo apoio incondicional.

Agradeço as agências e programas que financiaram este trabalho, PEC-PG (Capes) e CEPID (Fapesp).

*“No meio do caminho
No meio do caminho tinha uma pedra
tinha uma pedra no meio do caminho
tinha uma pedra
no meio do caminho tinha uma pedra.
Nunca me esquecerei desse acontecimento
na vida de minhas retinas tão fatigadas.
Nunca me esquecerei que no meio do
caminho
tinha uma pedra
tinha uma pedra no meio do caminho
no meio do caminho tinha uma pedra”*
Carlos Drummond de Andrade

Resumo

REYES, L. F **Proteínas inativadoras de ribossomos**: identificação de novas proteínas e estudos de interação da cadeia-A da pulchellina (PAC) com monocamada de Langmuir 2011.144 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

Proteínas Inativadoras de Ribossomos (RIPs) são rRNA *N*-glicosilases capazes de inibir a síntese proteica pela remoção de uma adenina específica do RNA ribossomal. São geralmente classificadas em tipo 1 e tipo 2, sendo as últimas divididas em altamente tóxicas e não tóxicas. A maior parte das RIPs tipo 2 identificadas pertence a espécies de dicotiledôneas, como é o caso da pulchellina. As cadeias tóxicas das RIPs possuem uma região C-terminal hidrofóbica conservada, a qual se atribui a capacidade de interação com a membrana do retículo endoplasmático (RE), durante o transporte retrógrado da toxina para o citosol. Neste trabalho duas abordagens diferentes foram aplicadas para o estudo das RIPs tipo 2: identificação e caracterização de novos integrantes desta família de proteínas, e investigação da interação da cadeia-A da pulchellina (PAC) com sistemas miméticos da membrana celular. Na primeira abordagem, uma busca *in silico* em bancos de dados genéticos públicos permitiu identificar quatro novas RIPs do tipo 2 de monocotiledôneas. A análise da estrutura primária das proteínas identificadas mostrou a ocorrência de mutações em alguns dos principais aminoácidos que formam o sítio ativo nas RIPs, indicando uma possível perda de função. O representante de *Saccharum officinarum* (cana-de-açúcar) foi então analisado em maior detalhe, sendo sua cadeia-A clonada (soRIPA), expressa em sistema heterólogo e caracterizada em termos de atividade e estrutura secundária. Os ensaios *in vitro* mostraram que a soRIPA não foi capaz de depurar ribossomos eucariotos. Porém, os ensaios de inibição da síntese proteica mostraram uma possível atividade inibitória da soRIP, que precisa ainda ser confirmada. A presença dos transcritos no banco do SUCEST sugere que estes genes não sejam pseudogenes, embora não tenha sido possível purificar a proteína a partir de extratos de folhas. Isto indica que se a soRIP está sendo traduzida, deve sofrer um rápido *turnover*, tornando difícil a sua detecção e purificação ou, ainda, que a ausência de sítios de ligação à galactose funcionais na cadeia-B impediu sua purificação por cromatografia de afinidade à galactose. A outra abordagem no estudo das RIPs tipo 2 foi centrada na cadeia-A recombinante da pulchellina (rPAC), estudando sua interação com monocamadas de Langmuir. Foram construídos 3 mutantes da rPAC, cada um com diferentes deleções na região C-terminal visando determinar a região responsável pela interação com a membrana do RE. A cinética de adsorção e pressão superficial exercida pela rPAC sobre a monocamada, assim como o estudo com os mutantes demonstraram que a proteína interage fortemente com a monocamada fosfolipídica e que esta interação *in vitro* é dependente da presença da região C-terminal. De forma geral, os resultados obtidos neste trabalho contribuíram com novas informações sobre esta família de proteínas, identificando e analisando novos integrantes e, ainda, adicionando detalhes do mecanismo funcional do tráfego das toxinas RIPs.

Palavras chaves: RIP. Pulchellina. Expressão heterológica. Cana-de-açúcar. monocamada Langmuir.

ABSTRACT

REYES, L. F. **Ribosome inactivating proteins:** identification of new members and studies of the interaction of pulchellin A-chain (PAC) with Langmuir monolayers 2011. 144 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

Ribosome Inactivating Proteins (RIPs) are rRNA N-glycosylases which are able to inhibit the protein synthesis by removing a specific adenine from the ribosomal RNA. They are usually classified as type 1 and type 2, being the latter divided into highly toxic and nontoxic. The majority of type 2 RIPs currently identified are found in species of dicotyledons, as the pulchellin. The toxic chain of RIPs has a conserved hydrophobic C-terminal region, which is believed to be responsible for the interaction with the lipid membrane of the endoplasmic reticulum ER during the retrograde transport of the toxin to the cytosol. In this work, two different approaches were applied in the study of type 2 RIPs: identification and characterization of new members of this protein family, and investigation of the interaction of the pulchellin's A-chain (PAC) with systems that mimic the cellular membrane. In the first approach, an *in silico* search in public genetic databases was performed and allowed us to identify four new type 2 RIPs in monocots. The primary structure analysis of the identified proteins showed the presence of mutations in key amino acids that form the active site of RIPs, indicating a possible interference on its catalytic activity. The representative of *Saccharum officinarum* (sugar cane) was then analyzed in greater detail. Its A-chain clone (soRIPA) was expressed in a heterologous system and characterized in terms of activity and secondary structure. *In vitro* experiments showed that soRIPA was not able to perform the depurination of eukaryotic ribosomes. However, the inhibition of protein synthesis assays presented a possible low inhibitory activity of the soRIP, which still needs to be further investigated. The presence of transcripts on the bank of SUCEST indicates that these genes are not pseudogenes, although it was not possible to purify the protein from leaf extracts. If the soRIP is being translated, this may indicate that it undergoes a quick turnover, preventing its detection and purification. It is also possible that the absence of functional galactose binding sites in the B-chain has prevented its purification by galactose affinity chromatography. Our second approach to the study of type 2 RIPs was focused on the recombinant pulchellin A-chain (rPAC), by investigating its interaction with Langmuir monolayers. We have constructed three mutants of rPAC, each one with different deletions at the C-terminal to determine the region responsible for interaction with the membrane of the ER. The adsorption kinetic and surface pressure applied by rPAC on the monolayer, as well as the study of the mutants, have demonstrated that the protein has a strong interaction with the phospholipid monolayer and that this interaction *in vitro* is dependent on the presence of the C-terminal. The results of this work have provided new information about the type 2 RIP protein family, identifying and analyzing new members, and also bringing new details about the functional mechanism of the RIP's toxin traffic.

Keywords: RIP. Pulchellin. Heterologous expression. Sugarcane. Langmuir monolayers

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Imagens das plantas <i>Ricinus communis</i> e <i>Abrus precatorius</i>	29
Figura 1.2	Representação esquemática do sítio específico de ação das RIPs em ribossomos de ratos.	31
Figura 1.3	Representação esquemática da organização molecular das RIPs tipo 1 e 2.	32
Figura 1.4	Representação esquemática da estrutura molecular das RIPs tipo 3: a b-32 de milho e a JIP60 de cevada.	33
Figura 1.5	Esquema do modelo de internalização e tráfego da ricina (holotoxina) em células eucariotas (49).	37
Figura 1.6-	Sequência de resíduos da região C-terminal da RTA envolvidos no direcionamento da proteína ao RE	38
Figura 1.7	Fruto de <i>Abrus pulchellus tenuiflorus</i> .	40
Figura 1.8	Estrutura tridimensional da pulchellina (isoforma P II).	42
Figura 1.9	Esquema representativo das reações <i>in vitro</i> que ocorrem no sistema livre de células	61
Figura 2.1	Sequências obtidas do banco de dados para EST da cana-de-açúcar que apresentaram identidade com a sequência proteica da ricina.	64
Figura 2.2	Alinhamento da região C-terminal (SC c-term) obtida por seqüenciamento e tradução do clone da soRIP (sc2 c-ter) com sequência da proricina.	65
Figura 2.3	Análise de restrição dos clones de ESTs da biblioteca de cana-de-açúcar.	66
Figura 2.4	Esquema representativo do transcrito parcial para soRIP obtido pelo alinhamento de sequências de ESTs (barras em laranja).	67
Figura 2.5	Resultado do alinhamento do transcrito parcial para soRIP (<i>Query</i>) com um clone proveniente do genoma do milho.	68
Figura 2.6	Resultado do <i>blastx</i> feito com a sequência de DNA genômico de milho (DX885619.1) mostrando identidade significativa com várias RIPs tipo 2.	68

Figura 2.7	Resultado do <i>blastn</i> , usando a sequência de milho como <i>query</i> na procura por sequências semelhantes no banco de ESTs da cana-de-açúcar.	69
Figura 2.8	Fase Aberta de Leitura (ORF, <i>Open Reading Frame</i>) do gene <i>sorip</i> e sequência de aminoácidos deduzida.	71
Figura 2.9	Alinhamento da sequência de aminoácidos das formas imaturas da ricina (ppricina:código P02879) e da soRIP.	75
Figura 2.10	Esquema representando as cadeias-B da ricina (RTB) e da soRIP (soRIPB) e as características principais que as definem.	78
Figura 2.11	Resultado da amplificação por PCR do gene <i>sorip</i> a partir do DNA genômico extraído da cana-de-açúcar (folha).	80
Figura 2.12	Clonagem do cDNA codificante da cadeia A de soRIP.	83
Figura 2.13	Análise de expressão e solubilidade da soRIPA.	84
Figura 2.14	Análise da solubilidade e purificação da soRIPA.	86
Figura 2.15	Análise das amostras de soRIPA durante a diálise com concentrações decrescentes de uréia.	87
Figura 2.16	Espectro de CD da soRIPA após a cromatografia de exclusão molecular (F15 e 16 da figura 2.15).	89
Figura 2.17	Ensaio de inibição da síntese protéica da soRIPA em extrato livre de células (TNT® Coupled Reticulocyte Lysate System-Promega).	91
Figura 2.18	Ensaio de depuração de ribossomos de rato.	92
Figura 3.1	Estrutura primária da cadeia-A da pulchellina (PAC), destacando as deleções na região C terminal.	100
Figura 3.2	Cuba de Langmuir KSV utilizada para fabricação das monocamadas de Langmuir.	103
Figura 3.3	Resultado do alinhamento das cadeias-A de vários representantes RIPs do tipo 2.	104
Figura 3.4	Modelo estrutural da PAC. (A) Destaque da região C-terminal e (B) sobreposição da região C-terminal da PAC (azul) com a da RTA, em verde.	104
Figura 3.5	Produto de PCR correspondente a amplificação da cadeia-A da pulchellina rPAC.	106

Figura 3.6	Expressão e purificação da rPAC em <i>E.coli</i> BL21(DE3).	107
Figura 3.7	Expressão e purificação dos mutantes C-terminal da rPAC.	108
Figura 3.8	Ensaio de depurinação da rPAC e mutantes.	109
Figura 3.9	Análise da estrutura secundária da rPAC e seus mutantes por dicroísmo circular.	110
Figura 3.10	Cinéticas de adsorção para diferentes concentrações de rPAC em monocamadas de (A) DPPG e (B) DPPC.	111
Figura 3.11	Isoterma de π -A por molécula para monocamadas de DPPG e rPAC, a 20°C.	113
Figura 3.12	Cinética de adsorção da rPAC e os mutantes, rPAC Δ 244, rPAC Δ 239 e rPAC Δ 236 em monocamadas de Langmuir constituídas do lipídio DPPG.	116
Figura 3.13	Gráfico de pressão superficial por área molecular de DPPG (π -A).	117
Figura 3.14	Cinéticas de adsorção da rPAC 236 injetada a partir de uma solução estoque (verde) diluída, (azul) concentrada e (rosa) desnaturada.	118
Figura 3.15	Gráfico de pressão superficial por área molecular (π -A) da rPAC 236	119
Figura 3.16	Isoterma de pressão superficial vs. área por molécula para monocamadas de DPPG.	120
Figura 3.17	Cinéticas de adsorção da rPAC em monocamada de DPPG, temperatura de 37°C.	121
Figura 3.18	Isoterma de pressão superficial vs. área por molécula para monocamadas de DPPG e rPAC, temperatura 37°C.	122
Figura 3.19	Cinéticas de adsorção da (A) rPAC Δ 244 e (B) rPAC Δ 239 em monocamada de DPPG, temperatura de 37°C.	123
Figura 3.20	Cinéticas de adsorção da rPAC Δ 236 em monocamada de DPPG, temperatura de 37°C.	124
Figura 3.21	Isoterma de pressão superficial vs. área por molécula para monocamadas de DPPG e rPAC Δ 236, temperatura 37°C.	125
Figura 3.22	Espectro de PM-IRRAS para monocamada de DPPG em	126

presença de rPAC

Figura 3.23 Espectro de PM-IRRAS para monocamada de DPPG em 127
presença do mutante rPAC^{Δ236}

LISTA DE TABELAS

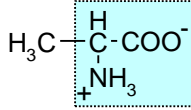
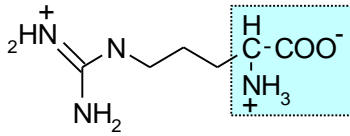
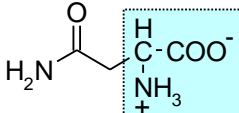
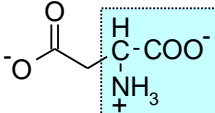
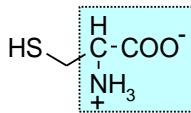
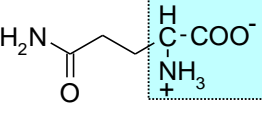
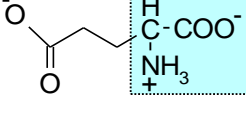
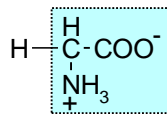
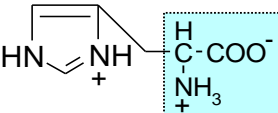
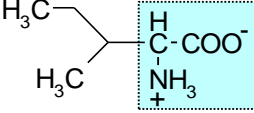
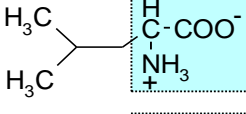
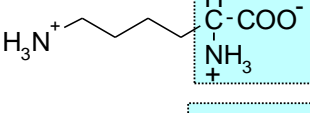
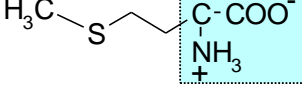
Tabela 2.1	Clones de ESTs obtidos do projeto SUCEST para <i>Saccharum officinarum</i> (variedade SP80-3280).	50
Tabela 2.2	<i>Primers</i> utilizados para análise e sequenciamento dos clones adquiridos do projeto SUCEST e ampliações posteriores da ORF completa para o gene sorip.	51
Tabela 2.3	Novas sequências homólogas a soRIP e a Ricina.	82
Tabela 3.1	Lista de Proteínas da família RIP tipo 2 utilizadas para o alinhamento e análise da região C-terminal.	99

LISTA DE ABREVIATURAS

AA:	Aminoácidos
BLAST:	<i>Basic local alignment search tool</i>
CD:	<i>Circular dichroism;</i>
cDNA:	DNA complementar
CI:	Corpos de inclusão
D.O₆₀₀:	Densidade óptica em 600nm
DEPC:	Dietilpirocarbonato
DFHR:	Diidrofolato redutase
DMSO :	Dimetil sulfóxido
DOPC:	<i>1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine</i>
DOPG:	<i>1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-[phospho-rac-(3-lysyl(1-glycerol))]</i>
DTT:	Ditiotreitol
EDTA:	Ácido etilenodiamino-tetra-acético
EF-1:	<i>Elongation factor 1</i>
EF-2:	<i>Elongation factor 2</i>
EMBRAPA:	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ERAD:	<i>Endoplasmic reticulum associated protein</i>
EST:	<i>Expressed sequence tags</i>
Gal:	<i>Galactose</i>
GalNAc:	N-Acetil-D-galactosamina
GalNAc:	N-Acetil-D-galactosamina
His-tag:	Cauda de histidinas
HPLC:	<i>High performance liquid chromatography</i>
IC50:	<i>Inhibitory concentration 50;</i>
IPTG:	Isopropil- β -tio-galactopiranosídeo
Kb:	<i>Kilobase</i>
kDa:	<i>kiloDalton</i>
LB:	Meio de cultura Luria Bertani
MM:	Marcador de Massa Molecular
NCBI:	<i>National Center of Biotechnology Information</i>
Neu5Ac(α, 2–6)	N- acetilneuroamínico
Gal/GalNAc):	
Oligo dT:	Oligonucleotídeo constituído de várias timinas
ORF:	Fase aberta de leitura
PAC:	<i>Pulchellin A-chain</i> ; Cadeia-A da pulchellina
pb :	Pares de bases
PBC:	<i>Pulchellin B-chain</i> ; Cadeia-B da pulchellina
PBS:	<i>Phosphate Saline Buffer</i> ; Tampão fosfato-salino
PCR:	<i>Polymerase Chain Reaction</i> ; Reação em cadeia da polimerase
PDB:	<i>Protein Data Bank</i> ; Banco de Dados de Proteínas
PDI:	<i>Protein disulfide isomerase</i> ;
pI:	Ponto isoelétrico
PVPP:	Polyvinylpyrrolidone
RE:	Retículo endoplasmático
RIPs:	<i>Ribosome inactivating proteins</i>
rPAC :	Cadeia-A da pulchellina recombinante
rpm:	Rotações por minuto

rRNA:	RNA ribossomal
RTA:	Cadeia-A da ricina
RT-PCR:	<i>Reverse transcriptase-polymerase chain reaction;</i>
SDS:	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE:	<i>Sodium Duodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis;</i> Eletroforese em Gel de Poliacrilamida- Duodecil Sulfato de Sódio
SUCEST:	<i>Sugarcane EST</i>
TCA:	Ácido tricloroacético
TGN:	<i>Trans-Golgi-Network</i> , rede trans-Golgi
U:	Unidade de atividade enzimática
UTR	<i>Untranslated region</i>
UV:	Ultravioleta
X-gal:	5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galctopiranosídeo

LISTA DE AMINOÁCIDOS

Nome	1 letra	3 letras	Estrutura
Alanina	A	Ala	
Arginina	R	Arg	
Asparagina	N	Asn	
Ácido aspártico	D	Asp	
Cisteína	C	Cys	
Glutamina	Q	Gln	
Ácido Glutâmico	E	Glu	
Glicina	G	Gly	
Histidina	H	His	
Isoleucina	I	Ile	
Leucina	L	Leu	
Lisina	K	Lys	
Metionina	M	Met	

Fenilalanina	F	Phe	
Prolina	P	Pro	
Serina	S	Ser	
Treonina	T	Thr	
Triptofano	W	Trp	
Tirosina	Y	Tyr	
Valina	V	Val	

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO	27
1.1 As Proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs)	29
1.2 Proteínas inativadoras de ribossomos: atividade RNA N-glicosilase	30
1.3 Classificação	31
1.4 Distribuição e evolução das RIPs.....	34
1.5 Transporte Retrógrado das RIPs tipo 2 e interação com membranas.	35
1.6 Aplicações das RIPs.....	38
1.7 Funções das RIPs no organismo de origem	39
1.8 A Pulchellina.....	40
1.9 Atividade N-glicosilase e Citotoxicidade.....	41
1.10 Estrutura Cristalográfica da Pulchellina	41
CAPÍTULO 2: IDENTIFICAÇÃO DE NOVAS RIPS	45
2.1 Identificação <i>in silico</i> de genes que codificam rips em cana-de-açúcar (<i>Saccharum officinarum</i> sp) e outras monocotiledôneas	47
2.2 OBJETIVOS	47
2.3 MATERIAIS	48
2.4 MÉTODOS	49
2.4.1 Busca e identificação de genes similares a RIPs em bancos de dados de genes.....	49
2.4.2 Clones de ESTs da cana-de-açúcar (<i>Saccharum officinarum</i> sp. var SP80-3280)	50
2.4.3 Sequenciamento dos clones de ESTs.	51
2.4.4 Análise de restrição dos clones ESTs obtidos.....	52
2.4.5 Obtenção do material vegetal.....	52
2.4.6 Extração de DNA genômico de Cana-de-açúcar	52
2.4.7 Extração de RNA total de diferentes tecidos vegetais e síntese do cDNA	53
2.4.8 Tratamento do RNA total com DNase e síntese de cDNA	54
2.4.9 Amplificação do fase de leitura aberta (ORF) do gene codificante para soRIP a partir do DNA genômico da Cana-de-açúcar	55
2.4.10 Amplificação da cadeia A da soRIP (soRIPA) de cana-de-açúcar	55
2.4.11 Clonagem dos produtos de PCR e subclonagem de <i>soripA</i> em vetor de expressão.	56
2.4.12 Expressão heteróloga e purificação da soRIPA	57
2.4.13 Renovelamento da soRIPA	58
2.4.14 Cromatografia de Exclusão Molecular.	58
2.4.15 Medidas de dicroísmo circular (CD).....	58
2.4.16 Obtenção do extrato bruto (EB) de <i>S. officinarum</i> (protocolo 1).....	59
2.4.17 Obtenção do extrato bruto (EB) de Cana-de-açúcar, <i>S. officinarum</i> (protocolo 2).....	59
2.4.18 Cromatografia de afinidade em coluna de D-galactose	60
2.4.19 Determinação da atividade da proteína recombinante soRIPA:	61
2.4.19.1 Ensaio de inibição da síntese proteica em sistema livre de células.	61
Transcrição e Tradução acopladas e Reação catalisada pela Luciferase:.....	61
2.4.19.2 Ensaio de depuração de ribossomos de rato	62

2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
2.5.1 Análise de restrição dos clones de cDNA obtido do SUCEST.	65
2.5.2 Caracterização da ORF (<i>Open Reading Frame</i>) da soRIP	69
2.5.3 Análise da estrutura primária do precursor proteico de soRIP (ppsoRIP).	73
2.5.3.1 Sequências sinalizadoras: peptídeo sinal e “linker”	73
2.5.3.2 Cadeia A da soRIP (soRIPA)	76
2.5.3.3 Cadeia B da soRIP (soRIPB).....	77
2.5.3.4 Determinação da presença de introns no gene <i>sorip</i>	80
2.5.5 Identificação de representantes homólogos da soRIP na família <i>Poacea</i>	81
2.5.6 Clonagem e subclonagem do gene <i>soripA</i>	82
2.5.7 Ensaios de expressão e solubilidade da soRIPA em <i>Escherichia coli</i>	84
2.5.8 Purificação da soRIPA recombinante.....	85
2.5.9 Reenovelamento da soRIPA e purificação por Cromatografia de Exclusão molecular. .	85
2.5.10 Avaliação da estrutura secundária da soRIPA por Dicroísmo Circular (CD).....	88
2.5.11 Ensaio da atividade da SoRIPA recombinante <i>in vitro</i>	89
2.5.11.1 Inibição da síntese proteica em sistema “livre de células”	90
2.5.11.2 Ensaio de Depurinação de Ribossomos de Rato.	91
2.5.11.3 Purificação da proteína soRIP nativa a partir do extrato bruto (EB) de folhas de cana	92
2.6 CONCLUSÕES e CONSIDERAÇÕES FINAIS	93
CAPITULO 3: A REGIÃO C-TERMINAL DA CADEIA A DA PULCHELLINA E SUA INTERAÇÃO COM SISTEMAS BIOMIMÉTICOS	95
3.1 A região C-terminal da cadeia A da pulchellina e sua interação com sistemas biomiméticos	97
3.2 OBJETIVOS	98
3.3 MATERIAIS E MÉTODOS	98
3.3.1 Obtenção das proteínas recombinantes e mutantes	98
3.3.1.1 Clonagem e expressão da rPAC e Formas truncadas	98
3.3.1.2 Purificação das proteínas recombinantes.....	101
3.3.1.3 Atividade RNA-Glicosilase.....	101
3.3.1.4 Dicroísmo Circular (CD)	102
3.3.2 Técnicas Biofísicas	102
3.3.2.1 Monocamadas de Langmuir	102
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	103
3.4.1 Determinação da região C-terminal da rPAC.....	103
3.4.3 Expressão e Purificação.....	106
3.4.4 Atividade RNA-Glicosilase.....	108
3.4.5 Estudos estruturais comparativos da rPAC e do três mutantes por Dicroísmo Circular	109
3.4.6 Estudos de interação da rPAC com Sistemas biomiméticos	110
3.4.6.1 Estudos de interação da rPAC e as três formas truncadas com monocamadas de Langmuir.	112
3.4.6.2 Interação da rPAC com a monocamada de DPPG a temperatura de 20 °C	112

3.4.6.3 Análise comparativa dos mutantes da rPAC em monocamadas de Langmuir de DPPG a 20 ° C.....	114
3.3.6.5 Análise da interação da rPAC com a monocamada de Langmuir por Espectroscopia na região do infravermelho (PM-IRRAS)	124
3.4 CONCLUSÕES	127
REFERÊNCIAS	129

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

Introdução

1.1 As Proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs)

A busca pela sobrevivência levou o homem a procurar plantas que pudessem ser úteis tanto para a subsistência quanto para a cura de doenças. Desta maneira a descoberta de plantas tóxicas ou com poderes curativos remete a tempos antigos. De fato, as propriedades tóxicas da mamona (*Ricinus comunis*) e do Jequeriti (*Abrus precatorius*) (Figura 1.1, A e B) data dos tempos das civilizações gregas e egípcias, nas quais essas plantas eram usadas com fins terapêuticos.

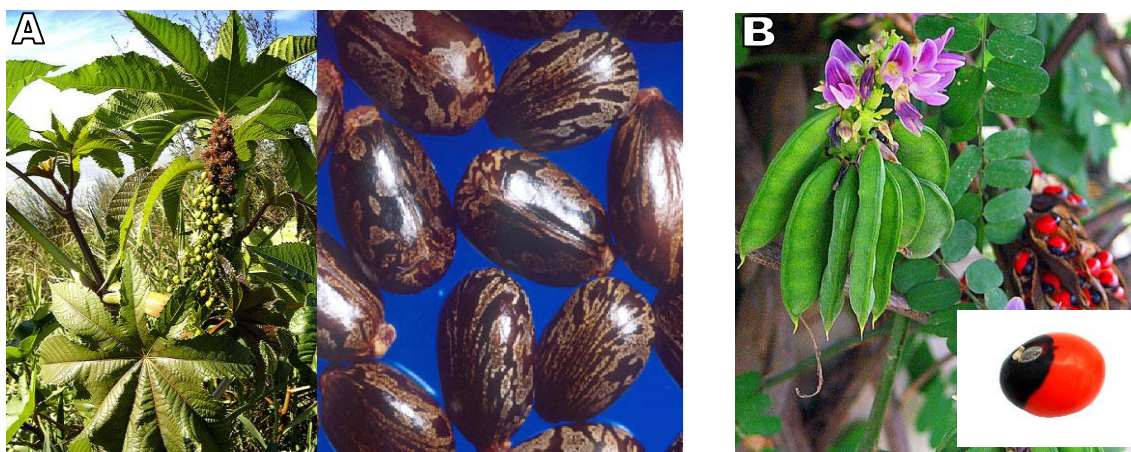


Figura 1.1 - Imagens das plantas *Ricinus comunis* e *Abrus precatorius*. A) Foto da planta de mamona (*Ricinus comunis*) e detalhe de suas sementes, da qual é extraída a proteína tóxica ricina. B) Detalhe da trepadeira Jequeriti, *Abrus precatorius*, mostrando os frutos, as flores e as sementes típicas (em detalhe) a partir das quais se extrai a proteína tóxica abrina. Imagens obtidas da referência (1).

Muito tempo se passou até que as moléculas responsáveis por tal toxicidade fossem descobertas. Stillmark, em 1888, na sua tese de doutorado descreveu e associou pela primeira vez o poder aglutinante e o poder tóxico das sementes da mamona a uma proteína purificada do extrato bruto de tais sementes, a qual ele denominou ricina. Concomitantemente, Helling também na sua tese de doutorado, obteve resultados semelhantes com o extrato proteico do Jequeriti, o que resultou na identificação da proteína abrina (2).

A descoberta destas toxinas foi determinante para os estudos imunológicos desenvolvidos por Paul Erlich em 1891. Valendo-se do saber popular da cultura indiana, Erlich demonstrou que a injeção subcutânea da ricina ou da abrina nos animais protegia-os da posterior intoxicação com as mesmas toxinas. Além disso, verificou que esta resposta protetora encontrava-se no soro dos animais e tinha caráter específico, o que hoje conhecemos como interação antígeno-anticorpo. Dele surge também a hipótese de que estas toxinas deveriam se fixar ao tecido antes de exercer a sua ação, “*Corpora non agunt nisi fixata*” e que as mesmas deviam ser constituídas por duas porções distintivas: uma porção ligante, “*haptophore*”, e outra tóxica, “*toxophore*”. Esta hipótese foi confirmada décadas depois com a caracterização estrutural da abrina e da ricina (2).

1.2 Proteínas inativadoras de ribossomos: atividade RNA N-glicosilase

Apesar destes relatos, foi só a partir de 1970 que estas toxinas voltaram a ganhar importância para a ciência. Isto foi devido, em parte, às observações preliminares de Lin e colaboradores (3, 4) que verificaram que estas proteínas, quando colocadas em contato com células, afetavam mais a síntese de RNA do que de DNA. Os trabalhos de Olsnes e Pihl (5-10), Montanaro e Sperti (9, 10) também foram de grande relevância, pois permitiram determinar o envolvimento direto da abrina e a ricina na inibição da síntese protéica. Na época, ainda determinaram que ambas as toxinas fossem constituídas por duas cadeias polipeptídicas que migravam diferencialmente em SDS-PAGE, sendo que denominaram a cadeia de migração mais rápida de A e a outra de B. Também foi possível confirmar que estas proteínas inibiam fortemente a síntese protéica em sistemas livre de células, sendo esta atividade incrementada na presença do agente redutor β -mercaptoetanol. A cadeia A era a responsável por tal atividade inibitória, a qual era dirigida à subunidade 60S do ribossomo (5, 6, 9-15). Finalmente, determinou-se que estas toxinas agiam interferindo na interação de fatores de alongação com os ribossomos (16).

A natureza precisa desta atividade inibitória foi descoberta em 1987, por Endo e colaboradores (17, 18). Estudando a ricina, estes autores demonstraram que a cadeia A possui atividade RNA N-glicosilase específica, isto é, tem a capacidade de modificar enzimaticamente o nucleosídeo localizado na posição 4324 (A^{4324}) do RNA ribossomal 28S de

rato, presente numa estrutura em forma de *loop*. Este resíduo é responsável pela ligação a fatores de alongação EF-1 e EF-2, envolvidos na ligação aos aminoacil-t-RNA e na catálise da hidrólise de GTP e translocação, respectivamente (Figura 1.2). Assim, a “depurinação” evita que estes fatores de alongação se liguem na subunidade ribossomal 60S e, conseqüentemente, levam à inibição da síntese protéica (19). Após a ricina ter a sua estrutura tridimensional resolvida (20), foi possível determinar os resíduos específicos envolvidos na reação de hidrólise.

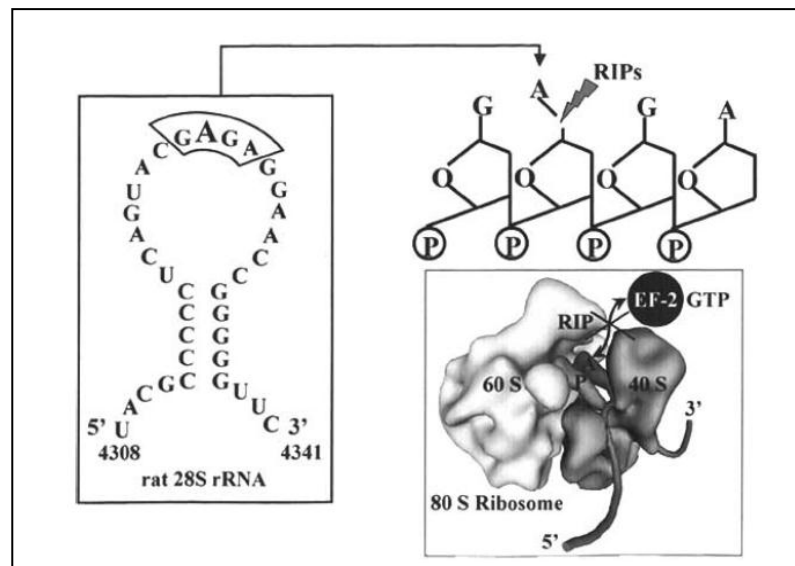


Figura 1.2 - Representação esquemática do sítio específico de ação das RIPs em ribossomos de ratos. As RIPs clivam uma adenina do rRNA da subunidade ribossomal maior, impedindo a ligação dos fatores de alongação (EF) 1 e 2. A ricina e outras RIPs são N-glicosilases que catalisam a quebra da ligação N-glicosídica que liga a A4324 à ribose da subunidade 28S rRNA em ribossomos de fígado de ratos. Figura extraída de Girbés et al., 2004 (21).

1.3 Classificação

Determinada a atividade enzimática destas toxinas, muitas outras proteínas com a mesma atividade foram sendo caracterizadas e, dada a grande heterogeneidade das mesmas, foi necessário estabelecer uma classificação. Assim, as RIPs são classificadas considerando as propriedades físicas e estruturais, mas há certa controvérsia na literatura, sendo possível encontrá-las mais comumente dividida em dois tipos (Figura 1.3), mas em razão de duas

proteínas encontradas em cereais, uma classificação em três tipos (Figura 1.4) (22) também pode ser utilizada.

As RIPs tipo 1 são constituídas por uma única cadeia polipeptídica, de caráter básico, com peso molecular aproximado de 30 kDa (21). Estas proteínas possuem atividade específica RNA *N*-glicosilase e, assim, são capazes de inibir a síntese protéica *in vitro*, mas apresentam baixa toxicidade para células e ou animais. Esta baixa toxicidade é determinada pela ausência da cadeia lectina, presente nas RIPs tipo 2.

Mesmo assim, as RIPs do tipo 1 podem ser tóxicas para alguns tipos celulares que apresentam uma sensibilidade maior a este tipo de proteínas, como macrófagos e trofoblastos. Entre os membros mais estudados e conhecidos de RIPs tipo 1 encontramos a saporina (23), extraída da planta *Saponaria officinalis*, a PAP (24), uma proteína com atividade antiviral de *Phytolacca americana* e a trichosanthina (25), α -TCS, proteína com atividade anti-HIV extraída da planta *Trichosanthes kirilowii* e muito utilizada na China como abortífero (2).

Ng e colaboradores (26) em uma revisão recente, catalogou novos membros de RIPs tipo 1, mas de baixo peso molecular (7-11 kDa aproximadamente), isolados principalmente de plantas pertencentes à família Cucurbitacea. Alguns membros, como a luffina S e a γ -momocharina não têm nenhuma sequência ainda descrita. Também classificados como RIPs de baixo peso molecular estão os isolados de fungos, por exemplo, a calcaelina (extraída de *Calvatia caelata*), a flamulina e vetulina (ambas de *Flammulina velutipes*), entre outras (26).

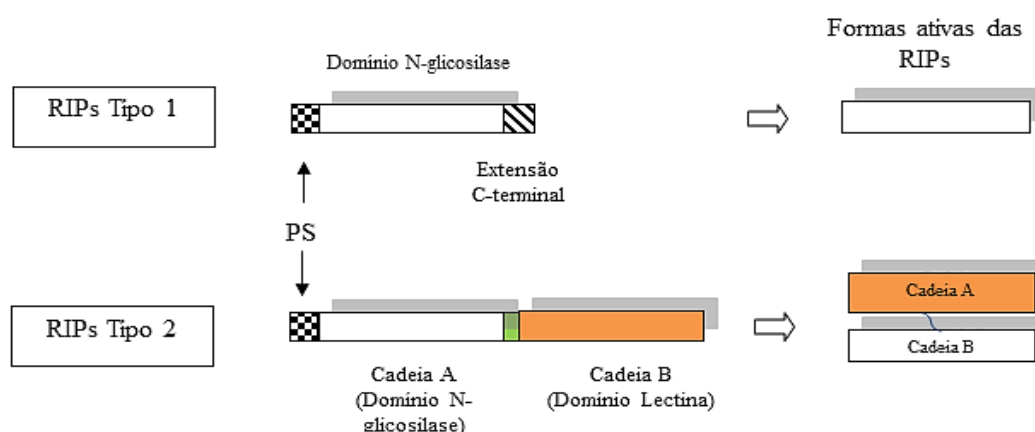


Figura 1.3 - Representação esquemática da organização molecular das RIPs tipo 1 e 2. As proteínas de ambos os tipos contém uma sequência N-terminal ou peptídeo sinal (PS) de 25 resíduos que é eliminado durante o processamento pós-traducional. Adicionalmente, as RIPs tipo 2 possuem uma sequência de 12 resíduos chamada de “linker” (destacado em verde), também eliminado pós-traducionalmente para a formação de um heterodímero covalentemente ligado entre as cadeias A e B. A cadeia B com o domínio tipo lectina é mostrada em laranja

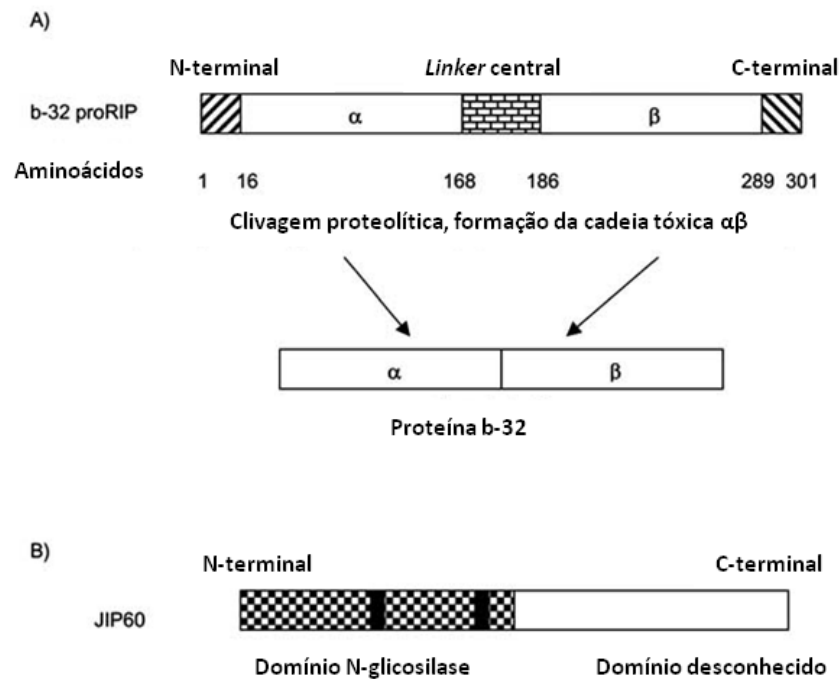


Figura 1.4 - Representação esquemática da estrutura molecular das RIPs tipo 3: a b-32 de milho e a JIP60 de cevada. A) Forma imatura (pro-RIP) da b-32 mostrando os fragmentos proteoliticamente clivados para a formação da toxina ativa. B) A JIP60 com seus dois domínios distintos, o domínio *N*-glicosilase e outro de função desconhecida. Em preto destacam-se dois fragmentos provavelmente removidos durante a maturação da toxina. (Esquema extraído de Motto et al 2004 (27))

São consideradas RIPs tipo 2 aquelas proteínas estrutural e sequencialmente semelhantes a ricina e a abrina. Elas são formadas por duas cadeias polipeptídicas (cadeias A e B), com massas moleculares semelhantes de aproximadamente 30 kDa cada (variando de 60 a 65 kDa a holotoxina), mas com características funcionais e estruturais díspares. A cadeia A (ou tóxica) contém o domínio rRNA *N*-glicosilase, assim como as RIPs tipo 1, mas diferencia-se destas pelo fato de encontrar-se covalentemente ligada (via ligação dissulfeto) a uma lectina (ou cadeia B) (28). A cadeia B tem a capacidade de se ligar a moléculas contendo D-galactose, na maioria dos casos. Portanto, as glicoproteínas ou glicolipídios da superfície de células eucarióticas, que contém este resíduo são alvos deste tipo de proteínas (29).

Assim, a alta toxicidade verificada para a maioria das RIPs tipo 2 está relacionada à presença da cadeia B, a qual facilita a entrada da cadeia A para o interior da célula (30). Uma vez no citosol, a cadeia A encontra o seu substrato (ribossomos), catalisa a depurinação no

sítio específico e, conseqüentemente, interrompe a síntese protéica levando a célula à morte. Dentro das RIPs tipo 2 há um menor número de representantes e, além das já mencionadas altamente tóxicas ricina e abrina, encontramos a viscumina, a volkensina (31), modicina (32) e a cinnamomina (33). Dentre as recentemente isoladas destacam-se a PMR1Pm e a IRA, únicos representantes em monocotiledôneas (34, 35) e a pulchellina (36), uma das proteínas estudadas no presente trabalho. Ainda dentro das RIPs tipo 2, existem algumas exceções em termos de toxicidade, sendo estas chamadas de RIPs tipo 2 não-tóxicas, como as nigrinas e ebulinas, isoladas de *Sambucus nigris*. Estas não apresentam toxicidade ou a toxicidade é muito baixa para células ou animais, apesar de terem a sua atividade *N*-glicosilase *in vitro* caracterizada como semelhante a da ricina (37, 38).

A classificação do grupo de RIPs tipo 3, ainda sob discussão, deve-se à identificação de duas RIPs atípicas, isoladas de gramíneas (Família Poacea): a RIP b-32, isolada das sementes de milho, e a JIP60, de cevada. A RIP b-32 é sintetizada como pro-enzima, na qual o domínio rRNA *N*-glicosilase só é formado após proteólise para eliminação de um peptídeo interno de 25 resíduos. A JIP60, é uma quimerotoxina formada por uma cadeia tóxica semelhante as do tipo 1, mas ligada não covalentemente a uma segunda cadeia polipeptídica de função desconhecida (39, 40). A proteólise parcial converte a proteína de um único polipeptídeo com as duas subunidades associadas, ambas necessárias para a atividade RIP (Figura 1.4).

1.4 Distribuição e evolução das RIPs

Apesar das RIPs serem consideradas amplamente distribuídas, presentes em praticamente todos os reinos, estas proteínas são predominantemente encontradas em plantas e muito do que se sabe hoje sobre esta família surgiu do estudo das RIPs de origem vegetal. Muitos dos esforços para identificar novas RIPs têm sido direcionados à busca por aquelas RIPs tipo 1 (de cadeia única). Em termos de localização na planta, a maioria das RIPs identificadas foram isoladas de alguns poucos tecidos, principalmente de sementes e em menor proporção de folhas e raízes, em concentrações variáveis (26). Interessantemente, várias espécies de plantas comestíveis apresentam RIPs tipo 1, como é o caso do espinafre, tomate e várias espécies de cucurbitáceas, como o melão (21), mas estas não representam

risco para o ser humano, considerando que são pouco citotóxicas. Um caso interessante é o da aralina, uma RIP tipo 2 considerada tóxica. A aralina é extraída da *Aralia elata*, espécie cujas raízes são comestíveis, mas que aparentemente não representaria risco devido a cozimento do alimento, associado também à baixa concentração desta toxina na planta (41). Esta observação sugere que outras RIPs tipo 2 tóxicas podem estar presentes em outras espécies, mas ainda não foram estudadas por serem consideradas não-tóxicas.

Considerando as plantas com flores, as RIPs foram identificadas em várias espécies distribuídas majoritariamente dentro de poucas famílias como Cucurbitaceae, Euphorbiaceae, Phytolacaceae e Poaceae. Destas, as RIPs tipo 1 constituem o maior número de representantes. Esta distribuição, aparentemente concentrada, dentro do Reino Vegetal poderia ser consequência das buscas por novos integrantes serem dirigidas às famílias nas quais já foram identificadas RIPs e/ou que contenham grandes quantidades de toxinas nos seus tecidos. Por outro lado, a baixa atividade tóxica encontrada nos extratos brutos de algumas espécies analisadas pode ter contribuído para passarem despercebidas.

Embora os aspectos gerais sobre a evolução molecular das RIPs vegetais tenham sido amplamente estudados (29, 42), questões importantes ainda estão a serem respondidas, especialmente no que se refere: a origem do domínio RIP, às relações entre as cadeias A das RIPs tipo 1 e 2, assim como o surgimento das RIPs tipo 3 e sua relação evolutiva com as demais RIPs. Um dos principais problemas para abordar este assunto tem sido o limitado número de seqüências disponíveis destas proteínas e a distribuição taxonômica fragmentada que esta classe de proteínas apresenta nas plantas (43).

Finalmente, a identificação de RIPs tipo 2 em famílias vegetais não relacionadas do ponto de vista evolutivo indica que estas proteínas não se encontram apenas confinadas a um pequeno grupo taxonômico (34). Informações adicionais sobre as RIPs tipo 2, como o isolamento e caracterização seriam de interesse e de grande valor para determinar a real distribuição na natureza desta classe de proteínas (21, 26).

1.5 Transporte Retrógrado das RIPs tipo 2 e interação com membranas.

Como já mencionado, o alvo/substrato principal de todas as RIPs é o RNA ribossomal eucarioto, embora existam outros substratos/atividades possíveis ainda sob estudo (44).

Portanto, para exercer a sua função, essas toxinas devem ter acesso ao citosol para atingir seu substrato (45). Calcula-se que aproximadamente 5 % da quantidade total de ricina que entra numa célula poderá alcançar o compartimento subcelular que permitirá sua translocação para o citosol (46). Algumas dessas moléculas (cadeia A somente) ficarão resistentes à degradação proteossomal por meio do seu renovelamento, viabilizado pela sua interação com o ribossomo, e tornando-se cataliticamente ativas e capazes de depurar a subunidade ribossomal 28S (47). Desta forma, o ribossomo exerce o papel de molécula chaperona, consequentemente agindo de maneira suicida. Uma única molécula de ricina que atinja o citosol será capaz de inativar 1500 ribossomos/minuto e, assim, matar a célula (48).

As RIPs tipo 2, por possuírem o domínio lectínico capaz de se ligar aos receptores glicosilados da superfície celular, podem ser internalizadas pelas células. Devido a isto, as proteínas deste tipo são consideradas mais citotóxicas que RIPs de outros tipos, como já comentado. O modelo de intoxicação das células de mamíferos pelas RIPs tipo 2 (Figura 1.5) é produto de extensos estudos, feitos principalmente com a ricina (49, 50).

De modo geral, a toxina alcança o seu alvo citoplasmático pela sua ligação promíscua da holotoxina a receptores (ainda desconhecidos) na superfície celular a ser intoxicada, seguida da posterior internalização da toxina, por meio da formação de endossomos. Estes, por transporte retrógrado vesicular, alcançam o complexo de Golgi e de lá a holotoxina atinge o retículo endoplasmático (RE). Uma vez no lúmen desta organela, as cadeias A e B da toxina são separadas (pela ação redutora da enzima dissulfeto isomerase, PDI). Há evidências que, neste estágio, a cadeia A interaja como a maquinaria protéica do lúmen do RE, encarregada de reconhecer proteínas mal enoveladas. A cadeia A parece se reconhecer como uma proteína instável ou mal enovelada, sendo exportada (retrotranslocada) para o citosol para a sua posterior degradação, via ubiquitinação (51). A translocação reversa de proteínas mal e não enoveladas para do RE para o citosol é normalmente associada a sua ubiquitinação e degradação proteossomal (52). O primeiro passo da degradação mediada pelo proteossomo envolve a poliubiquitinação das lisinas nas proteínas alvos (53). Entretanto, as cadeias A das toxinas que são translocadas do RE possuem um conteúdo relativamente baixo de lisinas, o que explicaria o fato de essas toxinas escaparem da ubiquitinação (54). Por exemplo, as cadeias A da toxina *Shiga-like* e da ricina contém somente 2 resíduos de lisina, e a cadeia A da abrina contém 3. Em contraste, as cadeias A das RIPs tipo 2 não tóxicas, como a nigrina e ebulina, contém uma média de 7,4 resíduos, enquanto que as RIP tipo 1 possuem em média 18,6 resíduos de lisina (55). Uma vez no citosol, a cadeia A das toxinas exercerá uma

atividade inibitória nos ribossomos, desencadeando os processos que levam a morte celular programada ou apoptose.

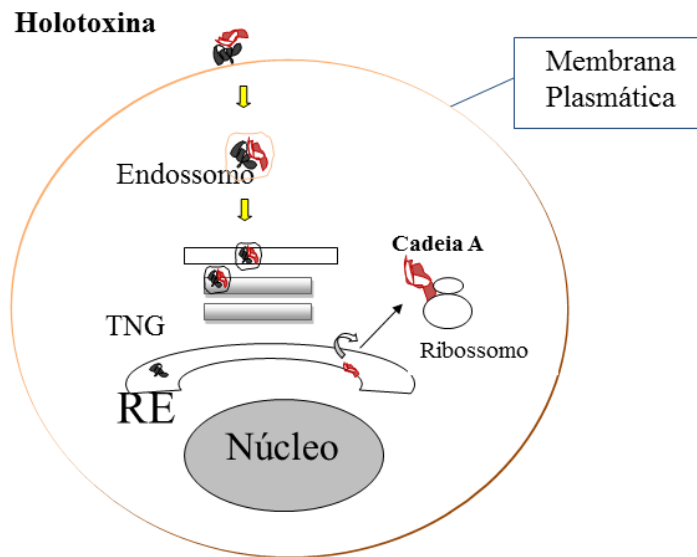


Figura 1.5 - Esquema do modelo de internalização e tráfego da ricina (holotoxina) em células eucariotas (49). Detalhes do processo estão descritos ao longo do texto. A holotoxina está representada com cores vermelha (cadeia A) e cinza chumbo (cadeia B). Ambas são separadas no lúmen do RE e logo após a cadeia A é translocada para o citoplasma, onde age sobre os ribossomos.

Muitos detalhes do modelo de internalização e transporte retrógrado, principalmente da ricina, são bem conhecidos e podem ser extrapolados para outras RIPs tipo 2, porém outros ainda permanecem sem ser completamente esclarecidos. Por exemplo, o fato da cadeia A ter que se deslocar de um compartimento celular como o lúmen do RE para o citoplasma implica necessariamente que a toxina atravesse uma barreira física que é a membrana do próprio RE. Para a RTA (cadeia A da ricina) tem sido demonstrada a interação com a maquinaria de translocação do RE, o complexo Sec61 α (56) de leveduras, mas ainda resta comprovar que o mesmo acontece em células de mamíferos.

Na região C-terminal da RTA existe uma sequência de aminoácidos hidrofóbicos que possam estar envolvidos na interação da toxina com a membrana do RE durante o processo de translocação para o citosol (57). Acredita-se que esta sequência de aminoácidos seja exposta logo que ocorre a separação das cadeias A e B da holotoxina, no lúmen do RE. Alguns aminoácidos desta região têm se mostrado importantes para o processo, pois quando são mutados em RTA esta tem a sua translocação diminuída para o citosol, embora ainda mantenha sua atividade de depuração *in vitro*. Quando esta sequência de aminoácidos foi

incorporada à região N-terminal da proteína DFHR, Diidrofolato redutase, (Figura 1.6) foi possível evidenciar *in vitro* que esta quimera localizava-se no lúmen de microsomos, indicando que esta sequência agiu como um peptídeo sinalizador, direcionando a proteína para o lúmen, como acontece com proteínas que são secretadas via RE (58).

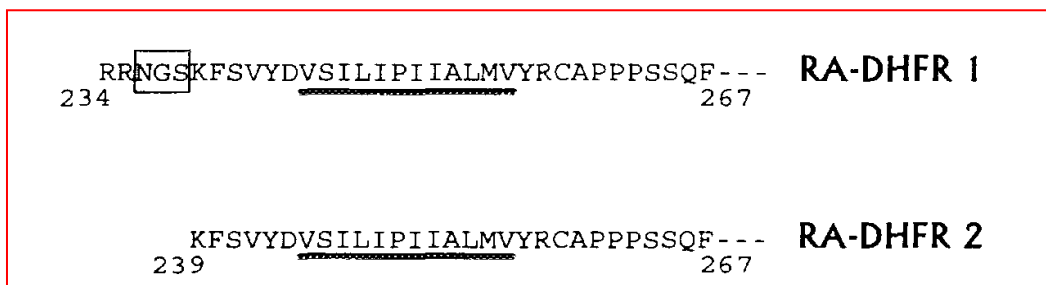


Figura 1.6 - Sequência de resíduos da região C-terminal da RTA envolvidos no direcionamento da proteína ao RE. Duas quimeras foram construídas: a RA-DHFR1 que contém o peptídeo mais longo da RTA (resíduos 234-267) na sua extremidade N-terminal; e a outra construção possui um fragmento menor (resíduos 239-267) também na extremidade N-terminal. Os resíduos hidrofóbicos estão sublinhados. Extraído de Chaddock *et al*, (58).

Outros experimentos foram realizados com a RTA visando entender o mecanismo de interação com a membrana lipídica durante o processo de retrotranslocação citosol. Com a utilização de vesículas compostas de fosfolipídios carregados negativamente (PG) foi demonstrado que a RTA interage fortemente com estas e que esta interação promove mudanças estruturais na proteína. Com base nestes resultados, especula-se que a região C-terminal possa ser a responsável por tal interação. Além disso, foi sugerido que a proteína antes de ser translocada sofreria um desenovelamento parcial mediado pela interação com a membrana do RE (55).

1.6 Aplicações das RIPs

As propriedades descritas para as RIPs tem despertado o interesse para pesquisas visando seu uso como ferramenta biotecnológica, aplicada nas áreas médica e agrícola. Existem vários exemplos de RIPs do tipo I com atividade antiviral sendo investigadas para seu possível uso como antivirais tanto em plantas, como em animais e humanos. Na

agricultura, plantas modelo como tabaco ou *Arabidopsis thaliana*, quando transfectadas com os genes de RIPs, têm desenvolvido resistência perante conhecidos fitopatógenos (22). Em medicina, estudos *in vitro* demonstraram que tanto a TCS (59) como a PAP (60, 61) inibem a replicação do vírus HIV, embora não tenham sido capazes de inibir a proliferação do vírus em pacientes portadores da doença (62). Mais recentemente, estas proteínas vem sendo usadas em conjugados com diversas moléculas como lectinas, hormônios, fatores de crescimento e, mais frequentemente, com anticorpos, tornando-se assim possível seu direcionamento específico para as células alvo. Os conjugados mais utilizados foram inicialmente feitos pela ligação covalente do tipo tiolester entre um anticorpo e a cadeia A das RIPs tipo 2, como por exemplo a ricina e abrina, com a prévia separação das respectivas cadeias B por redução (63, 64).

A tecnologia do DNA recombinante tem permitido clonar e purificar as cadeias A de diversas RIPs e desenvolver assim imunotoxinas de maneira mais rápida. As primeiras RIPs clonadas produzidas em *E.coli* e utilizadas nestes experimentos foram a RTA(65) e a Abrina (66). Mais tarde, várias outras também foram expressas de forma heteróloga em bactérias, dentre elas a saporina (67), PAP (68), diantina (69), gelonina (70), a briodina (71), inclusive a pulchellina (72). Uma revisão recente e extensa sobre o assunto pode ser encontrada em (73).

1.7 Funções das RIPs no organismo de origem

A persistência e distribuição destas proteínas ao longo da evolução sugerem que tenham uma função importante no organismo que as produz. Este assunto ainda pouco estudado tem trazido a luz várias hipóteses, como a que estas proteínas sejam utilizadas como fonte protéica de reserva, no caso das sementes vegetais, ou que atuem na defesa do organismo frente a predadores ou parasitas e também contra infecções causadas por fungos, bactérias e até vírus. Há também outras possíveis funções que atribuem às RIPs um papel mais fisiológico, justificada por exemplo, no aumento de sua expressão naquelas plantas e ou tecidos vegetais que sofrem com estresse ambiental, como a desidratação prolongada, ou mesmo durante a senescência, o que as envolveria direta ou indiretamente com processo de apoptose celular (73).

1.8 A Pulchellina

A pulchellina, junto com a abrina, são os únicos membros descritos das RIPs dentre a extensa família das leguminosas, sendo encontrada nas sementes da espécie *Abrus pulchellus tenuiflorus* (Figura 1.7). Assim como suas homólogas do tipo 2, abrina e ricina, a pulchellina é constituída por um heterodímero formado pela cadeia A (ou PAC) e a cadeia B (ou PBC) de 29 e 31,5 kDa, respectivamente (72, 74). A composição de aminoácidos da pulchellina mostra-se rica em aminoácidos com cadeia lateral ácida (72), além de também possuir certa quantidade de aminoácidos sulfurados, como é o caso abrina (75). Do extrato bruto das sementes de *A. pulchellus* foi possível identificar várias isoformas da pulchellina, das quais quatro foram isoladas utilizando uma combinação de técnicas como a cromatografia de afinidade, de troca iônica e cromatofocalização, permitindo estudos bioquímicos e estruturais em nosso laboratório (76). Estudos das sequências de cDNA e DNA genômico extraídos da planta permitiram confirmar que as quatro isoformas são sintetizadas como precursores inativos, contendo uma sequência N-terminal e a sequência “*linker*”, que precede à cadeia B (Figura 7) e sem a presença de introns.



Figura 1.7 – Fruto de *Abrus pulchellus tenuiflorus*. Detalhes do fruto maduro tipo legume fechado (esquerda) e aberto mostrando as sementes (à direita). As fotos não refletem o tamanho real. (figura adaptada de Araújo *et al.* (77)).

Para todas as isoformas também foi possível determinar a existência da sequência N-terminal (pré-sequência) de 34 resíduos que precede as cadeias-A e a região entre as cadeias-A e B chamada de “*linker*”, a qual é removida proteoliticamente durante a maturação da

proteína. Dentro da pré-sequência, há uma região predita como um peptídeo sinal, que remete ao retículo endoplasmático, e o restante deve ter papel similar ao propeptídeo encontrado na preproricina, agindo como um espaçador não específico para garantir a importação eficiente para o retículo endoplasmático e glicosilação (78). As sequências da região *linker* também são extremamente similares entre as isoformas e, pela alta identidade à proricina, provavelmente contenham uma sequência sinal que as direcione para o vacúolo (79).

1.9 Atividade N-glicosilase e Citotoxicidade

O fato dos resíduos que formam os sítios ativos serem conservados e retidos na mesma posição para as quatro isoformas sugeriu que a atividade catalítica seria conservada entre elas. A atividade específica RNA-*N*-glicosilase frente a ribossomos de levedura foi testada e foi demonstrado que as quatro isoformas apresentam a mesma atividade depurinadora, não havendo diferenças significativas entre elas (36).

Porém, com relação à citotoxicidade, os valores de IC₅₀ encontrados mostram que as isoformas P I e P II possuem toxicidades similares [21,7 ng/mL (0,375 nM) e 22,7 ng/mL (0,391 nM), respectivamente], enquanto que P III e P IV são aproximadamente 5 vezes menos tóxicas para a linhagem celular testada. Apesar dos resultados encontrados contribuir para a classificação dessas proteínas como altamente tóxicas, a toxicidade delas para células HeLa é inferior aos valores encontrados para ricina (IC₅₀= 0,001 nM) e abrina (IC₅₀= 0,0037 nM) (80).

1.10 Estrutura Cristalográfica da Pulchellina

A estrutura tridimensional da pulchellina (Figura 1.8) foi recentemente resolvida por Castilho *et al*, (81), sendo possível confirmar que a conformação tridimensional da holotoxina e de suas cadeias constituintes seguem o padrão geral de outras RIPs já descritas, como a ricina, a abrina e *mistletoe*.

A cadeia-A consiste de três domínios enovelados, estando o sítio ativo na interface dos três. O domínio N-terminal consiste principalmente de uma folha- β composta por seis fitas e duas hélices- α . O domínio central possui cinco hélices, constituindo a porção mais conservada

dentro das cadeias A das RIPs (82). O domínio C-terminal possui duas hélices- α , duas folhas- β antiparalelas e um *coil* desestruturado, no qual encontram-se os resíduos de cisteína, responsável pela ligação covalente com a cadeia B.

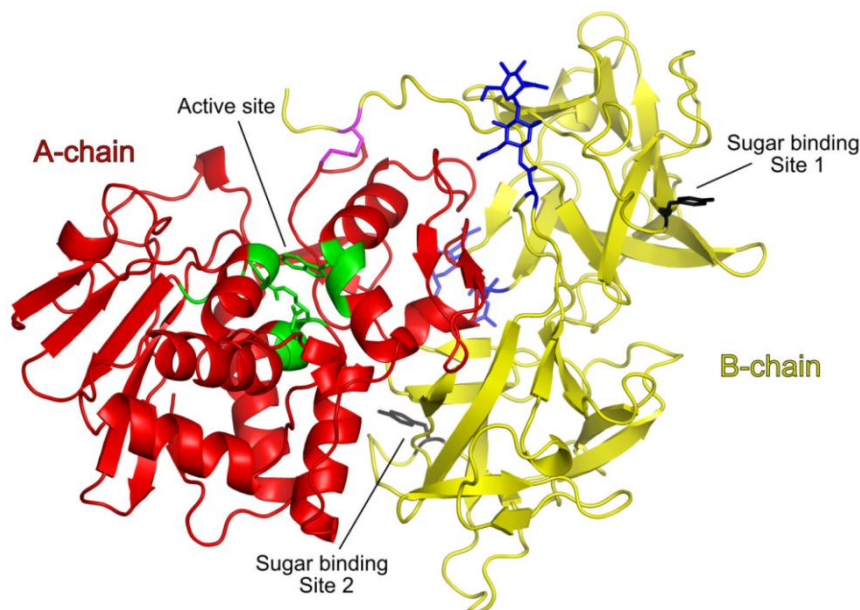


Figura 1.8 - Estrutura tridimensional da pulchellina (isoforma P II). Representação da holotoxina conformada pelas cadeia-A (vermelho) e cadeia-B (amarelo). A região do sítio ativo está destacada em verde e os dois resíduos aromáticos conservados, em preto. As duas glicosilações encontradas na cadeia-B estão destacadas em azul e a ligação dissulfeto conectando ambas as cadeias aparece em magenta (77).

A estrutura da cadeia B é altamente conservada na família das RIPs tipo 2 (82), formada por dois domínios homólogos, cada um subdividido em quatro sub-domínios chamados de λ , α , β e γ com o enovelamento tipo β -*trefoil* (83). As estruturas cristalográficas confirmaram a presença de duas glicosilações (Asn395 e Asn435), bem como os sítios de ligação a carboidratos presentes nos subdomínios 1α e 2γ (81).

A interação das isoformas da pulchellina com membranas através de glicoconjugados é um ponto crucial para a entrada da toxina da célula (84), porém ainda sabemos pouco a respeito disso. Assim, esta tem sido uma das frentes de trabalho sob investigação em nosso grupo, pois acreditamos que esclarecer os mecanismos de interação das proteínas com a membrana celular seja a chave para entender as diferenças de toxicidade das isoformas (36). Outro aspecto interessante envolvendo interação proteína-membrana, o qual foi abordado neste trabalho, refere-se a um segundo momento da interação da pulchellina com a membrana. Sabe-se que durante o transporte retrógrado, a holotoxina (cadeia-A + cadeia-B) deve ser reduzida, permitindo que a cadeia-A seja translocada do RE para o citosol onde atingirá seu

alvo. Como já comentado, estudos prévios com RTA *in vitro* usando modelos de biomembranas sugerem que a cadeia A interaja previamente com a membrana do retículo endoplasmático antes de sua retrotranslocação. Assim, parte da proposta desta tese (detalhada no Capítulo 3) foi centrada na avaliação da interação de cadeias-A mutantes de pulchellina (formas truncadas na sua porção C-terminal), usando modelos de biomembranas para determinar a contribuição desta região para tal interação.

CAPÍTULO 2 IDENTIFICAÇÃO DE NOVAS RIPS

CAPÍTULO 2 IDENTIFICAÇÃO DE NOVAS RIPS EM MONOCOTILEDÔNEAS

2.1 Identificação *in silico* de genes que codificam rips em cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* sp) e outras monocotiledôneas

Considerando apenas o Reino Vegetal e de acordo com os dados publicados em trabalhos prévios e revisões sobre as RIPS, estas proteínas estão confinadas às plantas com flores (Magnoliófitas) (42). As RIPS tipo 2 têm sido isoladas e purificadas apenas a partir de um grupo reduzido de plantas e somente duas delas figuram entre as monocotiledôneas.

Assim, a proposta inicial deste trabalho consistiu na busca de novas sequências codificantes de RIPS, ainda não caracterizadas, mas disponíveis em banco de dados genéticos públicos como o NCBI (*National Center of Biotechnology Information*). Inicialmente essa busca esteve restrita ao banco de dados de EST (*Expressed Sequence Tags*) de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), mas no decorrer do projeto novos transcriptomas foram disponibilizados possibilitando a busca e a análise de outras RIPS. Neste contexto, este capítulo traz os objetivos, metodologia, resultados, discussão e conclusões referentes à primeira parte desta tese, a qual tratou da busca e identificação de genes codificando putativas RIPS em espécies de plantas ainda não analisadas, bem como a caracterização funcional e estrutural de um dos genes identificados, correspondente a uma RIP tipo 2 de cana-de-açúcar.

2.2 OBJETIVOS

Neste capítulo, o objetivo esteve centrado na busca e identificação *in silico* de genes codificando potenciais novas RIPS em monocotiledôneas, particularmente, nas espécies *Saccharum officinarum*, *Sorghum bicolor* e *Zea mays*.

Com o intuito de validar os resultados da identificação de novas RIPS, a expressão em sistema heterólogo e caracterização do produto recombinante de um dos genes identificados (*sorip*) em relação à sua atividade catalítica também foram considerados.

2.3 MATERIAIS

Os reagentes químicos utilizados, tais como azul de bromofenol, DMSO (dimetil sulfóxido), Tris-HCl, CaCl₂, β-mercaptoetanol, NaCl, KCl, IPTG (isopropil-β-tiogalactopiranosídeo), SDS (dodecil sulfato de sódio), N,N'-metileno bis-acrilamida, MgCl₂, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, sulfato de amônio, EDTA, imidazol, ácido acético glacial, ácido clorídrico, acetato de sódio, etanol, metanol, TEMED, persulfato de amônio, *Comassie Brilliant Blue R-250*, e agarose foram de grau de pureza analítico e adquiridos da *Sigma-Aldrich Chemical*. O meio de cultura LB foi também obtido da Sigma. Os antibióticos ampicilina e canamicina foram obtidos da Fluka e Gibco BRL, respectivamente. O reagente 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galctopiranosídeo (X-Gal) foi comprado da Gibco BRL (Sigma). Os marcadores moleculares para DNA e proteínas foram adquiridos da Promega. DEPC e Dimetilpirocabonato foram adquiridos da Sigma.

Os reagentes para PCR e a polimerase *Taq High Fidelity* foram obtidos da Fermentas. Os oligonucleotídeos específicos (iniciadores ou *primers*) foram sintetizados pela IDT (*Integrated DNA Technologies* - <http://www.idtdna.com>). As enzimas restrição, T4 DNA ligase e seus respectivos tampões foram adquiridos da Fermentas e Promega respectivamente.

O vetor de clonagem pTZ57R/T foi obtido da Fermentas (<http://www.fermentas.com>) e o pCR2.1, da Invitrogen (<http://www.invitrogen.com>). O vetor de expressão pET28a foi adquirido da Novagen (<http://www.emdbiosciences.com/html/NVG/home.html>). As linhagens de *Escherichia coli* utilizadas nos experimentos de clonagem e expressão foram DH5α e Rosetta (DE3) ou BL21 (DE3), obtidas da Promega e Novagen, respectivamente. Os *kits Wizard Genomic DNA*, *Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System* e *Wizard[®] Plus SV Miniprep DNA Purification Systems* utilizados neste trabalho foram adquiridos da Promega. A resina de afinidade por metal Ni-NTA foi adquirida da *Qiagen* e a coluna Superdex 75 HR foi da GE. O kit TNT[®] *Coupled Reticulocyte Lysate Systems* foi adquirido da Promega. O Trizol foi adquirido da Invitrogen, a ureia de Synth. As membranas de diálise foram da *Bioagency Spectrum Laboratory*. Os aparelhos utilizados durante este trabalho foram: Sistema fotodocumentador de géis *Biorad Universal Hood II*, Agitador orbital refrigerado *Scientific e Minitron HT*. Microcentrífugas e centrífugas Eppendorf, modelos 5804R e 5415R/D. Espectrofotômetro Hitachi U2800 e *Nanodrop 1000 Thermoscientific*. Sistema de purificação de proteínas *Akta purifier* GE (Amersham Bioscience). Dispositivo para concentrar proteínas

Centricon Millipore. Sonicador *Fisher Scientific* modelo 500. Ultracentrífuga Sorvall RC 5C plus. Cubas para eletroforese vertical e horizontal *Life Technology*. Transiluminador *Bioagency* e termociclador *Eppendorf Mastercycler Gradient*.

2.4 MÉTODOS

2.4.1 Busca e identificação de genes similares a RIPs em bancos de dados de genes

Nas últimas décadas, as pesquisas nas áreas da genômica e transcriptômica têm ajudado a compreender melhor a constituição gênica dos organismos e também a identificar novos genes, ou famílias de genes, e seus respectivos produtos protéicos, por exemplo pela análise *in silico* nos diversos bancos de dados. Um dos focos de pesquisa na área genômica tem se voltado a identificar genes responsáveis pela defesa frente a diversos patógenos. Estudos neste sentido têm demonstrado que as plantas possuem uma vasta quantidade destes genes, mais até que os animais, principalmente devido à poliploidia ou duplicação gênica em larga escala (85).

Considerando a publicação do transcriptoma da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) e mais recentemente do sorgo (*Sorghum bicolor*), assim como o sequenciamento do genoma do milho (*Zea mays*) e bambu (*Phyllostachys edulis*), e a necessidade de compreender melhor a distribuição das RIPs na natureza, realizou-se uma busca *in silico* por novos representantes da família das RIPs nestas espécies. Esta busca foi realizada nos bancos de dados disponíveis no NCBI (*National Center of Biotechnological Information*, www.ncbi.nlm.nih.gov) com a ajuda da ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). Este programa compara sequências de nucleotídeos ou proteínas de um determinado banco de dados, calculando a significância estatística dos “matches” (86). Para a identificação de novos representantes RIPs, as buscas foram realizadas utilizando as sequências protéicas da ricina e da pulchellina (ambas RIPs tipo 2) como “query”. No início deste projeto apenas o transcriptoma da cana-de-açúcar encontrava-se completamente disponível. Desta forma realizou-se a procura por genes candidatos nesta espécie primeiramente. O programa utilizado

foi o *tblastn* (utilizando a matriz BLOSUM62 e os algoritmos predefinidos pelo programa) e a base de dados EST (*Expressed sequence tags*) da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* sp) disponível no Genbank (no NCBI).

2.4.2 Clones de ESTs da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* sp. var SP80-3280)

Com os resultados obtidos no item anterior, diferentes clones contendo ESTs da cana-de-açúcar codificando possíveis RIPs foram selecionados e adquiridos para serem analisados em nosso laboratório. Estes clones foram obtidos do projeto SUCEST (87) e se encontram sumarizados na tabela 2.1 a seguir:

Tabela 2.1 - Clones de ESTs obtidos do projeto SUCEST para *Saccharum officinarum* (variedade SP80-3280) *Os clones adquiridos encontravam-se clonados no vetor pSPORT1 (Invitrogen) como as enzimas *Sal I* e *Not I* (87)

Nome do EST (cDNA)*	Numero de Acesso no GeneBank	Tecido da planta ao qual pertence o EST
SCQGST3126C11.g	CA183457	Quarto internó apical de plantas adultas
SCRLAM1008C11.g	CA078531	Meristema apical e tecidos vizinhos de plantas adultas
SCJLFL3015D09.g	CA227942	Base de desenvolvimento da inflorescência (5 cm de comprimento)
SCBGAM1090G09.g	CA071793	Meristema apical e tecidos vizinhos de plantas maduras
SCJLAM1061F03.g	CA075561	Meristema apical e tecidos vizinhos de plantas maduras
SCEQAM1037H09.g	CA073774	Meristema apical e tecidos vizinhos de plantas maduras

2.4.3 Sequenciamento dos clones de ESTs

Uma vez adquiridos, os clones descritos na tabela 2.4.2 foram resequenciados, inicialmente utilizando os oligonucleotídeos (*primers*) *Forward* e *Reverse* (T7 promoter e SP6, respectivamente) específicos para o vetor pSPORT1 (os quais anelam-se às regiões que flanqueiam a sequência de cDNA clonada). Posteriormente, os mesmos clones foram sequenciados com *primers* específicos para a sequência do gene de interesse (tabela 2.2), de forma que permitisse a cobertura completa da sua sequência. O sequenciamento foi realizado pelo método didesoxinucleotídeo marcado (88) usando um sequenciador de DNA automático *ABI Prism 377* (Perkin Elmer) seguindo o protocolo e condições recomendadas pelo fabricante.

Tabela 2.2 - Primers utilizados para análise e seqüenciamento dos clones adquiridos do projeto SUCEST e ampliações posteriores da ORF completa para o gene *sorip*. (*) A numeração entre parênteses indica a posição em que os *primers* hibridizam considerando a ORF completa.

Nome	Sequência (*)	Uso
<i>T7 promoter</i>	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'	Confirmação da presença da EST no clone (vetor pSPORT1)
<i>SP6</i>	5'-ATTTAGGTGACACTATA G-3'	Confirmação da presença da EST no clone (vetor pSPORT1)
<i>SoripA F'</i>	5'- <u>cagcatatg</u> AACGTCGATGCAGCGGCAGCAGCT (103-126)	Amplificação da região codificante da cadeia A madura (sem peptídeo sinal)
<i>SoripAR'</i>	5'- <u>cgtcgagtta</u> CGCTTCCTCCC-3'(905-915)	Amplificação da região codificante da cadeia A
<i>SoripORF F</i>	5'ATGAAAGGAGGGACGCAACCAATCATCCTG 3' (1-30)	Isolamento e caracterização da ORF completa
<i>SoripORF R</i>	5'-AAGGA(TCACAGCATGAGCGCCCACTTCTGG)-3' (1803-1827)	Isolamento e caracterização da ORF completa.
<i>SoripLinker F</i>	5'-TTGCTCATAAGGTCCGTC-3'(935-951)	<i>Primer</i> interno para sequenciamento da ORF

2.4.4 Análise de restrição dos clones ESTs obtidos

Complementar ao sequenciamento dos clones de ESTs da cana-de-açúcar, foi realizada a análise de restrição dos mesmos, a fim de se determinar o tamanho (em pares de bases) aproximado dos cDNAs clonados no vetor. Para isto foram utilizadas duas enzimas, *EcoRI* e *Not I* (Fermentas), as quais cortam o vetor pSORT1 em posições que flanqueiam o cDNA clonado, sendo a segunda das enzimas a mesma utilizada pelo projeto SUCEST (87) para clonar os diferentes ESTs. Tipicamente 100 ng de DNA de cada clone (previamente propagado em bactérias) foram misturados em tubo de 1,5 ml com aproximadamente 2U de cada enzima de restrição em presença de tampão TANGO 1X em um volume final de reação de 20 µl. A mistura de reação foi incubada a 37 °C durante 4 h e o resultado revelado por eletroforese em gel de agarose 0,8 % (p/v). Junto às amostras foi corrida uma alíquota de um dos clones sem digerir, como controle.

2.4.5 Obtenção do material vegetal

Exemplares jovens (1 mês) e adultos (1 ano) da espécie de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* sp var RB 867515) foram coletados dos canaviais da EMBRAPA-Pecuária Sudeste (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) de São Carlos (SP), cedidos gentilmente pela engenheira agrônoma Patrícia Menezes Santos e com a ajuda do supervisor de campo Adilson Márcio Malagutti. As sementes de milho (*Zea mays* sp) e sorgo (*Sorghum bicolor* sp, cultivar 7301011 IPA) foram obtidas do comércio local.

2.4.6 Extração de DNA genômico de Cana-de-açúcar

Para extração do DNA genômico foram utilizadas as folhas da cana-de-açúcar como material de partida. Estas foram previamente cortadas em fragmentos pequenos e

imediatamente congeladas em nitrogênio líquido em um almofariz. O material foi macerado intensamente com a ajuda de um pistilo até a formação de um pó fino. Durante todo o processo evitou-se o descongelamento do material mediante a adição cuidadosa de nitrogênio líquido ao recipiente. O material macerado foi coletado em tubos polipropileno de 2 ml e estocado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a sua utilização.

A extração foi realizada utilizando aproximadamente 50-60 mg do macerado e seguindo o protocolo específico para tecidos vegetais descrito no kit “Wizard Genomic DNA” (Promega). No final da extração uma alíquota do DNA (em H_2O ultrapura) foi utilizada para se determinar o rendimento da extração. Segundo o cálculo feito pela absorbância a 260nm, a extração rendeu aproximadamente 15 μg de DNA. Para conferir a presença e qualidade do DNA, 1 μl da mesma extração foi analisada por eletroforese em gel de agarose 0,8% (corrido a 10volts/cm durante 1 ½ h) e revelado em transiluminador de luz UV. Os critérios utilizados para se determinar o bom estado do material foram: detectar visualmente a presença de uma banda única de DNA de alto peso molecular, a ausência de bandas espúrias ou “smears” (indicativas de degradação do material), assim com a ausência de bandas contaminantes de RNA. O DNA foi rapidamente estocado em tubo de polipropileno (de 1,5 ml) a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a sua utilização.

2.4.7 Extração de RNA total de diferentes tecidos vegetais e síntese do cDNA

A extração do RNA total de tecidos vegetais de cana-de-açúcar, milho e sorgo, foi realizada utilizando o kit *RNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen) ou Trizol (Invitrogen). Para tal fim foram utilizados aproximadamente 100 mg de macerado (pó) de cada amostra, processado como em 2.4.6, em condições de trabalho livre de RNAases. O rendimento da extração foi calculado pela leitura da absorbância em 260 nm utilizando espectrofotômetro *Nanodrop* (Thermoscientific). A qualidade do RNA foi estabelecida por três parâmetros diferentes: a concentração obtida a 260 nm, pela relação da absorbância 260/280 nm e pela relação da medição a 260/230 nm, sendo de $>1,8$ o valor de referência para o RNA puro. Outro parâmetro considerado foi a visualização da integridade do RNA após corrida eletroforética

(como em 2.4.6) em uma cuba exclusiva para RNA (previamente tratada com DEPC, dietilpirocarbonato).

2.4.8 Tratamento do RNA total com DNase e síntese de cDNA

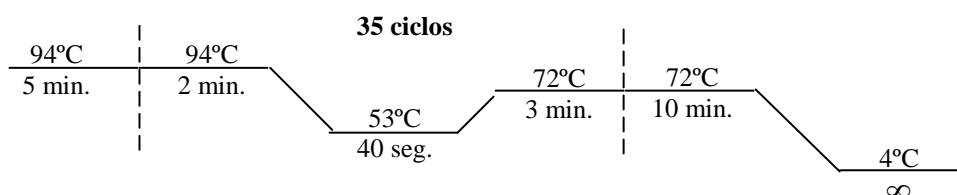
Uma vez finalizada a extração e confirmada a qualidade do RNA total, este foi tratado com DNase para evitar que qualquer vestígio de DNA genômico interferisse nas reações posteriores. Para isto, de 3-10 µg do material foram incubados com RQ1 DNase (Promega, 1U/µg de RNA) em tampão da enzima (RQ1 *buffer* 1 X), num volume final de reação de 10 µl, durante 30 minutos a 37°C. Para finalizar a reação de degradação do DNA, a cada amostra foi adicionado 1 µl de solução de *STOP* da enzima DNase e posteriormente as amostras foram incubadas por 10 minutos a 65 °C. As amostras tratadas foram mantidas no gelo até a utilização no passo seguinte.

A síntese do cDNA foi realizada utilizando o *kit Superscript III* (Invitrogen) e alíquotas do RNA total, tratado com DNase, foram utilizadas como molde. O seguinte protocolo foi realizado:

- Desnaturação: tipicamente 6µl do material foram misturados num tubo de PCR (0,2 ml) junto com 0,5 µg de OligodT e 10 mM de dNTP. Esta mistura (10µl) foi incubada por 5 minutos a 65°C e, a seguir, mantida em gelo por 1 minuto.
- Hibridização (anelamento): 10 µL da solução *First Strand Mix*, contendo o tampão da enzima RT-polimerase (M-MLV) 1X, DTT 0,1 M, MgCl₂ 25 mM, e 40 U (1µl) de *RNAse out* e 200 U da enzima M-MLV (SuperscriptTM III RT) foram adicionados a cada amostra.
- Síntese do cDNA: A mistura de reação foi incubada durante 50 minutos a 50 °C e, para finalizar a reação, foi realizada uma incubação por 5 minutos a 85 °C. Finalizada a síntese, cada amostra foi tratada com RNase H, por 20 minutos a 37°C, para eliminar o RNA. Tipicamente 2 µl de cada amostra foram utilizados para amplificar os genes de interesse, utilizando *primers* específicos para cada caso, desenhados para cada espécie de acordo com as sequências obtidas nos bancos de dados.

2.4.9 Amplificação da fase aberta de leitura (ORF) do gene codificante para soRIP a partir do DNA genômico da Cana-de-açúcar

A reação de amplificação da ORF completa foi realizada pela da técnica de PCR, utilizando os primers *SoripORF F'* e *R'*, descritos na tabela 2.2 e uma alíquota (~1 µg) do DNA genômico extraído de folha de cana-de-açúcar (item 2.4.7) como molde da reação. A reação foi realizada em um volume final de 50 µl, contendo: tampão da enzima *Taq* (1X) *High Fidelity* (Fermentas), 0,2 mM de dNTPs, 2 mM de MgCl₂, 2 µM de cada *primer F'* e *R'*, acima mencionados e 5% de DMSO. O molde foi adicionado e a mistura de reação foi e incubada por a 94 °C por 5 minutos e depois foram adicionadas 5 U de enzima *DNApol High-Fidelity* (Fermentas). O termociclador foi programado como mostrado a seguir:



2.4.10 Amplificação da cadeia A da soRIP (soRIPA) de cana-de-açúcar

O isolamento e amplificação da cadeia A da soRIP (soRIPA) foi realizada pelo mesmo método de PCR detalhado no item anterior, utilizando os *primers* específicos SoRIPA, *F'* e *R'* descritos na tabela 2.2. e utilizando como molde de reação uma alíquota do cDNA extraído no item 2.4.8, ou alternativamente usando uma alíquota de um dos clones obtido do projeto SUCEST. As condições de reação foram similares as descritas no item anterior, exceto pela temperatura de hibridização, que neste caso foi de 57 °C. Os resultados foram revelados em gel de agarose como já mencionado anteriormente.

2.4.11 Clonagem dos produtos de PCR e subclonagem de *soripA* em vetor de expressão

Durante este projeto, todos os DNAs amplificados por PCR foram posteriormente clonados seguindo o protocolo descrito a seguir. Uma vez confirmado o tamanho do fragmento de DNA de interesse por eletroforese em gel de agarose 0,8 %, estes DNAs foram submetidos a um gel de agarose preparativo, excisados deste e purificados pelo kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega), seguindo o protocolo do fabricante. Em seguida, os fragmentos foram clonados nos vetores pTZ57R/T ou pCR2.1 de acordo com os protocolos de ligação sugeridos pelo fabricante, numa relação molar inserto:vetor igual a 3:1. Dois microlitros (μL) dessa mistura de ligação foram utilizados para transformação de células *E. coli* linhagem DH5 α competentes por CaCl_2 (89). As células foram plaqueadas em meio Luria-Bertani (LB)-Agar contendo X-gal (0,1 mg/mL), IPTG (0,45 mM) e ampicilina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), a fim de selecionar as colônias positivas (brancas) das negativas (azuis), sendo incubadas a 37°C por 16h. Após o crescimento, as colônias brancas foram selecionadas a fim de realizar a extração dos seus DNAs plasmidiais. Para isso, elas foram repicadas individualmente, em tubos estéreis contendo 5 mL de meio LB suplementado com ampicilina (pré-inóculo) e cultivadas a 37°C por 16h, sob agitação (250 rpm). As colônias positivas foram confirmadas por PCR de colônia, utilizando primers específicos do vetor. O clones confirmados tiveram seu DNA plasmidial extraído (kit *Wizard MiniPrep Kit*, Promega) e foram submetidos ao seqüenciamento de DNA (88) num seqüenciador automático *ABI Prism 377* (Perkin Elmer), segundo o protocolo do fabricante. As seqüências obtidas foram analisadas nos programas *Gene Runner*, pelo pacote de programas do DNASTar e no programa Clustal W (90).

A subclonagem de *soripA*, codificando a cadeia-A da RIP tipo 2 de *S. officinarum*, foi feita em vetor de expressão pET28a (Novagen). O DNA codificante e o vetor foram previamente digeridos com as enzimas *NdeI* e *XhoI*, a fim de inserir o gene corretamente e em fase de leitura com a região codificante de um polipeptídeo de 6 histidinas na região N-terminal. A reação de ligação foi realizada utilizando a enzima T4 DNA ligase e numa razão

inserto:vetor de 3:1. Os passos posteriores de propagação em bactérias, extração plasmidial e confirmação de presença do gene inserido foram realizados como descrito previamente.

2.4.12 Expressão heteróloga e purificação da soRIPA

Uma colônia de células *Escherichia coli* BL21(DE3) contendo o plasmídio de expressão recombinante pET28soRIPA foi inoculada em 5 ml de meio LB seletivo (contendo 30 µg/ml do antibiótico canamicina) e crescida a 37°C, a 250 rpm por 16 h. Esta cultura foi então diluída em 500 ml (seguindo a proporção 1:100) do mesmo meio seletivo e crescida sob as mesmas condições até atingir uma densidade ótica, D.O₆₀₀, entre 0,4 e 0,6. Uma amostra da cultura (100 µl) foi retirada, centrifugada e as células congeladas para servir de controle pré-indução da expressão (amostra não induzida). Em seguida, a expressão da soRIPA foi induzida pela adição de IPTG (concentrações de 0,1 e 0,5 mM) à cultura. Novas amostras de 100 µl foram retiradas da cultura, a intervalos de 6 ou 16 horas após a indução, processadas como a anterior, sendo usadas para análise da expressão. Ao final da incubação a cultura foi centrifugada (10.000g, 10 min, a 4 °C) e as células foram ressuspensas em 50 ml de tampão A (Tris-HCl 50 mM pH 8, contendo NaCl 0,25M) em banho de gelo e lisadas por sonicação (Fischer Scientific) de 10 pulsos de 20 mA, durante 30 segundos com intervalos de 1 minuto cada. O lisado foi centrifugado (10.000 g, por 15 minutos) e a solubilidade da proteína recombinante foi analisada em SDS-PAGE 15% utilizando amostras do sobrenadante e precipitado obtidas. O precipitado foi solubilizado em tampão A desnaturante (tampão A suplementado com uréia 6M). Após incubação em banho de gelo por 1 hora a solução foi sonicada (3 vezes) e centrifugada como descrito anteriormente. O novo sobrenadante contendo a proteína de interesse foi aplicado numa coluna contendo a resina de Ni-NTA, previamente equilibrada com 5 volumes (25 ml) de tampão A desnaturante. Outros 10 volumes de tampão A foram utilizados para a remoção de proteínas ligadas com baixa afinidade à resina. A eluição da soRIPA foi realizada mediante a adição de imidazol ao tampão B desnaturante (Tampão A desnaturante contendo concentrações crescentes de Imidazol, tipicamente de 20 mM a 250 mM).

2.4.13 Renovelamento da soRIPA

Aproximadamente 15 ml de amostra contendo a proteína obtida a partir da eluição com 50 mM de imidazol foram dialisados contra concentrações decrescentes do agente desnaturante uréia, em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8, contendo NaCl 100mM e 20 mM de 2-mercaptoetanol. A diálise foi mantida sob agitação constante e a temperatura de 5-10 °C, utilizando-sesaco de nitrocelulose (10 µm de tamanho de corte). Durante o processo, três amostras foram retiradas em tempos distintos (com 6M, 3M, 0M de uréia), centrifugadas a 10.000 g e submetidas a SDS-PAGE 15%. Finalizada a diálise, alíquotas da proteína foram submetidas a mais um passo de purificação em cromatografia de exclusão molecular.

2.4.14 Cromatografia de Exclusão Molecular

A eliminação de possíveis agregados protéicos e ou proteína desnaturada originada durante o processo de desnaturação e renovelamento, foi realizada por cromatografia de exclusão molecular. Uma amostra da proteína purificada e renovada por diálise (1 mL) foi injetada em uma coluna *Superdex 75 HR* (GE Healthcare), pré-equilibrada com o mesmo tampão da amostra, acoplada a um sistema HPLC preparativo (*ÄKTA™ Purifier 10* GE Healthcare Biosciences). A cromatografia foi realizada com um fluxo constante de tampão de 0,5 mL/min e monitoramento da mesma realizada por medição da absorbância em 280 nm, sendo o eluato coletado em frações de 1 mL. Finalizada a cromatografia, o grau de pureza e o conteúdo de estrutura secundária foram analisados por SDS-PAGE 15% (91) e dicroísmo circular, respectivamente.

2.4.15 Medidas de dicroísmo circular (CD)

O conteúdo de elementos de estrutura secundária na soRIPA recombinante foi investigado por dicroísmo circular (CD). Os experimentos foram realizados em um espectropolarímetro Jasco J-815 (*Jasco Instruments*). As medidas foram realizadas com

soluções de proteína a concentrações de 0,1 mg/mL, em tampão Tris-HCl 50 mM, 150 mM NaCl, pH 7,4. Os espectros de CD foram coletados de 195 a 250 nm com uma média de 8 varreduras, utilizando cubeta cilíndrica de quartzo de 1 mm de caminho óptico.

2.4.16 Obtenção do extrato bruto (EB) de *S. officinarum* (protocolo 1)

O protocolo utilizado para obtenção do extrato bruto (EB) de cana-de-açúcar foi baseado naquele estabelecido por Soares-Costa e colaboradores para a purificação da proteína recombinante canacistatina a partir de folhas de cana-de-açúcar (92). Aproximadamente 10 g de folhas foram maceradas em nitrogênio líquido usando um almofariz e pistilo. O pó resultante foi homogeneizado em 30 ml de tampão de extração (Tris-HCl 0,2 M, pH 8 contendo Na₂HPO₄ 32mM, 84 mM ácido cítrico e 0,1 % β-mercaptoetanol) e mantido sob agitação constante, durante 45 min. Posteriormente foi filtrado através de 4 camadas de gaze e depois centrifugado a 10.000 g por 30 min. Um volume igual de 10% de TCA (ácido tricloroacético) foi adicionado ao sobrenadante e a mistura foi incubada por 1 hora a temperatura ambiente e a seguir centrifugada a 10.000 g por 30 min. O precipitado obtido foi ressuspenso em 5 ml de TCA gelado, agitado e centrifugado nas condições anteriores. O precipitado foi lavado 3 X com etanol absoluto ou acetona pura e deixado secar durante 16h. Após seco, o precipitado foi ressuspenso em tampão Tris-HCl 10mM pH 8, contendo Na₂HPO₄ 50mM e 50 mM NaCl ou alternativamente PBS. Uma vez finalizada a extração, o extrato protéico foi submetido à purificação por cromatografia de afinidade a Galactose, utilizando-se uma resina *Sepharose* contendo D-galactose imobilizada (Pierce).

2.4.17 Obtenção do extrato bruto (EB) de Cana-de-açúcar, *S. officinarum* (protocolo 2)

Com o intuito de processar uma maior quantidade de folhas e para evitar o uso de TCA como agente concentrador de proteínas do EB, aplicou-se um segundo protocolo para a

obtenção e concentração do EB. Aproximadamente 1kg de folhas de cana-de-açúcar foram picotadas em fragmentos pequenos, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C até sua utilização. O material armazenado foi dividido em Beckers de 500 ml contendo o tampão de extração PBS, suplementado com 10 mM de EDTA, 50 mM de ácido ascórbico e 1,5 % (p/v) de PVPP (Sigma). A mistura foi mantida durante tempos variados de 2, 6, e 16 h a 10°C, sob agitação constante. A seguir, a mistura foi centrifugada a 10.000 g, a 4 °C, por 10 minutos. O sobrenadante obtido (aproximadamente 3 litros) foi concentrado 10 vezes mediante filtração tangencial, usando o dispositivo *QuixStand™* System (GE Healthcare bioscience) com membrana de filtração para 10 kDa de tamanho de exclusão e posteriormente centrifugado mais uma vez nas mesmas condições. O sobrenadante foi novamente aplicado no dispositivo de filtração, concentrado até 50 ml de volume final e dialisado contra tampão PBS (20 volumes). O fluxo utilizado durante o processo foi de aproximadamente 2 ml/min. Finalizado o processo, prosseguiu-se com o protocolo de purificação da proteína soRIP por cromatografia de afinidade a D-galactose.

2.4.18 Cromatografia de afinidade em coluna de D-galactose

Para o isolamento da soRIP no seu estado nativo e madura (com a presença da cadeia A tóxica ligada covalentemente a B, ou lectínica), o EB obtido tanto no item 2.4.16 e 2.4.17 foi submetido à cromatografia de afinidade em coluna de *Sepharose* contendo D-galactose imobilizada (Pierce). À uma coluna de 10 ml, pré-equilibrada com o tampão PBS, o EB foi aplicado e duas estratégias foram utilizadas na tentativa de garantir a ligação da proteína de interesse na resina: i) o EB foi incubado na coluna sob agitação, durante 4h a temperatura ambiente; ou, alternativamente, ii) o EB foi aplicado e reaplicado várias vezes, utilizando-se uma bomba peristáltica, durante 4 horas. Prosseguiu-se com a lavagem da coluna com 5 volumes de tampão PBS e a eluição foi realizada com PBS contendo 500 mM de D-galactose. O eluato foi coletado em frações de 1 ml e o resultado da purificação, analisado em SDS-PAGE 15% (91).

2.4.19 Determinação da atividade da proteína recombinante soRIPA

2.4.19.1 Ensaio de inibição da síntese proteica em sistema livre de células

O primeiro protocolo utilizado para determinar se a soRIPA possuía atividade inibitória da síntese proteica foi realizado pela medida da expressão da proteína repórter Luciferase *in vitro* em um sistema livre de células extraído de reticulócitos. Para isto utilizou-se o kit TNT[®] *Coupled Reticulocyte Lysate Systems* (Promega) o qual é extremamente sensível e rápido. O kit tem a vantagem de ter acoplado as etapas de transcrição e a tradução gênica num extrato celular eucarioto. Este tipo de sistema tem diversas aplicações, dentre elas o ensaio de inibição da síntese proteica mediado por RIPs (93). Portanto espera-se que na presença da proteína soRIPA ativa esta atue sobre os ribossomos presentes no sistema, impedindo assim a síntese proteica, incluindo a do gene repórter (luciferase) e, conseqüentemente, não haja detecção da atividade da luciferase (luminescência) (figura 1.9).

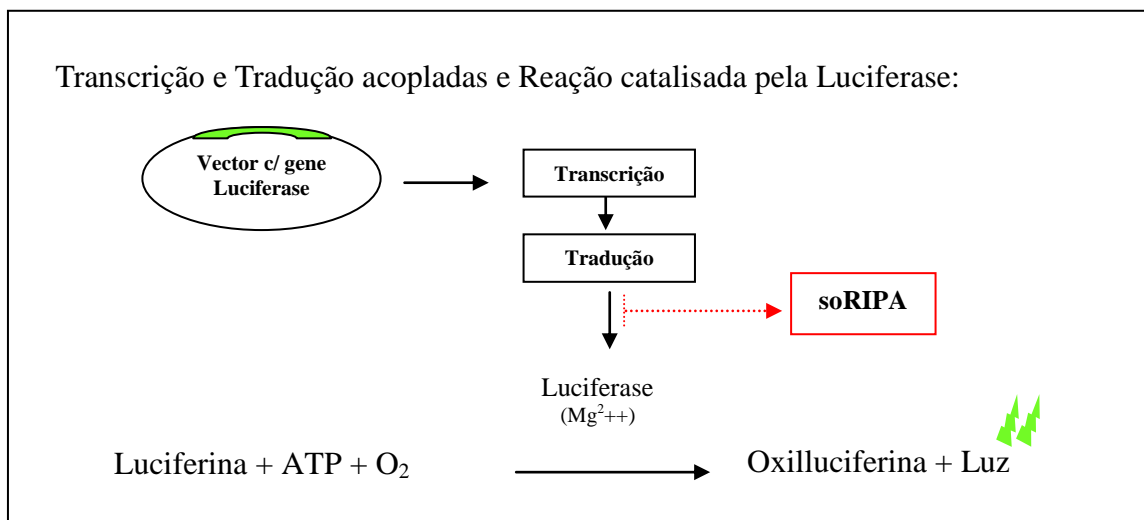


Figura 1.9 - Esquema representativo das reações *in vitro* que ocorrem no sistema livre de células. As reações acopladas de transcrição e tradução do gene repórter permitem a expressão da proteína luciferase, a qual em presença do substrato luciferina catalisa a reação que tem como produto a emissão de luz. A atividade inibitória da síntese proteica da soRIPA seria por tanto evidenciada, indiretamente, pela diminuição ou ausência de luz.

A reação de inibição foi realizada em um volume final de 25 µl contendo:

- 12,5 µl do extrato TNT
- 1 µl de tampão TNT
- 0,5 µl de T7-RNA polimerase
- 0,5 µl RNAsin Ribonuclease inibitor
- 1 µl de Mistura de aminoácidos
- 1 µl de Vetor Luciferase (0,5 µg/µl)
- H₂O q.s.p. 25 µl

Para analisar a atividade da soRIPA, diferentes concentrações da mesma foram testadas. Como controle positivo da reação da luciferase, apenas H₂O foi adicionada. Como controle positivo da inibição de síntese, uma amostra da pulchellina (previamente tratada com DTT) foi utilizada. Assim, as reações contendo a soRIPA, bem como os controles foram incubados durante 45 minutos a 30 °C. A seguir, aproximadamente 2,5 µl da reação foram misturados com 25 µl de substrato da luciferase (*Luciferase Assay Reagent*). A medida da luz emitida foi realizada em um luminômetro Sirius V.3.1, com 2 segundos de tempo de retardo (Measurement Delay-time) e 20 segundos de aquisição por amostra. Os resultados foram expressos em URL/s (unidades relativas de luz por segundo) em função da concentração da soRIPA. Os experimentos foram realizados em triplicata e os valores representados como a média das três medições.

2.4.19.2 Ensaio de depuração de ribossomos de rato

O ensaio específico para determinar a atividade depurinadora (rRNA N-glicosilase) da soRIPA foi realizado com ribossomos intactos rato (*Ratus norvegicus*), seguindo o protocolo utilizado por Ayub *et al* (94) com algumas modificações. Uma vez pura e renovada, a soRIPA foi misturada com os ribossomos (0,3 U, unidades de absorvância) em uma reação de 30 µl de volume final em tampão Endo 1X (Tris-HCl 250 mM pH 7,6; KCl 250 mM e MgCl₂ 50 mM) (95) e Ribonuclease Vanadyl Complex (Bio Labs). A reação foi incubada durante 1 h a 30 °C e depois finalizada com a adição de 100 µl de H₂O e 400 µl de Trizol (invitrogen). O RNA foi extraído seguindo o protocolo do fabricante e ressuspensão em 20 µl de H₂O. Depois 10 µl do RNA puro foi misturado com 50 µl de anilina ácida (pH 4,5) anilina:ácido acético:H₂O (1:1,6:7,4) e incubada por 3 minutos a 60 °C, em banho seco. Após a incubação, a reação foi parada com a adição de uma solução de acetato de amônia 7,5 M e 3

volumes de etanol gelado. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g, durante 15 minutos e o precipitado de RNA foi ressolubilizado em H₂O. O resultado foi analisado em PAGE (6-8%), em condições desnaturantes (contendo 7 M de uréia) e corado com brometo de etídio para revelação das bandas. Como controles positivos da reação de depuração foram utilizadas as RIPs: TCS (Trisconsantina, uma RIP tipo I) e rPAC (cadeia A da pulchellina recombinante), processadas da mesma maneira que a soRIPA. Como controle negativo da reação, uma alíquota da reação de TCS foi processada com a adição de H₂O em vez de anilina acética.

2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o objetivo de encontrar putativas RIPs do tipo 2, as sequências completas das formas imaturas (proRIPs) da ricina (número de acesso P02879) e da pulchellina (BINQB9) foram escolhidas como sequências de entrada para busca (*query*) no programa *tBLASTn*, utilizando os parâmetros pré-definidos pelo programa. A utilização desta ferramenta é útil para localizar sequências de nucleotídeos homólogas, ainda não anotadas nos bancos de dados, e permite comparar a sequência *query* com o produto resultante da tradução da sequência de nucleotídeos nas seis possíveis fases abertas de leitura (*ORFs*, *Open Reading Frames*).

O resultado do alinhamento obtido tanto usando a pulchellina como a ricina como *query* foram semelhantes e, por isto, apenas será descrito aquele obtido usando a ricina. A busca preliminar no banco de ESTs de cana-de-açúcar mostrou a presença de aproximadamente 100 ESTs significativamente idênticas a ricina (tabela 2.3). Esta nova putativa RIP tipo 2 passou a ser denominada de SoRIP (*Saccharum officinarum ribosome-inactivating protein*).

Ao analisar estes resultados foi possível perceber que a maioria das sequências protéicas deduzidas alinhavam-se principalmente com a região N-terminal da cadeia A ricina. Outras sequências alinharam-se tanto a regiões correspondentes a cadeias A quanto a cadeia B da proteína, mas nenhuma das ESTs apresentou uma sequência completa capaz de alinhar-se com a ricina em toda sua extensão.

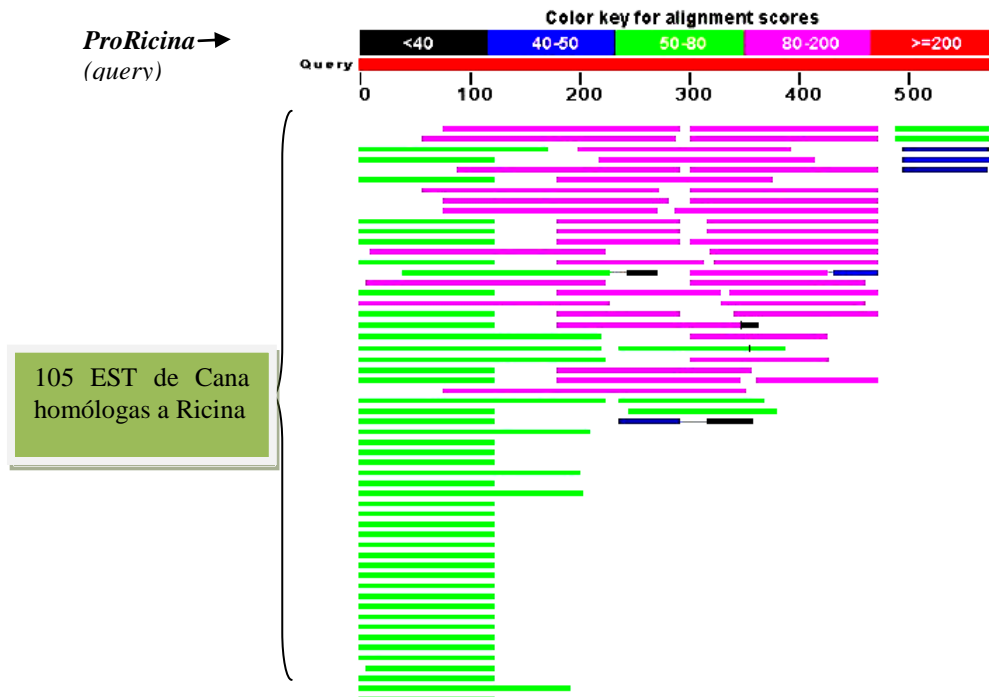


Figura 2.1 - Sequências obtidas do banco de dados para EST da cana-de-açúcar que apresentaram identidade com a sequência protéica da ricina. Cada EST está respresentada por seu código de acesso no GenBank, o *score* máximo apresentado no alinhamento, o valor E (*expected value*) e a identidade máxima apresentada com a sequência da ricina. Nesta tabela mostram-se apenas aquelas sequências com maior *score* e valor E.

É bem conhecido que os bancos de ESTs são compostos de sequências curtas, resultantes do sequenciamento dos cDNAs obtidos de um determinado organismo, tecido ou célula. No caso do projeto de sequenciamento da cana-de-açúcar (SUCEST), foram gerados cerca de 290 mil ESTs, das quais 250 mil foram sequenciadas a partir de sua extremidade 5' e o restante a partir da extremidade 3' (87). Por limitações próprias da técnica de sequenciamento automático implementada na época, o tamanho médio das sequências era de aproximadamente 500-600 pb (pares de bases). Portanto, já era esperada uma menor probabilidade de encontrar sequências que se alinhassem à sequência C-terminal da ricina.

Outro aspecto relevante a ser considerado é o fato dos cDNA gerados (nas diferentes bibliotecas) e clonados pelo SUCEST terem um tamanho médio de 0,8 e 1,5 kb (kilobases), sendo que a ORF de uma RIP tipo 2 típica, como a de ricina por ex., tem um tamanho aproximado de 1,6 kb (96). Assim, seria razoável supor que alguns destes clones, parcialmente sequenciados pelo projeto SUCEST, contivessem a ORF completa procurada. Nesse sentido foram adquiridos seis clones os quais foram re-sequenciados primeiramente utilizando os *primers* 5' (T7 promoter) e 3' (SP6) próprios para o vetor de clonagem pSPORT1 (Invitrogen) utilizado pelo SUCEST. Os resultados do sequenciamento confirmaram a presença do cDNA codificador de uma RIP tipo 2 significativamente idêntica à ricina. O

sequenciamento das extremidades 5' destes clones permitiu identificar a sequência deduzida correspondente da cadeia A (incluindo o peptídeo sinal N-terminal típico nas RIPs do tipo 2).

O sequenciamento das extremidades 3' dos clones mostraram sequências codificantes para uma lectina também similar a cadeia B da ricina. Analisando o alinhamento de todas as sequências obtidas para a extremidade 3' foi possível concluir que todas as ORFs estavam incompletas, já que não possuíam possíveis códons de parada e nem mesmo as sequências poli-A que caracterizam os RNAm eucariotos maduros. Isto foi confirmado ao “*blastar*” a sequência de aminoácidos correspondente a esta região, como mostra a Figura 2.2, para um dos clones. Por exemplo, o clone SC2 quando sequenciado e traduzido mostrou alinhar-se com os resíduos da cadeia B da ricina, correspondente a parte interna da mesma entre resíduos 327-466.

pRicB	DVSILIPIIALMVYRCAPPPSSQFSLLRPVVFNADVCMDEPEPIVRIVGRNGLCV	300
Sc2 (c-ter)	-----SGPYGRCV	
		* * *
pRicB	DVRDGRFHNGNAIQLWPCKSNTDANQLWTLKRDNTIRSNGKCLTTYGYSPGVYVMIYDCN	360
Sc2 (c-ter)	DVPYGLYYSGNQVQLWSCKSNGDVNQLWTLKRDGTIRSNGKCLASSGDAAGARVVINDCP	
	** * ::.* ** :***.*** * .*****.*****:: * :.* .*: * **	
pRicB	TAATDATRQIWDNGTIIINPRSS----LVLAATSGNSGTTLTVQTNIYAVSQGWLPTNNT	416
Sc2 (c-ter)	RVPTGRVWVEVRADGTVALKGSSRGGLVLAVTSSTLFAGLTVRRDDRGTQSWTPTNDT	
	..* . *:: :** : ** ****.*.. : ***: : ...*.* ***:*	
pRicB	QPFVTTIVGLYGLCLQANSQVWIEDCSSEKAEQQWALYADGSIRPQQNRDNCLTSDSNI	476
Sc2 (c-ter)	APLDAAIVGFRDLCLQVD-----	
	*: :***: .***.:	
pRicB	RETVVKILSCGPASSGQRWFMKNDGTILNLYSGLVLDVRRSDPSLQIILYPLHGDPNQI	536

Figura 2.2 - Alinhamento da região C-terminal (SC c-term) obtida por seqüenciamento e tradução do clone da soRIP (sc2 c-ter) com sequência da proricina. Pode ser observado que a os aminoácidos da soRIP alinham-se com resíduos localizados somente na porção interna da proteína (resíduos 327-466), mostrando que o clone não possui a orf completa para esta RIP. Os resíduos idênticos entre as sequências estão indicados com (*), as substituições conservadas e semiconservadas são indicadas por (:) e (.) respectivamente. O alinhamento foi feito utilizando-se o programa Clustal W (90) e com os parâmetros pré-definidos (*default*) no programa.

2.5.1 Análise de restrição dos clones de cDNA obtido do SUCEST

No projeto SUCEST, os cDNA gerados foram direcionalmente clonados no vetor pSPORT1 utilizando as enzimas de restrição *Sal* I e *Not* I. Assim, havia uma possibilidade do cDNA da soRIP ter perdido parte da região 3' ao ser clonado por conter algum de tais sítios de restrição. Assim, foi realizada uma análise de restrição dos seis clones obtidos do SUCEST

para verificar o tamanho do cDNA que eles continham. Esta análise mostrou que todos os clones adquiridos possuíam um fragmento clonado de aproximadamente 1,5 kb (Figura 2.3), tamanho inferior ao esperado para a ORF completa da soRIP, baseado na similaridade com a ricina. Note que neste experimento foi usada a enzima *EcoRI* ao invés de *Sal I*, pois já se sabia da existência de sítios internos de *Sal I* no cDNA.

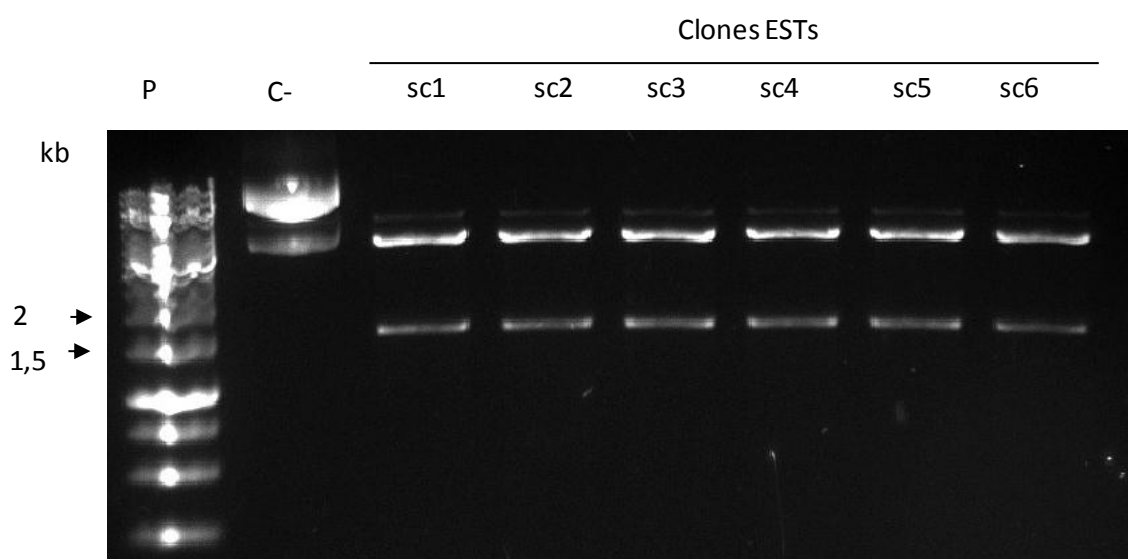


Figura 2.3 - Análise de restrição dos clones de ESTs da biblioteca de cana-de-açúcar. Eletroforese em gel de agarose mostrando a digestão após 2 hs, com as enzimas de restrição *NotI* e *EcoRI*. Os fragmentos liberados por cada clone possuem um tamanho aproximado de 1500pb. SC1, *SCQGST3126C11.g* (CA183457); SC2, *SCRLAM1008C11.g* (CA078531); SC3, *SCJLFL3015D09.g* (CA227942); SC4, *SCBGAM1090G09.g* (CA071793) ; SC5, *SCJLAM1061F03.g* CA075561; SC6, *SCEQAM1037H09.g* (CA073774). P: de peso molecular; C-:controle negativo.

Com o sequenciamento completo do clone SC2 e seu alinhamento com as ESTs obtidas do banco de dados, foi possível construir um *contig* parcial deste transcrito (Figura 2.4), de aproximadamente 1500 pb. Este transcrito foi usado para realizamos uma nova busca por seqüências semelhantes em outras espécies relacionadas à cana-de-açúcar com o intuito de identificar e completar a região 3' do transcrito.

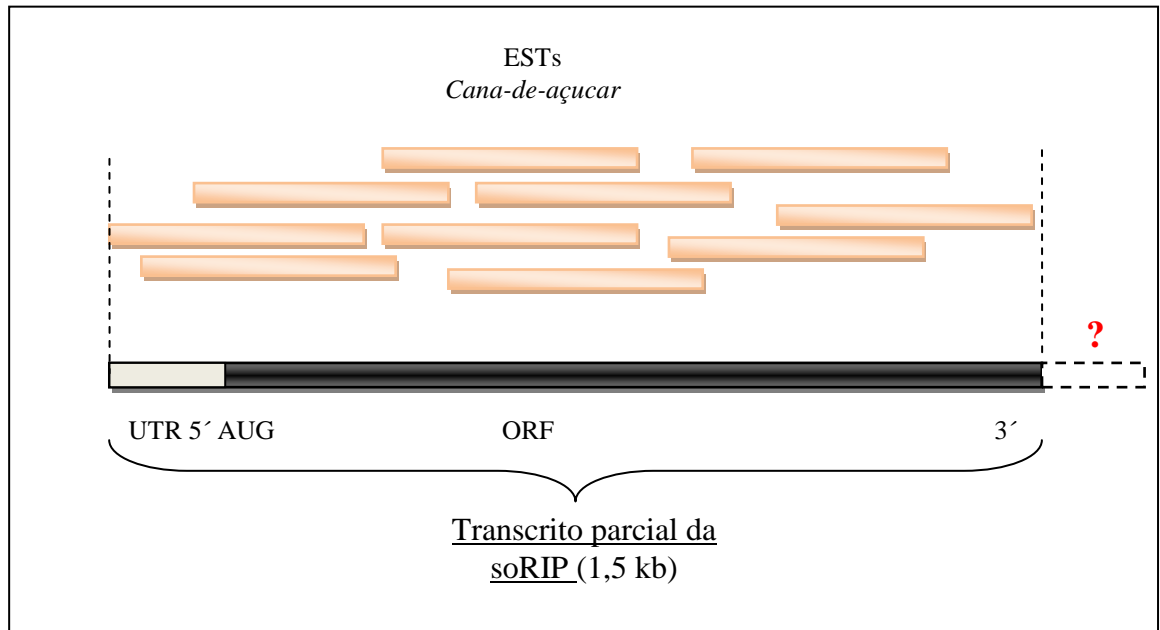


Figura 2.4 - Esquema representativo do transcrito parcial para soRIP obtido pelo alinhamento de sequências de ESTs (barras em laranja). O transcrito parcial foi caracterizado pela presença de uma região 5' não traduzida ou UTR 5' mais a ORF, esta mostrando a presença do códon de iniciação da tradução, mas não de terminação. A construção do transcrito (*contig*) foi realizada no programa Lasergen/SeqMan.

Quando foi realizada esta busca o principal banco de dados disponível para espécies de plantas evolutivamente relacionadas com a cana-de-açúcar era o banco de dados de sequências de milho (*Zea mays* sp). Assim, foi feita uma busca no banco de sequências genômicas desta espécie usando o programa *blastn*. Os resultados para tal busca foram uma série de sequências com alta identidade com o transcrito e algumas outras com a região 3' do gene. Ao analisar um destes clones do milho (Figura 2.5), ficou evidente a alta identidade entre as sequências (89%). Ao traduzir esta sequência de milho e usá-la numa busca por similaridade, foi possível confirmar que este clone continha a sequência codificante para uma RIP tipo 2 (Figura 2.6).

```
>gb|DX885619.1 ZMMLd0015H12.f ZMMLd Zea mays genomic clone ZMMLd0015H12 5',
genomic survey sequence.
Length=796

Score = 342 bits (185), Expect = 1e-90
Identities = 246/275 (89%), Gaps = 9/275 (3%)
Strand=Plus/Plus

Query 1235 ACGACTGCCCGCGCTCCCGACGGGCCGCTCGTCTGGGAGGTGCGCGGGACGGCACCG 1294
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 17   ACGACTGCCCGCGCTCCCGACGGGCCGCTCGTCTGGGAGGTGCGCGGGACGGGTACCG 76

Query 1295 TCGCGCTCAAGGGGTCMTCGGGCGGGGGCGCTGGTGTGGCGTGACCTCGTCGACGC 1354
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 77   TCGCGCTCAAGTGG---T--C-C--C-GCGGCTGGTGTGGCGTGACCTCGTCGACTC 127

Query 1355 TCITCGGGGGGCTCACGGTGSAGCGGGACGACCGGGGACGGGGCAGTCGTGGACGCCGA 1414
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 128  TCITCGGGGGGCTCACGGTGGCGGAGGACGACCGGGCACCAGTCGTGGACGCCGA 187

Query 1415 CCAACGACACCGCGCCCTGGACGCGCCATCGTCGGGTTCGCGACCTCTGCCTGCAGG 1474
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 188  CCAACGTCACCGCGCCCTGGACGCGCCATCGTGGGGTTCGCGACCTCTGCCTGCAGG 247

Query 1475 TGGACTATCGGGGGGCGGTGTCGGTCGCGCCTGC 1509
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 248  CGGACTACGCGGGGTCGGTATCCGTCGCTGCCTGC 282
```

Figura 2.5 - Resultado do alinhamento do transcrito parcial para soRIP (Query) com um clone proveniente do genoma do milho (sbjct= gb/DX885619.1)

Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E Value
gb AAK82459.1 type 2 ribosome-inactivating protein cinnamomi...	115	3e-24
pdb 1PUU B Chain B, Mistletoe Lectin I In Complex With Lactose	115	3e-24
pdb 3CEF B Chain B, X-Ray Structure Of Mistletoe Lectin I I...	115	3e-24
pdb 1M2T B Chain B, Mistletoe Lectin I From Viscum Album In C...	115	3e-24
gb AAL87006.1 lectin chain A isoform 1 precursor [Viscum album]	114	6e-24
gb AAK82460.1 type 2 ribosome-inactivating protein cinnamomi...	114	7e-24
sp P81446 ML1 VISAL Beta-galactoside-specific lectin 1 precu...	114	1e-23
gb AAR25546.1 lectin I precursor [Viscum album]	114	1e-23
gb AAR25548.1 lectin precursor [Viscum album]	114	1e-23
gb AAR25545.1 lectin I precursor [Viscum album]	113	1e-23
gb AAY34343.1 lectin precursor [Viscum album subsp. coloratum]	113	1e-23
pdb 1PUM B Chain B, Mistletoe Lectin I In Complex With Galact...	113	1e-23
sp P82683 ML3 VISAL Beta-galactoside-specific lectin 3 precu...	112	2e-23
pdb 1ONK B Chain B, Mistletoe Lectin I From Viscum Album	112	2e-23
gb AAM46936.1 lectin chain B isoform 2 [Viscum album subsp. ...]	112	3e-23
gb AAM46937.1 lectin chain B isoform 3 [Viscum album subsp. ...]	112	3e-23
pdb 1OQL B Chain B, Mistletoe Lectin I From Viscum Album Comp...	112	3e-23
pdb 1CE7 B Chain B, Mistletoe Lectin I From Viscum Album >pdb...	112	4e-23
sp Q6ITZ3 ML4 VISAL Beta-galactoside-specific lectin 4 precu...	109	2e-22
pdb 1PC8 B Chain B, Crystal Structure Of A Novel Form Of Mist...	109	2e-22
pdb 2AAI B Chain B, Crystallographic Refinement Of Ricin To 2...	109	2e-22
sp P02879 RICI RICCO Ricin precursor [Contains: Ricin A chain...	109	2e-22
pfi I111227A ricin D B	109	2e-22
gb AAB22582.1 proricin A chain [Ricinus communis]	108	3e-22
emb CAA26230.1 unnamed protein product [Ricinus communis]	108	3e-22
gb AAK82458.1 type 2 ribosome-inactivating protein cinnamomi...	106	2e-21
gb AAF68978.2 AF259548 1 type II ribosome-inactivating protei...	106	2e-21

Figura 2.6 - Resultado do *blastx* feito com a sequência de DNA genômico de milho (DX885619.1) mostrando identidade significativa com várias RIPs tipo 2.

Considerando a alta identidade entre a soRIP e as sequências genômicas de milho, a sequência da RIP tipo 2 de milho foi usada numa nova busca no banco de dados de ESTs da cana-de-açúcar, visando completar o transcrito da soRIP com novas sequências que

contivessem o extremo 3'. Deste modo, utilizando a seqüência de DNA de milho realizou-se um *blastn* contra o banco de ESTs, limitando o banco para apenas seqüências de cana-de-açúcar. O resultado, mostrado na figura 2.7, permitiu encontrar dos *clusters* ou grupos de ESTs que alinhavam com a seqüência de milho. Após análise, verificou-se que os clones do primeiro *cluster* (1) correspondiam a região 5' do transcrito para soRIP e as ESTs agrupadas no segundo *cluster* (2) representavam novas seqüências. Ao traduzir a seqüência de um destes clones do *cluster* 2 (SCBGFL3094B07.g/CA243205.1) foi possível constatar na fase de leitura (-3) a seqüência faltante dos clones obtidos no SUCEST, a qual correspondia a parte do extremo 3' codificante da cadeia B da SoRIP e a região UTR 3' do transcrito.

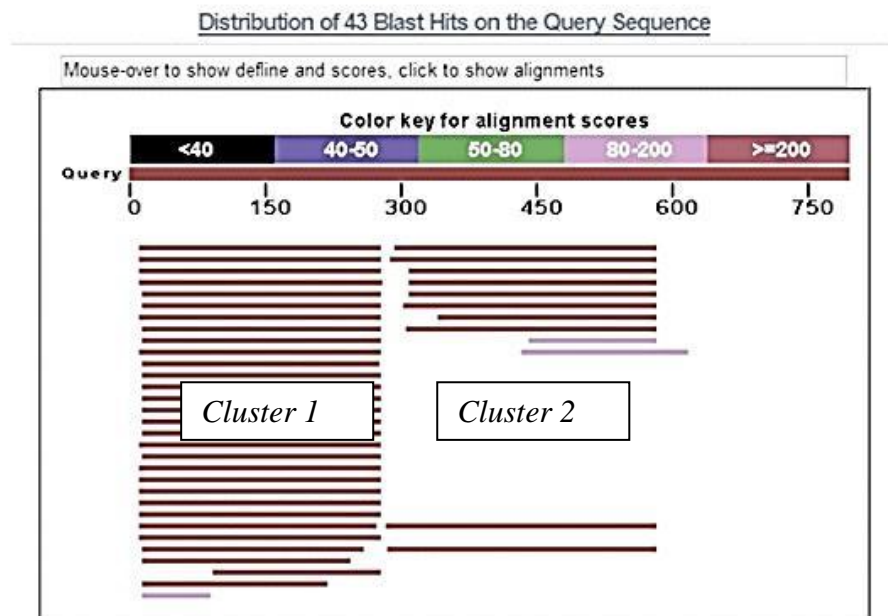


Figura 2.7 - Resultado do *blastn*, usando a seqüência de milho como *query* na procura por seqüências semelhantes no banco de ESTs da cana-de-açúcar. Os dois *clusters* identificados são destacados.

2.5.2 Caracterização da ORF (*Open Reading Frame*) da soRIP

Após a análise *in silico* e dedução das seqüências protéicas utilizando os dados de sequenciamento de DNA dos clones obtidos neste trabalho, determinou-se que a ORF (*Open Reading Frame*) do gene soRIP é constituída de aproximadamente 1800 pb e contém a seqüência codificante do precursor de uma RIP tipo 2, soRIP (figura 2.8). Ao analisar o mapa

de restrição desta sequência, foi possível identificar a presença de dois sítios de restrição para a enzima *Sal* I, nas posições 494 e 1345 (figura 2.8), e um sítio para a enzima *Not* I, na posição 1507. A presença do sítio para *Not* I nessa posição sustenta a suposição prévia sobre a ausência de parte da região codificante na extremidade 3' da sequência no banco de ESTs. Provavelmente tal região foi perdida durante o procedimento de clonagem dos respectivos cDNAs em função da presença do sítio de reconhecimento para *Not*I.

Foi também observado que a ORF deste gene apresenta mais de um possível códon de iniciação, AUG (destacado em cinza na figura 2.8), em fase com o resto da sequência, indicando a possibilidade da existência de mais de um produto protéico. Sabe-se que a maior parte dos sítios de iniciação dos RNAs mensageiros em eucariotos encontram-se na região mais próxima da extremidade 5' do transcrito. Segundo o modelo de "scanning" ou de varredura (97) o ribossomo se ligaria a região UTR 5' do transcrito de onde começaria a varredura (no sentido 5'→3') até encontrar o primeiro AUG do RNAm. Conforme este modelo, a sequência de soRIP começaria no primeiro ATG. No entanto, também tem sido demonstrado que a iniciação da síntese protéica nem sempre segue este modelo e pode ser influenciada em parte pelo contexto onde a sequência iniciadora se localiza (97). Em geral, para eucariotos existe uma sequência consenso (a sequência Kozak) constituída por uma purina na posição -3 do AUG e uma guanina na posição +4, isto é: (A/G)NNAUGG. Em plantas, esta sequência consenso varia um pouco, particularmente em monocotiledôneas sabe-se que além dos nucleotídeos -3 e +4 as sequências CC (na posição -2, -1) e GG (em +4 e +5) determinam também quão eficiente será a transcrição de um determinado gene (98).

ATCAAAGGAGGGACGCAACCAATCATCCTGATGGTGATGAGCCTGGTAGTACCATGGTTC - 60 (pb)
 M K G G T Q P I I L M V M S L V V P W F - 20 (AA)

TGTCTCGCTTCTTCGGCAGCACTACCGGCACTAGCATCTGAAAACGTCGATGCAGCGGCA - 120
 C L A S S A A L P A L A S E N V D A A A - 40

GCAGCTCTGAAAGCAGAGTACATTAATATGAACTTCAGCACCGCGTCGGCGACCCCGAC - 180
 A A L K A E Y I N M N F S T A S A T P D - 60

AAGTACAAGAGCTTCATCGCCTCTGTTCTGTGCTGGCCTGGTGAGCACAGCAGAGTCCACC - 240
 K Y K S F I A S V R A G L V S T A E S T - 80

AACGGCAGCGGGATCCCTGTGCTGGTCAGCGAAGACGATCCGCTCGCGCTTGAAGCGTTC - 300
 N G S G I P V L V S E D D P L A L E A F - 100

CTAAACGTCCTCTGGTGAACAAGGCAGGGCGTTCCGTGAGCTTGAAGATGGACGTCTCC - 360
 L N V T L V N K A G R S V S L K M D V S - 120

GCGCCTACTTCGCGGGTTACGAAGCAGGGAAGTACTCGTGCCTCCTCAAGAGATCAGGT - 420
 G A Y F A G Y E A G N Y S C L L K R S G - 140

TCTGGCCGCACAGTGTTCATCGGTAACCTGTTACCGGAACTTGTATCCATGGGGAGGTCTT - 480
 S G R T V S S V T C Y R N L Y P W G G P - 160

Sal I

CCGACCGTCACCGTCGACGACACCCTGCGGCAGCCGCGGCATGGCGAGTGGAAGATCTC - 540
 P T V T V D D D P A A A A A W R V E D L - 180

GACGAGGCCATCTCGTCGCTGTTCTGTTCCCCACGGGGAACGCGACGAAAGAGGACCTG - 600
 D E A I S S L F L F P T G N A T K E D L - 200

AGCCGGGGCCTCGCCGCCTGCGACGTGATGATCGCGAGCGCGGGCGACGTTCCCGTACGTG - 660
 S R G L A A C D V M I A S A A T F P Y V - 220

GAGCGGCGGATGAGCGCCGGCATGTGGGACGGCAACGGCGTGTCCAACGACGGGAGCCTT - 720
 E R R M S A G M W D G N G V S N D G S L - 240

CGCGGGCTTCAGGAGAGCTGGCCGAGCTCTCCGCCCGTCCAGGAGTCTACCAGGGC - 780
 R G L Q E S W P E L S A A V Q E S Y Q G - 260

GCCTTCGCCGCTCCGGTGGGTGTTTCAGCGGAGCAACGGGGAGTGGATGCAGGTGGACAAC - 840
 A F A A P V G V Q R S N G E W M Q V D N - 280



Continua

Continuação

GTGCGTCGCGCCGTCGCCCTGGTCTCCTTCCTGGAGAACGCAGGCTGCAAGAAGACGACG - 900	
V R R A V P L V S F L E N A G C K K T T - 300	
ACGCGGGAGGAAGCGGTGGACCAGCGGCTTCCCTTGCTCATAAGGTCCGTCGTGCCGCAA - 960	
T R E E A V D Q R L P L L I R S V V P Q - 320	
GAGCCGGATGAGGAGGACATGCAGCTGGGCAGGCCGACGGCGGGCGGTGCGGCCAGGCG -1020	
E P D E E D M Q L G R P T A A A C G Q A - 340	
GAGCCGACGGTGCGCCTCGTCGGCCCGTATGGGAGGTGCGTGGACGTGCCCTACGGCTTG -1080	
E P T V R L V G P Y G R C V D V P Y G L - 360	
TACTACAGCGGGAACCAGGTGCAGCTGTGGAGCTGCAAGTCCAACGGCGACGTGAACCAG -1140	
Y Y S G N Q V Q L W S C K S N G D V N Q - 380	
CTGTGGACGCTGAAGCGGGACGGCACCATCCGGTCCAACGGCAAGTGCTGGCCAGCAGC -1200	
L W T L K R D G T I R S N G K C L A S S - 400	
GGCGACGCGGGCGGGCGCCCGGTGGTGATCAACGACTGCCCGCGGTCCCCGACGGGGCCGC -1260	
G D A A G A R V V I N D C P R V P T G R - 420	
GTCGTCTGGGAGGTGCGCGCGGACGGCACCGTTCGCGCTCAAGGGGTCTCCCGGGCGGC -1320	
V V W E V R A D G T V A L K G S S R G G - 440	
Sal I	
GGCCTGGTGTGGCCGTGACCTCGTTCGACGCTCTTCGCGGGGCTCACGGTTCGACGGGAC -1380	
G L V L A V T S S T L F A G L T V R R D - 460	
GACCGCGGGACGGGGCAGTTCGTGGACGCCGACCAACGACACCGCGCCCTGGACGCCGCC -1440	
D R G T G Q S W T P T N D T A P L D A A - 480	
ATCGTCGGGTTCCGCGACCTCTGCCTGCAGGTGGACTATGCGGGGGCGGTGTCCGTGCC -1500	
I V G F R D L C L Q V D Y A G A V S V A - 500	
Not I	
GCCTGCGGCCGCGACGGCGTGCAGTGGTTCGCTTACCCCGACGGCTCCATCCGCCCGCCC -1560	
A C G R D G V Q W S V Y P D G S I R P P - 520	
GCGTGGCTGCTCCTTCAGTGGCAGTGCCTGGCCGCTGATGCCAGCGGGCGTGTGAGGGTG -1620	
A W L L L Q W Q C L A A D A S G R V R V - 540	
AAATACTGCGACTGGGCTGGTTTCGGCTTTCGAGCGCTGGGTGTTCCGCAACGACGGCACC -1680	
K Y C D W A G S A C E R W V F R N D G T - 560	
ATCTTCAACACCGGCACCGGGATGGTCTTGGACGTCGTCTGGCCATCGTCTGCGGGTGCT -1740	
I F N T G T G M V L D V V W P S S A G A - 580	
ACTGCTACTGCTAGCGGCCAGGTGCTGTCGTCGAAGCCCGCCACTGGGAGTCCCCTCCC -1800	
T A T A S G Q V V V S K P A T G S P T P - 600	
ACCCAGAAGTGGGCGCTCATGCTGTGA - 1827	
T Q K W A L M L * - 608	

Figura 2.8 - Fase Aberta de Leitura (ORF, Open Reading Frame) do gene sorip e sequência de aminoácidos deduzida. Tomando-se como referência o primeiro códon de iniciação da sequência, a ORF contém 1827 pares de bases (pb) codificando uma proteína de 608 aminoácidos e ~67 kDa de massa molecular. Na sequência de nucleotídeos destacam-se os sítios de reconhecimento das enzimas de restrição *Sal I* e *Not I* (ambas sublinhadas).

Ao analisar as regiões 5' não traduzidas (UTR 5') das ESTs para o gene (obtidas durante a busca *in silico*) observou-se que a sequência de nucleotídeos localizados próximos aos três possíveis sítios de iniciação da síntese de soRIP eram idênticos entre si, mas divergiam das sequências consenso propostas para eucariotos e também das propostas para monocotiledôneas. Assim, estas observações não permitiram conclusões a respeito da influência destas sequências sobre a expressão do gene soRIP. De fato há autores que minimizam a importância de uma sequência consenso sobre a regulação da síntese protéica em plantas (99, 100). Para determinar se um ou outro códon é usado durante a síntese de soRIP e se existe iniciação da transcrição alternativa gerando isoformas, há a necessidade de isolar a proteína nativa diretamente da cana-de-açúcar. Assim, neste trabalho, o primeiro ATG foi considerado o códon de iniciação, sendo a sequência deduzida a partir deste capaz de originar um precursor da soRIP formado por 608 aminoácidos, com massa molecular aproximada de 67 kDa.

2.5.3 Análise da estrutura primária do precursor protéico de soRIP (ppsoRIP)

2.5.3.1 Sequências sinalizadoras: peptídeo sinal e "linker"

As RIPs do tipo 2, como a ricina, são sintetizadas na forma de proteínas precursoras ou proRIP inativas, de maneira que estas não afetem a própria maquinaria de síntese. Além disto, são direcionadas para fora do compartimento citoplasmático, em geral sendo armazenadas nos vacúolos de estocagem das células. Para que isto seja realizado, a proteína deve conter um sinal específico que a direcione até o destino celular. No caso das RIPs tipo 2, sabe-se que as sequências sinalizadoras encontram-se em duas regiões, uma na região N-terminal (pré-sequência) e outra interna conhecida como *linker*, uma vez que esta conecta as cadeias A e B. O peptídeo sinal N-terminal é responsável pelo direcionamento do precursor para o retículo endoplasmático (RE), enquanto o *linker* é responsável pelo posterior direcionamento ao vacúolo pela via secretória (78, 79, 101). Ambas as sequências são removidas durante o processamento pós-traducional da proteína e, portanto, estão ausentes na forma madura e ativa da proteína. Quando a estrutura primária da soRIP foi analisada em relação àquela da preproricina (Figura 2.9), observou-se que a soRIP apresentava uma região

N-terminal com alta similaridade à sequência da ricina. Segundo a predição feita no programa *Signal P* (102) o sítio mais provável de clivagem do peptídeo sinal da ppsorIP se encontraria entre os resíduos Alanina 32 e Serina 33 da sequência PALA/SEN. Como descrito para a grande maioria das RIPs tipo 2, o peptídeo sinal da soRIP é constituído de cerca de 35 resíduos, 26 dos quais são responsáveis pelo direcionamento ao RE (103) enquanto os 9 resíduos restantes são considerados espaçadores entre a cadeia A e o peptídeo sinal (96). Existe uma exceção à regra, no caso da proteína LECIRAb (RIP tipo 2 isolada da monocotiledônea *Iris holandrica*), na qual esta região é constituída de 44 resíduos (35). Vale destacar aqui que o número de resíduos no peptídeo sinal da soRIP difere em apenas um em ricina, abrina e pulchellina (34 resíduos nestas), o que dá suporte ao primeiro ATG ser realmente o códon de iniciação escolhido.

As proteínas vacuolares como a ricina e outras RIPs tipo 2 são sintetizadas no retículo endoplasmático e logo direcionadas para o vacúolo através da via secretória da célula. Há três tipos diferentes de sequências sinalizadoras identificadas para o vacúolo: as localizadas na extremidade N- ou C-terminal da proteína e as sequências internas. Todas elas têm em comum a presença do motivo conservado NPIXL ou NPIR (104, 105). A sequência *linker* encontrada nas RIPs tipo 2 descritas até hoje tem a particularidade de serem um dos raros exemplos Jolliffe (79, 101) de proteínas vacuolares com a sequência sinal localizada internamente, separando as cadeias A e B. A sequência consenso encontrada nelas (LLIRP) é semelhante à sequência consenso acima citada (104, 105). Em ambas, a presença do resíduo isoleucina é condição “*sine qua non*” para o efetivo direcionamento da proteína para a dita organela, podendo apenas ser substituído por uma leucina (104). De fato, tem sido demonstrado que a ausência deste resíduo na ricina provoca a sua secreção ao invés de sua acumulação dentro do vacúolo (101). Como pode ser observado na figura 2.9, a soRIP apresenta este motivo protéico na sua sequência. Porém, na soRIP esta sequência de aminoácidos é mais extensa do que os apenas 12-15 resíduos normalmente encontrados separando as cadeias A e B. Esta maior extensão também foi encontrada nas proteínas LECIRA b (mencionada anteriormente), Ript (isolada da monotiledônea, *Polygonatum multiflorum*) e Cinamomina (de *Cinnammina canfora*), mas não há referência sobre a sua relação com a função do *linker*.

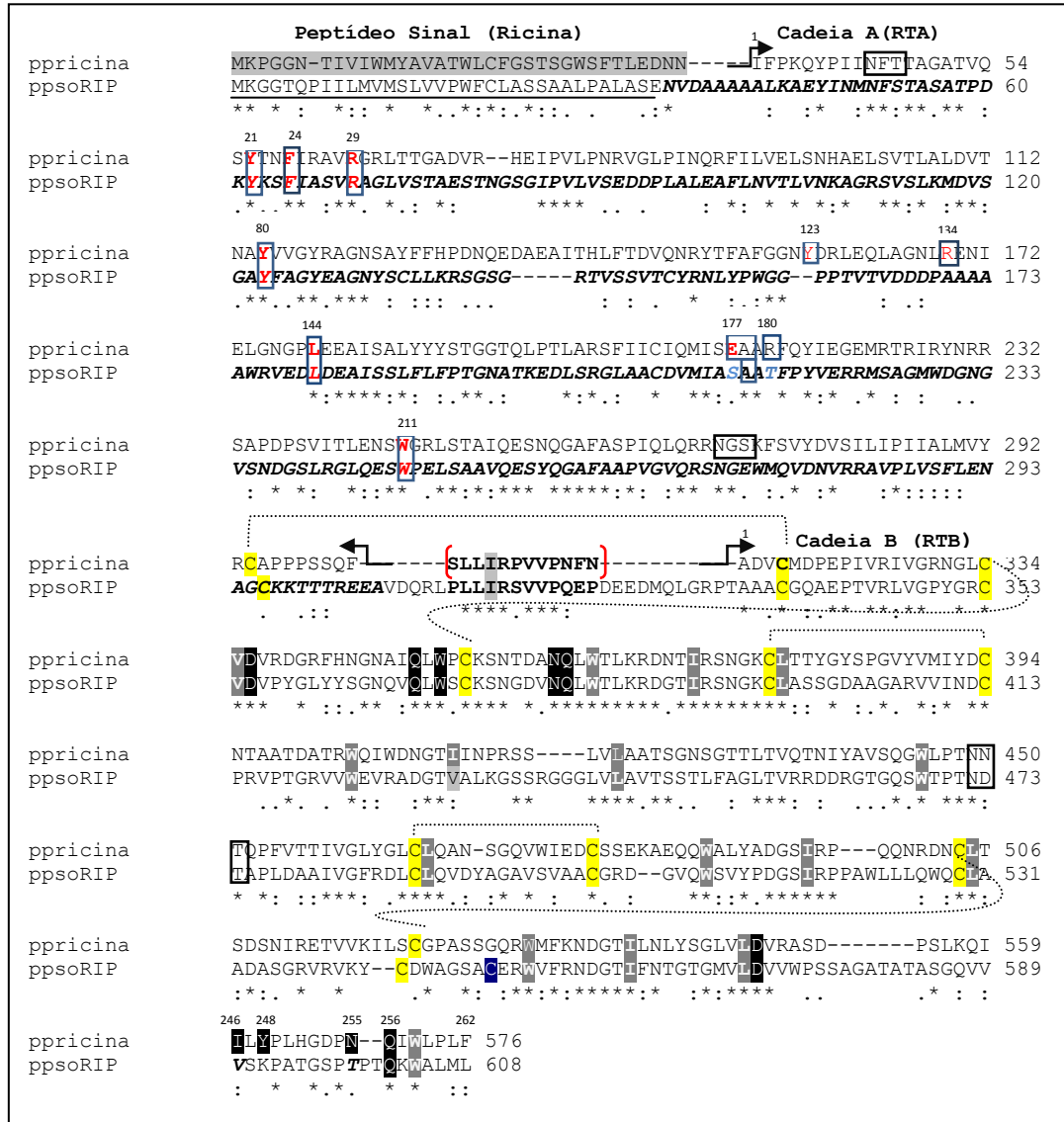


Figura 2.9 - Alinhamento da sequência de aminoácidos das formas imaturas da ricina (ppricina:código P02879) e da soRIP . Destacam-se as principais características presentes nas RIP tipo 2: o peptídeo sinal N-terminal (sombreado cinza), a cadeia A (RTA), a sequência *linker* (entre colchetes vermelhos) e a cadeia B (RTB) ou lectínica. Os resíduos conservados do sítio ativo na cadeia A estão indicados com quadrado azul (vide detalhes no texto). A isoleucina conservada do linker se mostra em cinza. As cisteínas (destacadas em amarelo) e as respectivas ligações dissulfeto (intra e intercadeia) estão representadas por linhas tracejadas. Em azul destaca-se o resíduo de cisteína adicional na soRIP (ausente na RTB e outras RIPs do tipo 2). Resíduos conservados da cadeia B que formam o core hidrofóbico são mostrados em cinza, enquanto os responsáveis pela ligação ao açúcar são mostrados sombreados de preto e letras em branco. Os sítios de glicosilação em ambas as cadeias estão destacados em quadros pretos. Note que tanto na cadeia A quanto na B da soRIP existem mutações em alguns dos resíduos que determinam a função de cada cadeia. O alinhamento foi realizado com o programa ClustalW (90) e com os parâmetros predefinidos pelo programa. Na margem direita da figura enumeram-se os resíduos para ambas as proteínas, segundo a sequência completa de cada uma. A numeração supra sequencial indica a posição dos resíduos na RTA e RTB, na forma madura e ativa da proteína. A sequência da cadeia A da soRIP está em negrito itálico. Sublinhado está a região provável de clivagem predita pelo programa SignalP.

2.5.3.2 Cadeia A da soRIP (soRIPA)

Logo que foi deduzida a sequência de aminoácidos da soRIP na forma imatura, ppsorIP, foi necessário determinar a sequência correspondente à cadeia A para a sua subsequente clonagem e produção recombinante. O fato de não ter sido viável o isolamento da proteína diretamente da planta, tornou necessária a determinação deste domínio pela análise comparativa da sequência, considerando o tamanho esperado para a cadeia A (~29-30 kDa) e a identidade sequencial apresentada com a RTA. Assim, foi definida a cadeia A da soRIP, soRIPA, como a sequência de aminoácidos compreendida entre os resíduos 34 e 305 (mostrados em negrito e itálico na figura 2.9), produzindo uma cadeia polipeptídica de 272 resíduos, com massa molecular aproximada de 30 kDa.

As cadeias tóxicas das RIPs apresentam a particularidade de estarem relacionadas entre si do ponto de vista estrutural e funcional, ao mesmo tempo que variam muito na sua sequência de aminoácidos. De fato, a identidade sequencial de membros evolutivamente distantes chega a ser de 20-30%. Dentro desta porcentagem estão os resíduos invariáveis que formam o sítio ativo. Tomando com referência a ricina (RTA), os resíduos comuns a todas as RIPs são: Y 21, F 24, R 29, Y 80, Y 123, E 177, R180 e W 211, sendo Y80 e 123, E 177, R180 e W211 os resíduos localizados no sítio ativo, os quais interagem com o nucleotídeo Adenina durante a reação de depurinação. Considerando isto, foi surpreendente observar que no caso da soRIP, apesar da similaridade significativa com a ricina (~50 % de similaridade entre ambas cadeias A), os resíduos chave do sítio ativo não se mostraram completamente conservados (figura 2.9).

A importância de cada resíduo na atividade depurinadora tem sido extensamente estudada nas RIPs. Estudos de mutagênese sítio dirigida com a RTA mostraram que a substituição da Y80 por uma fenilalanina diminuía em 15 vezes a atividade depurinadora desta proteína, enquanto que a substituição por serina levava a um decréscimo de 170 vezes. Dentre as mais de 360 RIPs descritas até hoje, apenas na Caribdina (RIP tipo1) há uma Valina naturalmente substituindo à tirosina no sítio ativo, o que explicaria a sua relativa baixa atividade depurinadora (106). Já com uma mutação na tirosina 123 na RTA e na SO6 (saporina) por uma valina a redução da atividade foi menos drástica (23). Segundo o alinhamento comparativo feito com a soRIPA e RTA, na posição relativa a Y123 há uma deleção.

Outros estudos de mutagênese sítio dirigida com a RTA e a SO6 permitiram analisar e determinar a importância dos outros 2 resíduos do sítio ativo, a Glutamina (176/177 na SO6/RTA) e a Arginina (179/180 na SO6/RTA). Como observado nas estruturas cristalográficas das proteínas em questão, estes resíduos são responsáveis pela ligação e estabilização do nucleotídeo Adenina no sítio ativo. Portanto, a mutação de qualquer um deles aboliria completamente a atividade das proteínas. Interessantemente, foi demonstrado que o mutante da SO6, E176A, teve sua atividade diminuída 20 vezes em relação à proteína nativa, já no mutante R179A o decréscimo foi de 200 vezes (107, 108). Ao analisar a estrutura primária da soRIPA, observou-se nestas posições substituições semi-conservativas e não conservativas, isto é, a mudança para uma Serina (polar neutro) no lugar do Glutamato (ácido) e uma Treonina (polar neutro) substituindo a Arginina (básico). Após esta análise comparativa inicial, não seria surpreendente pensar que a soRIPA tivesse a função depurinadora comprometida. De qualquer modo, é interessante entender como estas mutações surgiram e qual seria sua implicância na função como um todo desta RIP.

As mutações relatadas para a RTA assim como para as outras RIPs tipo 1 demonstram uma diminuição da atividade mas que nunca chegou a ser 100%. Estas observações levaram os pesquisadores a pensar que mesmo mutado, o sítio ativo poderia conter resíduos adicionais que atuariam como substitutos ou resíduos *back-up*, cumprindo a função do resíduo mutado. Tal suposição foi demonstrada para a RTA e a SO6 por exemplo onde o resíduo Glutamato, vizinho ao sítio mutado, ocupa a posição do seu par suprimindo e mantendo em parte a atividade depurinadora. No caso da RTA o resíduo responsável seria o Glutamato 208, enquanto que na SO6, se localiza na posição 205.

Com estas observações, portanto, duas hipóteses foram traçadas para a soRIP: a primeira seria que esta proteína não apresentaria atividade devido as mutações ocorridas ou, uma segunda alternativa, seria a soRIP apresentar algum tipo de atividade, sendo esta possível pela presença de outros resíduos próximos ao sítio ativo. Esse tema será discutido posteriormente.

2.5.3.3 Cadeia B da soRIP (soRIPB)

A cadeia B das RIPs tipo 2 (como a RTB) é constituída por dois domínios homólogos (do tipo β -*trefoil*), cada um contendo um sítio de ligação ao açúcar e cada domínio sendo constituído por 3 subdomínios ($1\alpha/1\beta/1\gamma$ e $2\alpha/2\beta/2\gamma$). Ainda, existem 8 cisteínas conservadas

as quais podem formar ligações dissulfeto intra-cadeia e existe uma cisteína adicional na região N-terminal responsável pela ligação intercadeia com a cisteína localizada na região C-terminal da cadeia A (109-112).

A análise da sequência de aminoácidos correspondente a cadeia B da soRIP (soRIPB) demonstrou ser esta significativamente similar a cadeia B da ricina (RTB). Como mostrado na figura 2.9, a soRIPB compartilha várias das características principais que definem o domínio do tipo lectina. Para ajudar na interpretação deste resultado um esquema representativo da cadeia B da ricina e da soRIP é mostrado na figura 2.10.

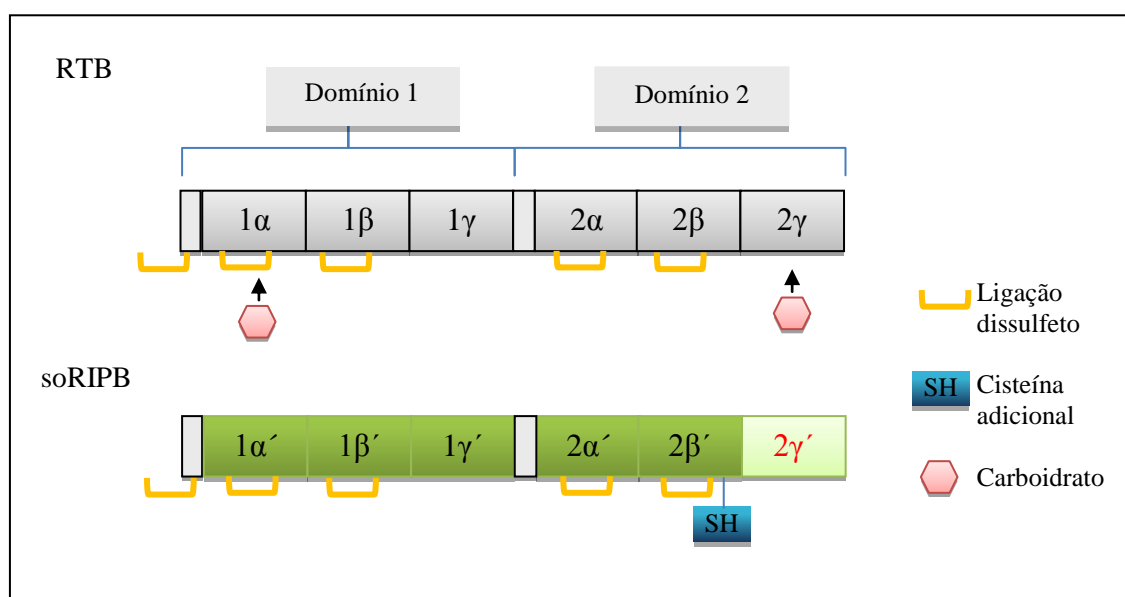


Figura 2.10 - Esquema representando as cadeias B da ricina (RTB) e da soRIP (soRIPB) e as características principais que as definem. Os dois domínios que compõem a cadeia B estão indicados, sendo que cada um é composto por três subdomínios homólogos (α , β , γ na RTB e α' , β' , γ' na soRIPB). Na soRIPB há uma cisteína adicional no subdomínio $2\beta'$, ausente na RTB. As outras cisteínas encontram-se conservadas entre elas (e mostradas formando a ligação dissulfeto). Os resíduos do primeiro sítio de ligação a carboidrato ($1\alpha/\alpha'$) estão conservados em ambas proteínas, enquanto o segundo ($2\gamma'$) na soRIPB apresenta modificações importantes em relação ao da RTB.

Em termos gerais, a soRIPB mostra uma similaridade significativa com os dois domínios de ligação a carboidratos da RTB. Os resíduos responsáveis pela formação do *core* hidrofóbico na RTB (e altamente conservados dentre os outros membros do tipo) (113) estão conservados também na soRIPB (resíduos mostrados em fundo cinza, na figura 2.10) com exceção de um resíduo: uma Valina substitui uma Isoleucina na posição 98 da RTB. Portanto, pode-se sugerir que a estrutura terciária da soRIPB seja similar a da RTB.

As posições referentes as oito cisteínas envolvidas nas ligações dissulfeto intra-cadeia estão conservadas na soRIPB, localizando-se dois pares em cada domínio, especificamente, 1 par por cada subdomínio α e β respectivamente. Na região N-terminal da soRIPB encontra-se a cisteína provavelmente envolvida na ligação intercadeia.

É importante destacar as diferenças encontradas em relação a RTB que poderiam refletir numa diferença nas propriedades bioquímicas-estruturais da proteína. Uma delas é a presença de um resíduo de cisteína adicional (sendo assim 10 cisteínas no total da cadeia B), este não presente na RTB. Um resíduo de cisteína adicional tem sido observado em algumas RIPs, isoladas de *Sambucus sp*, como é a SNAI que é tetramérica e a cisteína adicional é a responsável pela ligação dissulfeto entre os dois heterodímeros (A-B-s-s-B-A) (109, 114-116). Interessantemente estas RIPs tipo 2 tetraméricas especificamente ligam resíduos de N-Acetilneuroamínico (Neu5Ac(α , 2-6) Gal/GalNAc) (115, 117). Este fato tem sido documentado apenas para estas proteínas e é diferente de outras RIP tipo 2, as quais ligam resíduos Galactose (Gal) ou N-Acetil-D-galactosamina (GalNAc) ou ambos (109). Ainda na soRIP os resíduos responsáveis pela especificidade ao açúcar, localizados no segundo domínio da RTB, aparentemente estão mutados (figura. 2.9). Dois dos cinco resíduos responsáveis pela formação do segundo sítio de ligação ao carboidrato (subdomínio $2\gamma'$) sofreram mutações, sendo que no lugar de Y (248, na RTB) tem-se um K, e ao invés de N255, há uma Treonina. A divergência apresentada neste segundo sítio da soRIPB poderia determinar se há ou não ligação da proteína ao substrato.

Mutações ocorridas naturalmente no segundo sítio de ligação têm sido evidenciadas em alguns representantes da família RIPs. Por exemplo, na Cinammonina há uma substituição da His581 pela N255 da RTB, introduzindo uma carga positiva no subdomínio 2γ (118). Similarmente, na RCA (*Ricin agglutinin*), uma variante tetramérica da ricina (subunidades não covalentemente ligadas entre si), foi observado que no segundo subdomínio também uma Histidina (His 550) aparece substituindo a Tirosina (Y248). Estudos mutacionais com esta proteína tem demonstrado que a mutação pontual desta tirosina é responsável pela baixa atividade lectínica da RCA, o que deve refletir também em sua baixa citotoxicidade (119). Observando a soRIP é possível verificar que as substituições foram do tipo não conservativas e em vez da Tirosina (polar aromático) há uma Lisina (básica) e no lugar da Asparagina (ácido) há uma Treonina (polar). Sumarizando, tais modificações de uma forma geral devem contribuir para a inatividade da soRIP ou pelo menos para uma atividade diminuída em relação à ricina. Deve-se considerar também a possibilidade da soRIP ser membro de uma nova classe de RIPs tipo 2 não-tóxicas.

2.5.3.4 Determinação da presença de introns no gene *sorip*.

Os genes pertencentes a organismos eucariotos se caracterizam principalmente pela presença das sequências codificantes (exons) separadas por sequências não codificantes (introns), as quais são processadas e eliminadas durante a transcrição e maturação do RNAm. De modo geral, os genes codificantes para as proteínas RIPs, no entanto, compõem uma família caracterizada pela ausência de introns. Assim, para verificar a ausência de introns no gene *sorip*, uma PCR com os *primers* específicos para amplificar a ORF completa deste gene foi realizada utilizando o DNA genômico como molde. O resultado deste experimento permitiu confirmar que o gene *sorip* não contém introns, já que o produto amplificado a partir do DNA genômico tem um tamanho de 1,9 kb (figura 2.11), coincidente com o tamanho de sua ORF. O produto amplificado foi clonado no vetor pGEM-T e sequenciado posteriormente, confirmando a sequência esperada para a ORF. Na figura observa-se a presença de duas bandas de tamanho aproximado de 250 pb, indicativo de amplificação inespecífica. Em PCR, este fenômeno poderia representar versões truncadas do amplicon desejado devido a formação de estruturas secundárias complexas (em DNA com alto conteúdo de G-C) o que impedem a síntese do mesmo prosseguir normalmente (120). Nós utilizamos DMSO com o intuito de evitar a aparição destas bandas e o resultado mostrado aqui foi a melhor condição encontrada. Considerando que o fragmento desejado foi isolado do gel este resultado mostrou-se satisfatório.

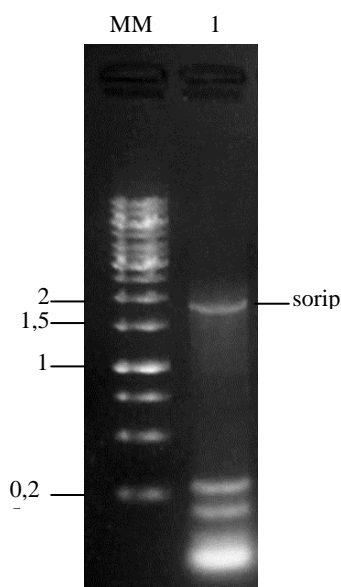


Figura 2.11 - Resultado da amplificação por PCR do gene *sorip* a partir do DNA genômico extraído da cana-de-açúcar (folha). MM, marcador de peso molecular 1kb (fermentas), 1, produto de amplificação

2.5.5 Identificação de representantes homólogos da soRIP na família *Poacea*

Uma vez caracterizado o gene *sorip* e frente a tantas divergências observadas quando comparado às RIPs tipo 2 típicas, surgiu a questão se estas alterações seriam apenas uma exceção dentro das RIPs e assim sendo, um caso pontual. Durante o desenvolvimento do projeto outras espécies relacionadas à cana-de-açúcar e pertencentes à família *Poacea* (gramíneas) tiveram seus genomas sequenciados e disponibilizados nos bancos de dados públicos (NCBI). Isto permitiu realizar novas buscas por homólogos a soRIP nesses bancos, visando estabelecer as relações evolutivas destas com o resto das RIPs caracterizadas até hoje. Assim, foram identificadas outras três representantes nos genomas das espécies *Zea mays* (milho), *Sorghum bicolor* (sorgo) e *Phyllostachys edulis* (bambu). Nenhum representante com alta identidade à soRIP foi encontrado na espécie *Oryza sativa* (arroz), embora recentemente uma análise genômica extensiva feita nesta espécie tenha identificado mais de 30 transcritos codificantes para RIPs tipo 1 (121). Em princípio isto poderia indicar que as RIPs tipo 2, semelhante a soRIP, não estariam presentes em toda a família de gramíneas.

Dos três novos representantes homólogos da soRIP, o representante em bambu teve a menor identidade sequencial relativa com a ricina (tabela 2.4). As sequências foram nomeadas seguindo a nomenclatura usada anteriormente para a representante de cana-de-açúcar, isto é, ZmRIP, SbRIP e PeRIP, para cada uma das proteínas encontradas nas espécies mencionadas anteriormente (vide alinhamento em anexo) e adicionando o prefixo “pp” para indicar a forma imatura.

A análise comparativa destas sequências com a de ricina permitiu verificar que as mutações observadas na soRIP ocorrem também nos pares homólogos de milho, sorgo e bambu (ver alinhamento anexo). Considerando que nenhuma outra ocorrência do tipo foi documentada em outra família vegetal, pode-se supor que estas RIPs tipo 2 “atípicas” podem ocorrer apenas dentro da família *Poacea*.

Tabela 2.3: Novas sequências homólogas à soRIP e a Ricina.

Esécie	Nome/Identificação	Tipo de sequência	Número de Aminoácidos	Identidade vs soRIP	Identidade vs RICINA
<i>Zea mays</i> ^(122, 123)	ppZmRIP/ gb AC226207.2	HTG (DNA genômico)	593	76 %	36%
<i>Sorghum bicolor</i> ⁽¹²⁴⁾	ppSbRIP/ XM_002459548.1	cDNA completo	618	83 %	34%
<i>Phyllostachys edulis</i> ⁽¹²⁵⁾	ppPeRIP/emb FP095862.1	cDNA completo	591	44 %	43%

Recentemente e antes da finalização deste trabalho, foi reportado um novo estudo filogenético das RIPs, também baseado nas informações de sequências codificantes disponíveis nos bancos de dados públicos e, similarmente aos nossos resultados, foram encontradas as RIPs tipo 2 em cana-de-açúcar e milho, além de um representante da espécie de gramínea *Panicum Virgatum* (PanviAB1) (43). Porém, neste trabalho estão publicadas apenas as sequências protéicas destas RIPs, sem menção ao código de referência para o gene ou transcrito, dificultando uma análise comparativa detalhada. Realizando uma nova busca no NCBI (*tBlastn*) com as sequências protéicas de PanviAB1, foram encontrados diversos transcritos ou EST correspondentes incompletos, os quais poderiam dar origem a estas proteínas. Dentre estes podem ser citados dois clones de cDNA (código de acesso no *Genbank*: FE619869.1 e FL747268.1), cujas respectivas sequências cobrem a maior parte da sequência protéica da proteína PanviAB1.

2.5.6 Clonagem e subclonagem do gene *soripA*

Com o intuito de caracterizar funcional e estruturalmente a cadeia A da soRIP, o fragmento de DNA que codifica esta cadeia foi amplificado por PCR, utilizando *primers* específicos. Como molde, usou-se um dos clones obtidos no SUCEST e/ou cDNA obtido a partir do RNA total extraído de folhas de cana-de-açúcar (figura 2.12.A). O produto de tal

amplificação foi um fragmento de aproximadamente 750 pb (figura 2.12B), o qual foi purificado e clonado no vetor pCR®2.1, sendo nomeado pCR2.1-soripA. Após o sequenciamento e a confirmação da sequência esperada, o DNA de dois clones foi digerido com as enzimas específicas *NdeI* e *XhoI* para a liberação do fragmento (figura 2.12C). Os insertos, após purificação em gel, foram subclonados com sucesso no vetor de expressão pET28a(+) e, posteriormente, confirmados por sequenciamento automático de DNA. A partir destes clones foram realizados os ensaios de expressão da cadeia A da soRIP em *E. coli*.

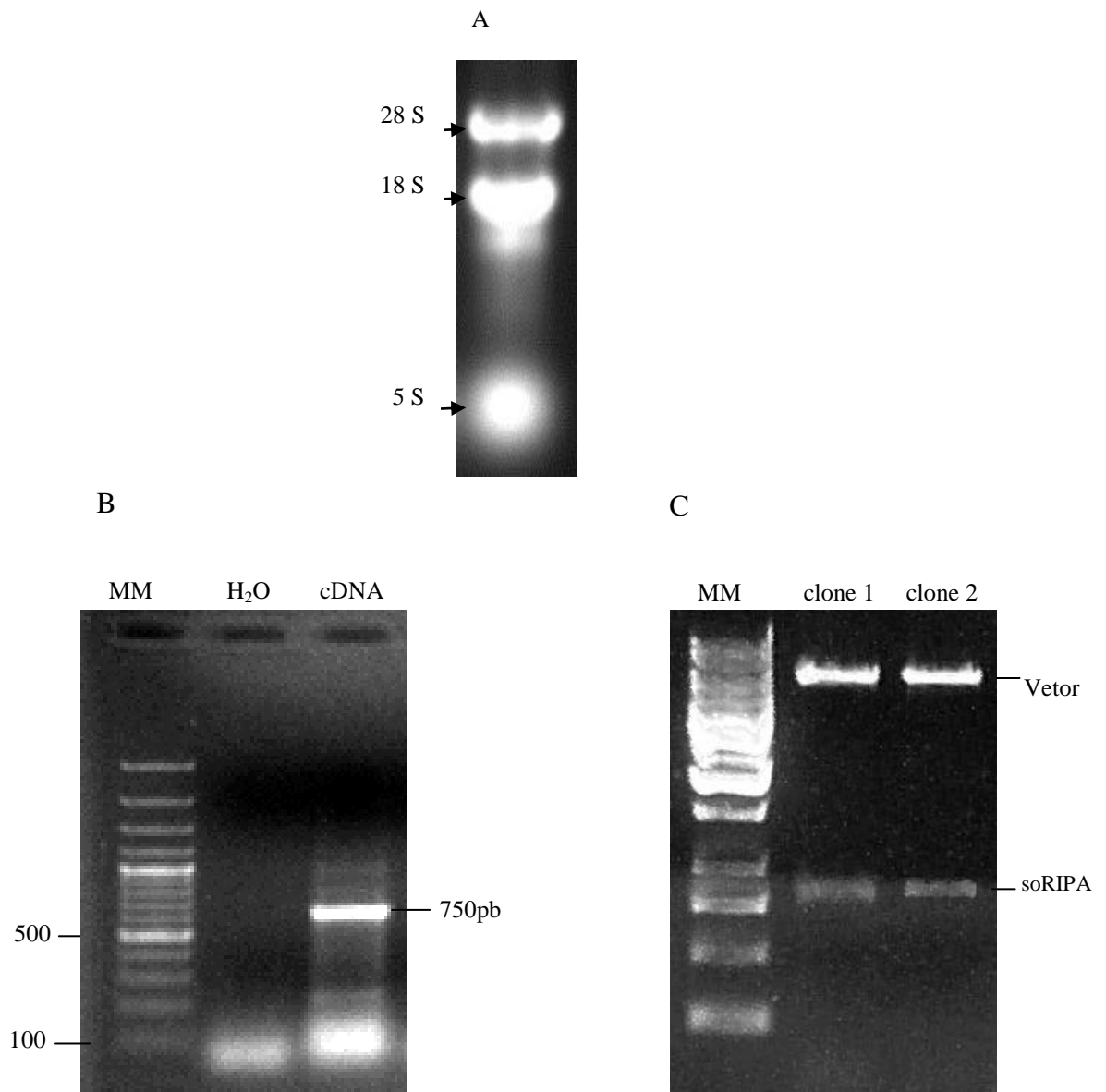


Figura 2.12 - Clonagem do cDNA codificante da cadeia-A de soRIP. A) Análise do RNA total extraído de folhas de cana-de-açúcar. Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando o resultado da extração e a integridade. B) Resultado da PCR para amplificar o fragmento de DNA correspondente a soRIPA (750pb), visualizado em gel de agarose (1%). Como molde foi utilizando o clone sc2 contendo o cDNA parcial (EST) isolado da cana-de-açúcar. Como controle negativo, a mesma reação foi realizada adicionando água em vez do cDNA molde. MM: marcador de molecular (100 pb, Fermentas).C) Análise de restrição de dois clones obtidos depois de clonagem do fragmento amplificado. MM: marcador de peso molecular 1kb plus (fermentas)

2.5.7 Ensaios de expressão e solubilidade da soRIPA em *Escherichia coli*

Após a transformação da linhagem BL21(DE3) de *E.coli* utilizando o plasmídeo pET28-soripA, foram realizados ensaios de expressão e solubilidade da proteína recombinante sob diferentes condições de temperatura (37, 25 e 20 °C), concentração do agente indutor da expressão e o tempo de incubação das culturas após a indução (6h e 16 h). Com esta estratégia de expressão foi possível constatar que a soRIPA recombinante era expressa satisfatoriamente sob todas as condições analisadas. Porém, o teste de solubilidade mostrou que a proteína encontrava-se na fração insolúvel em todas as condições ensaiadas. Na figura 2.13 é mostrada a condição de expressão: indução com 0,1 mM de IPTG, 6 h de incubação, a 20 °C sob agitação constante (200 rpm).

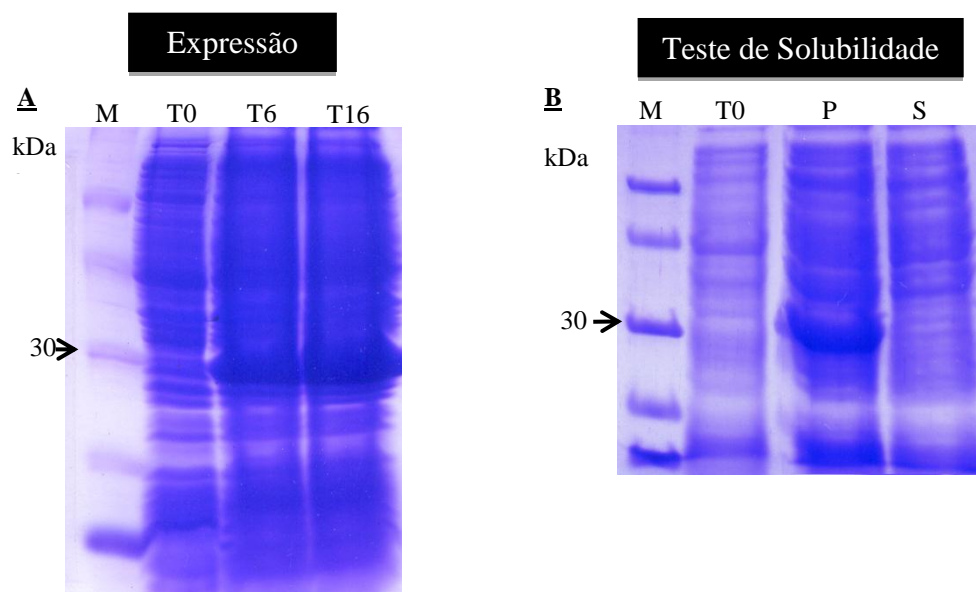


Figura 2.13 - Análise de expressão e solubilidade da soRIPA. SDS-PAGE 15% mostrando os resultados da expressão (A) e do ensaio de solubilidade (B) obtidos para a proteína recombinante soRIPA em *E.coli* BL21(DE3). A) A análise mostrou que a soRIPA foi expressa em níveis semelhantes tanto após 6h (T6) quanto a 16 h (T16) de indução com IPTG (0,1 mM) a 20 °C, como indica a banda de 30kDa (seta). B) Teste de solubilidade, mostrando que após a lise e centrifugação, a banda de 30kDa da soRIPA aparece apenas na fração precipitada (P) e não no sobrenadante (S), indicando que a proteína é insolúvel. Em ambas as figuras T0 representa o tempo inicial da indução da expressão protéica (controle negativo).

Em bactérias a expressão de proteínas recombinantes que estão sob a regulação de promotores fortes (como o promotor T7 do pET28) pode chegar a níveis superiores aos 40% do total de proteínas da célula em poucas horas. Isto geralmente resulta em vantagem na hora

de produzir grandes quantidades da proteína de interesse, mas esta alta produção pode levar a formação de agregados protéicos (intracelulares ou periplasmáticos) conhecidos como corpos de inclusão ou CI (126).

Uma maneira de evitar a formação destes CI (e aumentar a solubilidade da proteína de interesse) pode ser diminuindo a temperatura pós-indução para valores inferiores ao fisiológico e/ou mediante a diminuição da concentração do agente indutor da expressão (127) de maneira tal que a taxa de síntese protéica diminua e, por sua vez, diminuam as chances de formação dos CI. Porém, a formação dos CI pode envolver outros fatores que não podem ser facilmente alterados, como por exemplo a toxicidade ou deficiências no enovelamento da proteína. No caso da soRIP as estratégias para reverter o quadro de insolubilidade mostraram-se ineficazes, sugerindo que a alta expressão *per si* não deva ser responsável pela formação destes CI.

2.5.8 Purificação da soRIPA recombinante

As proteínas que formam parte dos CIs podem ser purificadas mediante a solubilização prévia destes com agentes caotrópicos, tais como a uréia ou cloridrato de guanidina, já que geralmente a proteína recombinante corresponde entre 80-95% dos CIs (128). No presente trabalho, soRIPA contendo a cauda de histidinas (His-tag) foi purificada com sucesso por cromatografia de afinidade em coluna contendo níquel imobilizado e sob condições desnaturantes (6M de uréia). A análise do SDS-PAGE mostrou que a proteína recombinante ligava-se a resina com baixa afinidade, pois sua presença já era detectada durante o passo de lavagem da coluna com tampão sem o imidazol. Com 50 mM (principalmente) ou 100 mM de imidazol, a proteína foi eluída quase por completo.

2.5.9 Reenovelamento da soRIPA e purificação por Cromatografia de Exclusão molecular.

Depois de finalizado o primeiro passo de purificação da soRIPA, esta foi submetida ao processo de reenovelamento por meio da retirada gradual do desnaturante, uréia, como

descrito na metodologia. Durante o processo, amostras foram coletadas (6M, 3M, 0M de uréia), centrifugadas e submetidas a SDS-PAGE para verificar a integridade da proteína. Como mostrado na figura 2.14, após a centrifugação das amostras ainda havia proteína em solução em quantidades suficientes para continuar com o passo seguinte de purificação. Embora existam algumas impurezas nas amostras analisadas, estas são proporcionalmente inferiores em quantidade à proteína de interesse.

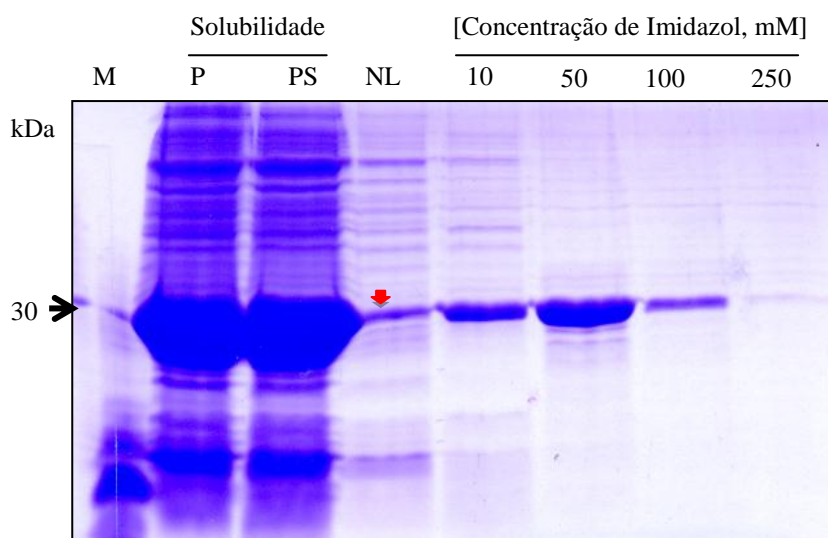


Figura 2.14 - Análise da solubilidade e purificação da soRIPA. SDS-PAGE 15% mostrando a localização da soRIPA na fração insolúvel (P), a solubilização desta fração em presença do agente caotrópico uréia 6M (PS) e o resultado da purificação parcial da proteína por cromatografia de afinidade: NL, fração de proteína não ligada na coluna de níquel; 10-50, representam as diferentes concentrações do eluente em mM (imidazol) utilizadas durante a recuperação da soRIPA. O tampão utilizado durante todo o processo foi Tris-HCl 50 mM pH 8, contendo NaCl 250mM e uréia 6M.

Ao final do processo de renovelamento foi possível observar que grande parte dos agregados observados havia precipitado, fato este comum e portanto esperado durante o processo de renovelamento protéico.

Imediatamente após finalizada a diálise, alíquotas da proteína foram submetidas a mais um passo de purificação através de cromatografia de exclusão molecular (Superdex 75). Como mostrado na figura 2.15, a proteína foi purificada com sucesso, sendo que grande parte das impurezas presentes após a purificação por cromatografia de afinidade foram eliminadas com este passo. O rendimento da soRIPA pura e renovelada foi cerca de 2 mg por litro de cultura, sendo que grande parte de proteína foi perdida durante o processo de renovelamento e posterior cromatografia de exclusão molecular. Porém, as quantidades obtidas foram

suficientes para prosseguir com os ensaios de atividade e análise de estrutura secundária, relatados a seguir.

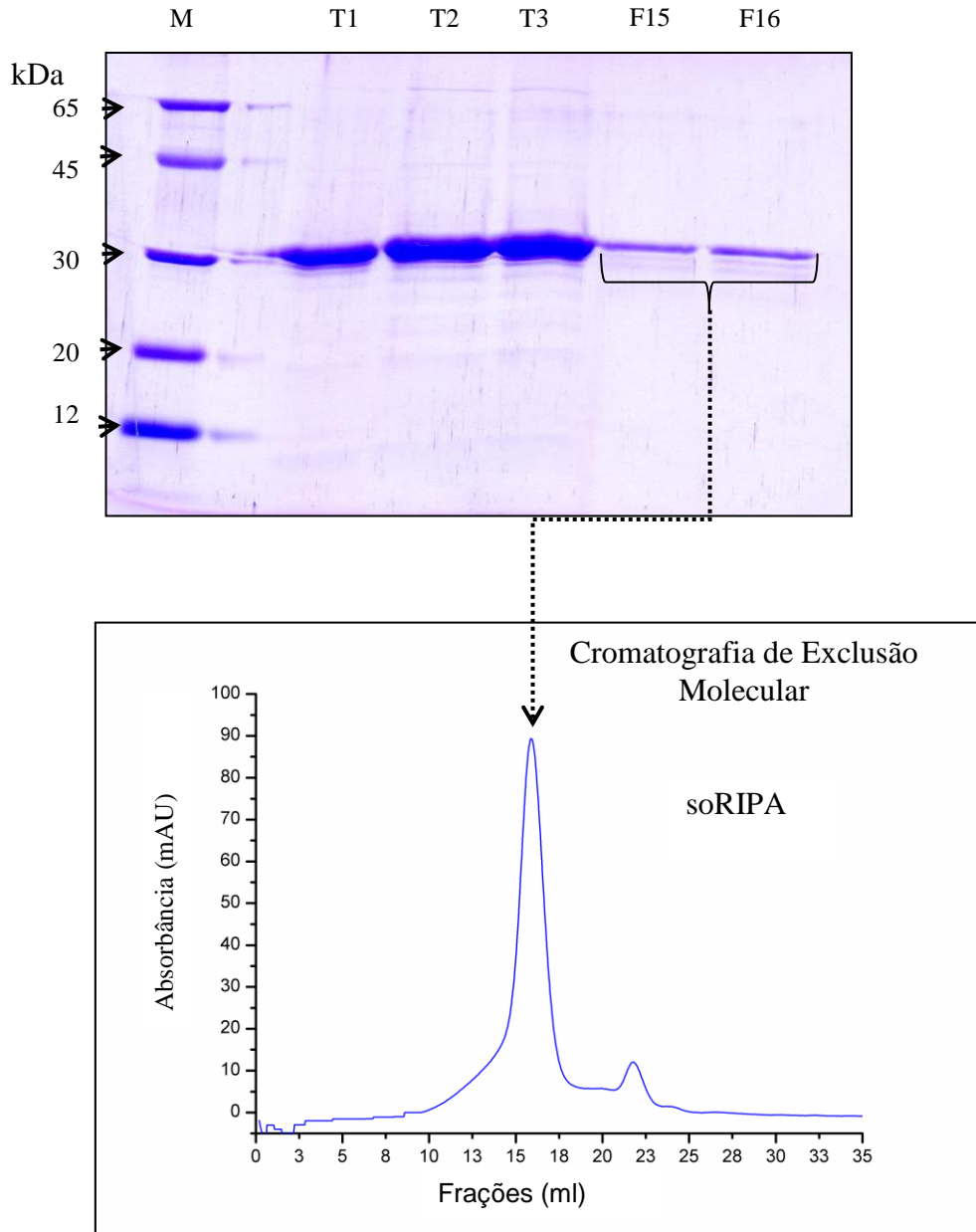


Figura 2.15 - Análise das amostras de soRIPA durante a diálise com concentrações decrescentes de uréia. SDS-PAGE 15% mostrando a soRIPA (amostras sem 2-mercaptoetanol, sem ferver) antes (I) e depois da cromatografia de exclusão molecular (II). Amostras T1, T2 e T3 correspondem às amostras com tampão contendo 6M, 3M e 0M de uréia, respectivamente. F15 e F16 correspondem a duas frações da proteína eluídas durante a cromatografia de exclusão molecular em coluna superdex 75.

2.5.10 Avaliação da estrutura secundária da soRIPA por Dicroísmo Circular (CD)

Como mencionado nos parágrafos introdutórios deste trabalho, a análise da estrutura primária das RIPs mostrou que não há alta identidade entre os diferentes representantes desta família e, de fato, a soRIPA é um exemplo disso, com apenas 32% de identidade com ricina. Por outro lado, sabe-se que esta família de proteínas exibe um alto grau de conservação em nível de estrutura secundária e terciária (129). Uma vez que a proteína foi purificada por cromatografia de afinidade sob condições desnaturantes e posteriormente renovelada, era necessário verificar se a soRIPA apresentava o perfil característico esperado para a estrutura secundária de uma RIP. Assim, o conteúdo de estrutura secundária da soRIPA foi avaliado pela técnica espectroscópica conhecida como Dicroísmo Circular (CD). O espectro da solução de proteína medido após a cromatografia de exclusão molecular permitiu inferir que a mesma exibia um perfil típico de estruturas com conteúdo de hélices α , mostrando dois mínimos em 208nm e 222 nm e um máximo a 195 nm (figura 2.16). É importante salientar que a falta da proteína nativa purificada diretamente da planta (ver discussão posterior) inviabilizou uma análise comparativa com a soRIPA renovelada. Portanto, os resultados de CD são apenas indicativos da presença de elementos típicos de estrutura secundária, mas não permitem avaliar se o enovelamento está correto ou mesmo inferir sobre a atividade da proteína recombinante.

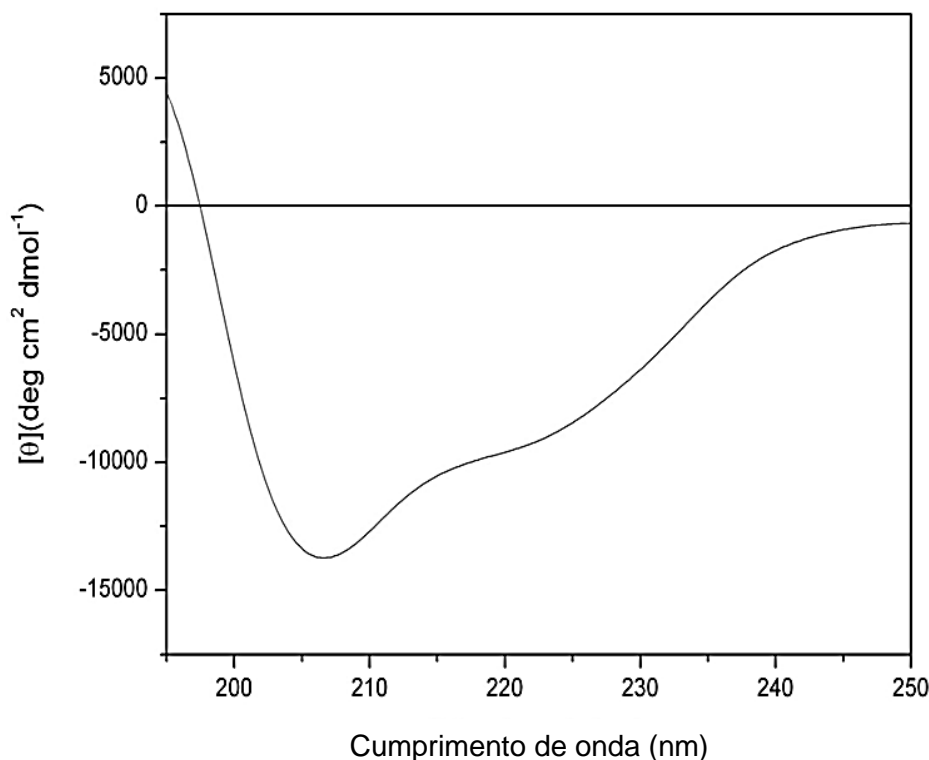


Figura 2.16 - Espectro de CD da soRIPA após a cromatografia de exclusão molecular (F15 e 16 da figura 2.15). As medidas foram realizadas num espectropolarímetro Jasco J-815 (*Jasco Corporation*, Japão), utilizando cubeta de quartzo de 1 mm de caminho óptico. Os espectros foram registrados num intervalo de comprimento de onda de 195 a 250 nm (UV distante), sendo que cada medida representa uma média de 8 varreduras consecutivas através das amostras. As medidas de CD do tampão (Tris-HCl 20mM, NaCl 100mM, pH 7,4) foram utilizadas como branco e todos os espectros de CD foram corrigidos a fim de eliminar ruídos. A concentração de proteína foi de aproximadamente 0,1 mg/ml e as medidas foram realizadas a 20 °C.

2.5.11 Ensaio da atividade da SoRIPA recombinante *in vitro*

Apesar do baixo rendimento obtido para a soRIPA sob as condições experimentais usadas, o grau de pureza e as concentrações finais obtidas foram suficientes para realizar os ensaios de atividade. Dentre os diferentes ensaios existentes *in vivo* e *in vitro* para se determinar a atividade específica das RIPs (RNA-*N*-glicosilase), foram escolhidos dois ensaios *in vitro*: o ensaio de inibição da síntese protéica em um sistema livre de células e o ensaio de depurinação de ribossomos isolados de hepatócitos de rato. A ausência da cadeia B (lectina) restringe a avaliação da atividade *in vivo*, pois a cadeia A tóxica perde seu acesso facilitado à célula por meio da cadeia B.

2.5.11. 1 Inibição da síntese protéica em sistema “livre de células”

Para este ensaio foi usado o sistema acoplado de transcrição-tradução (*in vitro*) do kit TNT® Coupled Reticulocyte Lysate Systems TNT (promega), o qual oferece a vantagem de acoplar o processo de transcrição gênica ao da síntese protéica sem a necessidade de utilizar células em cultura. Se a proteína de interesse exercer atividade inibitória da síntese protéica, esta atividade será evidenciada pela diminuição da intensidade de luz gerada pela proteína repórter Luciferase (130, 131).

Segundo os valores de emissão de luz medidos durante a reação em presença da soRIPA, em concentrações de 1nM, 12nM, 8 μ M e 120 μ M, foi constatado que a proteína possuía uma atividade inibitória relativa muito baixa quando comparada com a pulchellina, a qual apresentou quase 100% de inibição numa concentração de 25 nM da proteína (figura 2.17, coluna 1). Porém, é possível identificar uma redução da atividade de síntese (redução da luminescência) dependente da concentração da soRIPA, sugerindo que exista uma baixa atividade enzimática.

As RIPs apresentam certa variação da sua potência de inativar a síntese protéica *in vitro*, mas esta diferença mostra valores de concentração que vão da ordem de picomolar (pM), como é o caso das RIPs tipo I, SO6 e PAP (132) à nanomolar (nM), como a ricina e pulchellina. No caso da soRIPA, os valores indicam certo nível de inibição na ordem de μ M, sendo apenas comparável com os valores obtidos para os mutantes sintéticos da ricina, cujos resíduos envolvidos na atividade depurinadora foram mutados. Para confirmar estes resultados o passo seguinte foi determinar a atividade de depurinação de ribossomos pelo método descrito por Endo (17) e modificado por Ayub (94), na presença de ribossomos intactos isolados de fígado de rato.

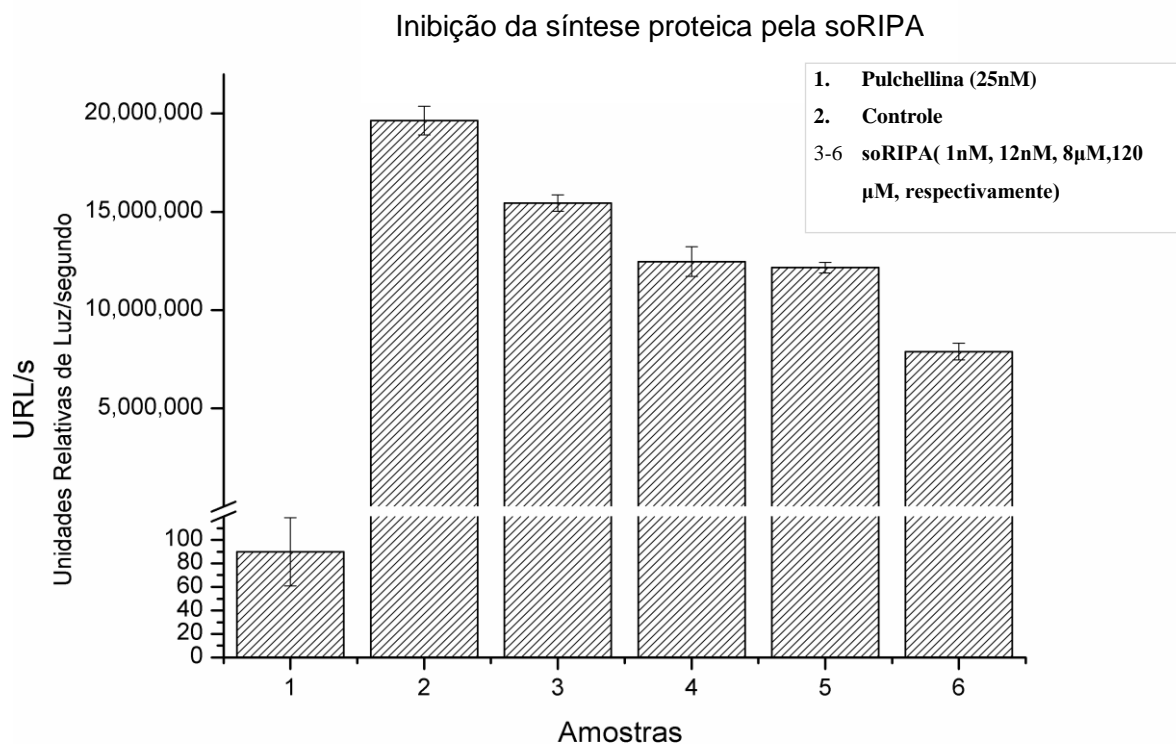


Figura 2.17 - Ensaio de inibição da síntese proteica da soRIPA em extrato livre de células (TNT® *Coupled Reticulocyte Lysate System-Promega*). Na ausência da soRIPA (coluna 2, controle positivo da síntese proteica) o gene repórter luciferase é expresso e a sua atividade pode ser quantificada em URL/s (unidades relativas de luz por segundo, emitidas pela reação catalisada pela luciferase). Segundo as condições do ensaio *in vitro*, a soRIPA (colunas 2-6) tem uma atividade inibitória muito baixa quando comparada com a pulchellina (coluna 1, 25 nM de pulchellina na forma reduzida, usada como controle positivo da inibição da síntese).

2.5.11.2 Ensaio de depuração de ribossomos de rato

Para verificar e comparar a atividade inativadora de ribossomos da soRIPA, ensaios *in vitro* de depuração do rRNA foram realizados utilizando como substrato ribossomos de hepatócitos de rato. Após tratamento com anilina acética, a liberação do fragmento “Endo” (17) da subunidade ribossomal é indicativo da atividade depurinadora da proteína sobre os ribossomos. Este ensaio foi realizado em colaboração com o grupo do Dr. Ayub M, do Departamento de Bioquímica e Ciências Biológicas do *Instituto Multidisciplinario de Investigaciones Biológicas de San Luis - IMIBIO-SL-CONICET*, San Luis, Argentina como parte de um estudo bioquímico filogenético entre várias RIPs, dentre elas a soRIPA. Segundo

o resultado do ensaio anterior, a proteína apresentou alguma atividade inibitória quando grandes quantidades da proteína foram utilizadas, portanto esta inibição deveria ser atribuída à atividade depurinadora da soRIPA. O ensaio de depuração teve o objetivo de confirmar esta hipótese. Porém, após incubar a proteína com concentrações na ordem de μM com os ribossomos, ainda não foi possível verificar atividade RNA *N*-glicosilase para a soRIPA frente a ribossomos de eucariotos (Figura 2.18) por este ensaio.

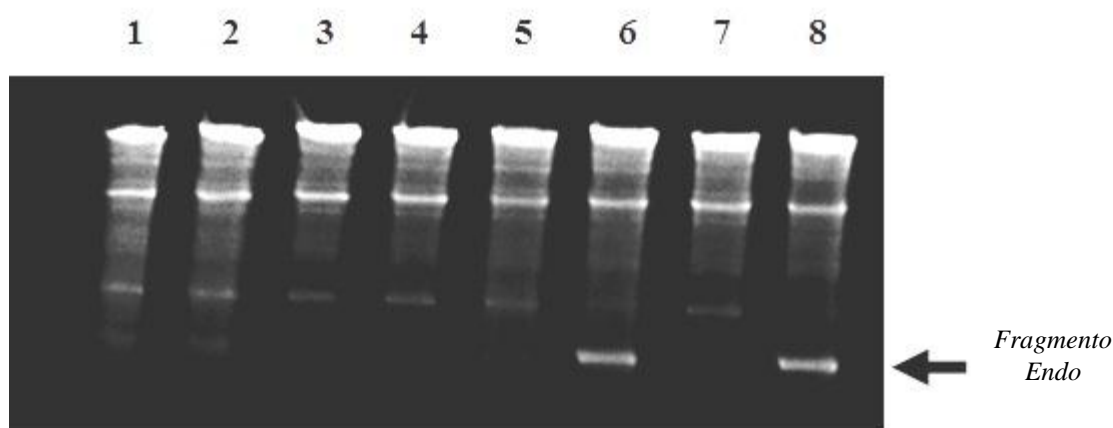


Figura 2.18 - Ensaio de depuração de ribossomos de rato. Gel de poliacrilamida-uréia mostrando o resultado do ensaio de depuração de ribossomos de rato na presença da soRIPA (100 μM) (coluna 7), TCS (coluna 6) e rPAC (cadeia A da pulchellina) reenovelada (coluna 8). Note que a presença do fragmento Endo (após tratamento com anilina) é detectado apenas nos controles positivos, na presença da TCS e rPAC, enquanto que este fragmento não aparece na presença da soRIPA. As colunas 1-5 correspondem aos controles negativos, sem o tratamento com anilina. A seta indica o fragmento de Endo liberado quando o ribossomo foi depurinado.

2.5.11.3 Purificação da proteína soRIP nativa a partir do extrato bruto (EB) de folhas de cana

Considerando os resultados referentes a produção da proteína recombinante e os ensaios de atividade posteriores, surgiu a necessidade de obter a proteína na sua forma nativa, isto é a proteína expressa em cana-de-açúcar. Segundo a análise *in silico*, a soRIP poderia ser purificada em princípio pela afinidade de sua cadeia B por açúcares, semelhante a outras RIPs do tipo 2. Para atingir este objetivo foram utilizados dois protocolos distintos de obtenção do EB extraído da folha da cana-de-açúcar (ver materiais e métodos ponto 2.4.16 e

2.4.17) para ser aplicado em uma coluna de afinidade por D-galactose (ponto 2.4.18). Em ambos os casos o resultado final foi insatisfatório, não sendo possível purificar a proteína nativa mesmo após o processamento de grandes quantidades de material vegetal. Este resultado negativo pode ser analisado considerando vários fatores relacionados aos protocolos de extração utilizados e por fatores inerentes à proteína analisada.

Sabe-se que a preparação da amostra (EB) é um ponto crucial na obtenção de proteínas para análises bioquímicas e ou proteômicas, principalmente quando se trata de material de origem vegetal. A extração protéica de tecido vegetal muitas vezes torna-se uma tarefa complicada devido à complexidade e variedade de compostos e metabólitos secundários, como compostos fenólicos e polifenólicos, presentes nos extratos (133). A extração de proteínas em geral depende da qualidade da fragmentação da amostra e, em ambos os protocolos utilizados, o material foi pulverizado em nitrogênio líquido para minimizar qualquer tipo de degradação protéica. A precipitação de proteína com TCA é um dos protocolos mais utilizados para este tipo de procedimento (134), pois permite concentrar as proteínas e ajuda a eliminar compostos contaminantes presentes na amostra. Porém, durante a aplicação do mesmo para cana-de-açúcar, foi necessário lavar várias vezes o precipitado resultante a fim de eliminar o excesso de TCA, extendendo a duração do protocolo. Como é sabido, o TCA apresenta um pH altamente ácido, o que pode ter levado à modificação da estrutura ou mesmo a degradação da proteína de interesse (134). Outro fator importante a ser considerado é o fato da cana-de-açúcar, assim como outras espécies relacionadas, apresentarem um baixo teor protéico, principalmente nas folhas. Considerando a composição fibrosa da planta não foi possível processar outro tecido a não ser as folhas. Finalmente, outro fator importante está relacionado à purificação da proteína. É possível que a soRIPA exiba uma baixa afinidade pela galactose, já que alguns dos resíduos da cadeia B responsáveis pela ligação ao açúcar estão mutados quando comparados com ricina, o que teria impedido a eficiente ligação da soRIP na coluna não permitindo sua purificação.

2.6 CONCLUSÕES e CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste capítulo foram mostrados os resultados da busca de novas sequências codificantes de RIPs nos bancos de dados genéticos públicos. Neste contexto, quatro novas

RIPs do tipo 2 putativas foram identificadas em quatro espécies de monocotiledôneas de importância comercial, *Saccharum officinarum*, *Sorghum bicolor*, *Zea mays* e *Phyllostachys edulis*. Estes 4 novos integrantes da família RIPs apresentaram características únicas que as distinguem dentre os outros membros das RIPs tipo 2. Analisando as estruturas primárias destas novas proteínas ficou evidente que as mutações ocorridas nas sequências (referentes as regiões conservadas entre as demais RIPs tipo 2) podem perfeitamente se refletir em alterações nas suas funções.

Visando compreender o papel funcional de tais alterações, o representante de cana-de-açúcar foi escolhido para uma análise experimental, a qual foi iniciada com a clonagem da cadeia A da proteína, produção heteróloga, purificação e caracterização. O fato da proteína requerer o renovelamento por ser produzida em forma insolúvel deve ser considerado, pois a atividade depurinadora pode ter sido comprometida pelo incorreto e/ou incompleto renovelamento, tornando a análise mais difícil.

A purificação da proteína nativa certamente seria a chave para esclarecer tais questões, porém este objetivo não foi atingido durante este trabalho. As tentativas frustradas de purificação da soRIP nativa poderiam ser atribuídas a ausência da síntese da proteína ou, ainda, a ausência de sítios de ligação à galactose funcionais na cadeia B. A presença dos transcritos no banco do SUCEST sugere que estes genes não sejam pseudogenes. Porém, a proteína pode estar sendo traduzida, mas sofrendo um rápido *turnover*, tornando difícil a sua detecção e purificação.

De qualquer forma, as alterações nos sítios de ligação ao carboidrato podem provavelmente ser responsáveis por impedir a purificação da proteína por cromatografia de afinidade. Assim, novas abordagens deveriam ser traçadas para purificação da soRIP que não dependessem da cromatografia de afinidade por açúcar.

Com relação à baixa atividade de inibição da síntese protéica *in vitro* detectada para a soRIP, esta deve se considerada como possível, mas ainda carente de comprovação. O ensaio de depurinação, por sua vez, não detectou atividade de depurinação em ribossomos de rato.

Capítulo 3

A região C-terminal da cadeia-A da pulchellina e sua interação com sistema biomimético

3.1 A região C-terminal da cadeia A da pulchellina e sua interação com sistema biomimético

Como já citado no Capítulo 1, durante o processo de translocação das RIPs tipo 2 do citosol para o lúmen do RE essas proteínas parecem interagir com os fosfolipídios da membrana deste compartimento por meio de suas sequências sinalizadoras. Em função destas evidências foi postulado que a região C-terminal da RTA (cadeia-A da ricina) estaria relacionada com o seu processo de translocação para o citosol, o qual seria mediado pela interação desta região da RTA com a membrana do RE antes da retrotranslocação para o citosol.

Trabalhos envolvendo o estudo de RIPs e sistemas que mimetizam a membrana fosfolipídica (135) (136) tem sido descritos na literatura, mas principalmente focados em analisar o comportamento da RTA. Assim, com a utilização de vesículas compostas de fosfolipídios carregados negativamente (DOPG) foi demonstrado que a RTA interage fortemente com estas e que esta interação promove mudanças estruturais na proteína (55). Por outro lado, nenhuma variação significativa na estrutura secundária da proteína foi observada quando esta se encontrava na presença de vesículas de DOPC.

Apesar destes estudos, ainda não há um consenso na literatura que esclareça o papel destas interações entre as cadeias tóxicas das RIPs e a membrana, tampouco o mecanismo pelo qual elas ocorrem.

Frente a estes resultados, o trabalho descrito neste capítulo apresenta a investigação da interação da cadeia A da pulchellina (rPAC) com a membrana do RE, focando principalmente na elucidação do papel da região C-terminal. Para tal, foram utilizadas técnicas biofísicas, focando tanto as modificações estruturais que ocorrem nas proteínas, bem como as que ocorrem nos sistemas biomiméticos (monocamadas de Langmuir e vesículas) em decorrência das interações. Ainda, estudos envolvendo formas truncadas na porção C-terminal (mutantes) foram usados em conjunto com sistemas modelos de biomembranas.

3.2 OBJETIVOS

Estudar a interação da cadeia-A recombinante da pulchellina (rPAC) com modelos de biomembranas, bem como formas truncadas da rPAC na sua porção C-terminal, na tentativa de determinar a contribuição desta região para a interação com a membrana.

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.1 Obtenção das proteínas recombinantes e mutantes

3.3.1.1 Clonagem e expressão da rPAC e formas truncadas

A cadeia A recombinante da pulchellina (rPAC) e as 3 formas truncadas na região C-terminal (Figura 3.1 A e B), denominadas rPAC: - Δ^{236} - Δ^{239} - Δ^{244} , foram obtidas pela técnica de PCR, utilizando *primers* específicos e o cDNA da pulchellina (isoforma PII, número de acesso EU008736.1) como molde, materiais já disponíveis em nosso laboratório (81).

A definição das diferentes formas truncadas da região C-terminal da rPAC foi baseada na conservação de resíduos hidrofóbicos nesta região, obtida a partir de um alinhamento com outras cadeias A de RIPs tipo-2, as quais estão listadas na tabela 3.1. As sequências dos primers utilizados foram: rPAC forward (5'-CGGCTAGCGAGGACCGGCCATTGAATTTAC-3') e rPAC reverse (5'-CCTTCGAGTTAATTTGGCGGATTGCAGACAAAA-3'), os quais incluíram os sítios de restrição *Nhe* I e *Xho* I, respectivamente. Os *primers reverses* para criar as deleções da região C-terminal foram: rPAC Δ^{244} (5'-AGCTCGAGTTAAAGCATCAATGCTAGAACTGC-3'), rPAC Δ^{239} (5'-AGCTCGAGTTAAACTGCTAGAGTTGGGTGTGAC-3') e rPAC Δ^{236} (5'-AGCTCGAGTTAAGTTGGGTGTGACAAGGAATC-3'). Todos esses *primers reverses*

incluíram também o sítio de reconhecimento para a enzima *Xho* I e foram usados em reações de amplificação com o *primer* rPAC-*forward*.

Tabela 3.1: Lista de Proteínas da família RIP tipo 2 utilizadas para o alinhamento e análise da região C-terminal. Estão destacados nesta tabela o número de acesso (no banco de dados Uniprot, www.uniprot.org, (137) de cada membro, o nome comum e a espécie de planta a qual pertence. No alinhamento apenas as sequências correspondente as respectivas cadeias A foram utilizadas.

Número de Acesso	Nome da proteína	Organismo
P11140	Abrina-a	<i>Abrus precatorius</i>
P33183	Nigrina b	<i>Sambucus nigra</i>
P02879	Ricina	<i>Ricinus communis</i>
D3GDL1	<i>Putative type 2 ribosome-inactivating protein</i>	<i>Camellia sinensis</i>
B1NQB9	Prepropulchellina (PAC)	<i>Abrus pulchellus subsp. tenuiflorus</i>
Q8W2E7	<i>Ribosome-inactivating protein IRAb</i>	<i>Iris hollandica</i>
Q94BW5	<i>cinnamomin I</i>	<i>Cinnamomum camphora</i>
Q2PA54	<i>Riproximín</i>	<i>Ximenia americana</i>

A amplificação da rPAC e seus mutantes foram realizada sob as seguintes condições de PCR : 94 °C, 5 min (desnaturação inicial); 35 ciclos a 94°C, 2 min , 60°C, 30 s, 72 °C, 1 min e uma extensão final a 72 °C por 5 min. Uma vez amplificados e isolados do gel de agarose, os produtos de PCR foram ligados ao vetor pGEM-T (Promega) e sequenciados por sequenciamento automático (seguindo o mesmo procedimento descrito nos materiais e métodos do capítulo 2) para confirmação das sequências. Os respectivos DNAs foram subclonados no vetor pET28a(+), nos sítios *Nhe* I e *Xho* I, gerando quatro construções: pET28rPAC, pET28rPAC^{Δ244}, pET28rPAC^{Δ239} e pET28rPAC^{Δ236}, cujos respectivos produtos de expressão apresentaram um 6xHis-tag no N-terminal.

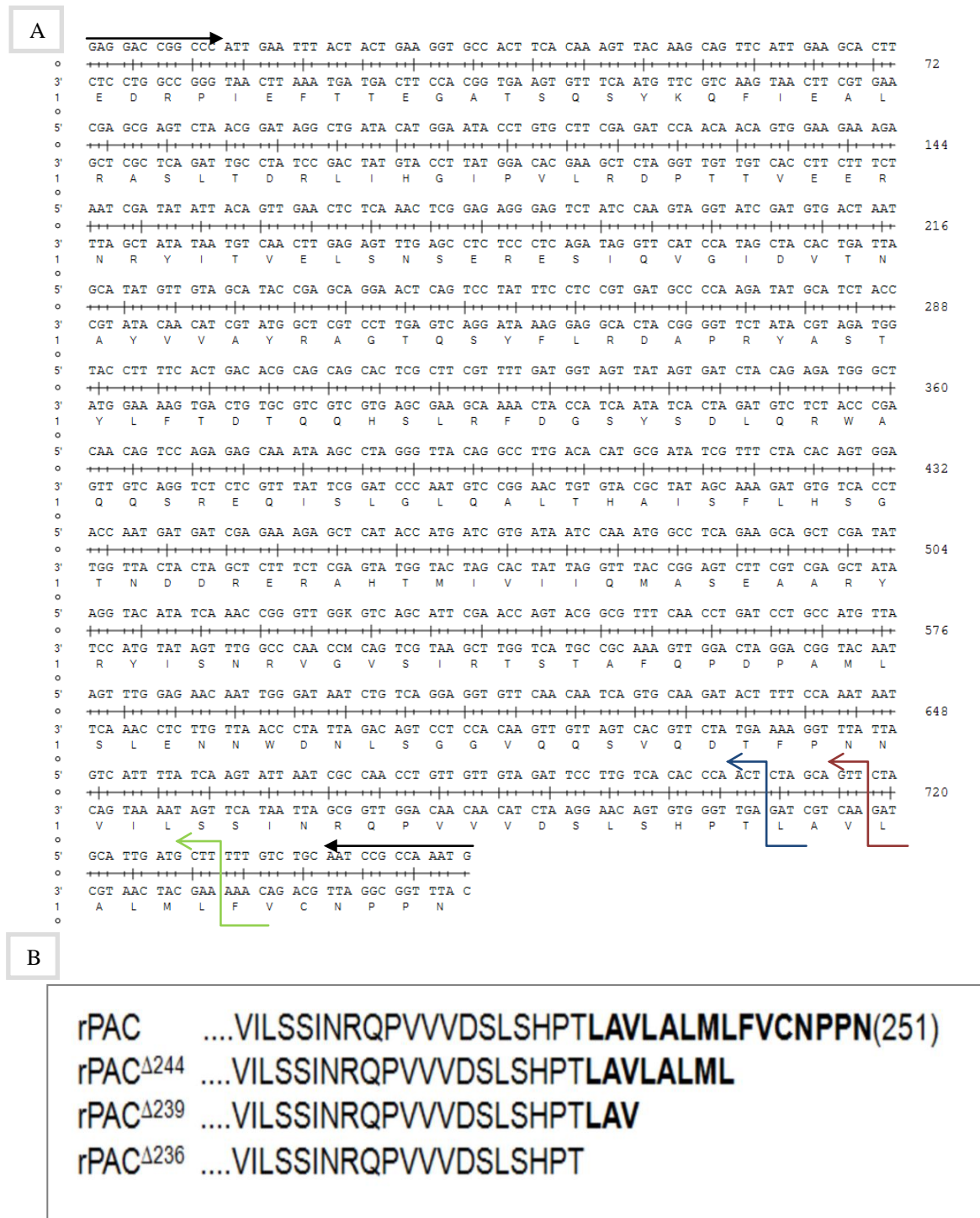


Figura 3.1 – Estrutura primária da cadeia-A da pulchellina (PAC), destacando as deleções na região C terminal. A) cDNA codificando a cadeia-A madura com a correspondente sequência de aminoácidos (251 aminoácidos , ~28 kDa). A localização dos oligonucleotídeos específicos utilizados para amplificar a rPAC estão representados com setas pretas. A localização dos oligonucleotídeos *reverse* utilizados para gerar as três formas truncadas da proteína estão representados com setas azul (rPAC^{Δ236}), vermelha (rPAC^{Δ239}) e verde (rPAC^{Δ244}). B) esquema mostrando os resíduos da região C-terminal da rPAC (negrito) e as deleções geradas nos três mutantes.

As construções mencionadas no item anterior foram utilizadas para transformar a linhagem de *E. coli* BL21 (DE3). A partir de uma cultura em placa com meio LB sólido, os transformantes foram crescidos em 5 mL de meio LB líquido, suplementado com canamicina ($50 \mu\text{g.L}^{-1}$), por cerca de 16 horas, a 37°C e agitação de 250 rpm. A seguir, esta cultura foi diluída 1:100 em 500 ml de meio LB contendo canamicina ($50 \mu\text{g.L}^{-1}$). As culturas bacterianas cresceram a 37°C , sob agitação de 250 rpm, até atingirem uma $\text{DO}_{600\text{nm}}$ entre 0,4-0,6, quando foi então adicionado 0,1mM de IPTG para a indução da expressão das proteínas de interesse. As células induzidas foram então incubadas por 16 horas, a 20°C , sob agitação de 250 rpm. Após este período, as células foram centrifugadas (10000g, 10 min.) e o precipitado foi mantido a -20°C até ser utilizado na purificação.

3.3.1.2 Purificação das proteínas recombinantes

As células congeladas foram lisadas por sonicação (30 segundos, pulsos de 20 mA repetidos 10 vezes) em banho de gelo. Após a centrifugação (por 20 min, 10000 g e 4°C), as frações solúvel e precipitada foram separadas, sendo o extrato solúvel aplicado numa coluna de afinidade (5 ml de resina Ni-NTA, Qiagen). A coluna foi pré-equilibrada com tampão A (100 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, 5mM imidazol, pH 7,4), o qual também foi usado na lavagem (cerca de 10-15 volumes) para retirar as proteínas que não interagiram com a resina. As proteínas de interesse foram eluídas adicionando concentrações crescentes de imidazol, diluído no tampão A. Os resultados da expressão e das etapas de purificação foram analisados em SDS-PAGE 15% (91). Após a purificação, as proteínas foram dialisadas contra o tampão A para a retirada do imidazol e utilização nos experimentos biofísicos descritos a seguir.

3.3.1.3 Atividade RNA N-Glicosilase

O ensaio específico para determinar a atividade depurinadora (rRNA N-glicosilase) da rPAC e dos mutantes foi realizado como descrito no capítulo 2 para soRIPA (item 2.4.19.2).

3.3.1.4 Dicroísmo circular (CD)

As medidas de CD foram realizadas num espectropolarímetro Jasco J-815 (*Jasco Corporation*, Japão) em cubeta de quartzo de 1 mm de caminho óptico. Os espectros foram registrados num intervalo de comprimento de onda de 195 a 250 nm (UV distante), sendo que cada medida representa uma média de 8 varreduras consecutivas através das amostras. As contribuições dos tampões obtidas sob condições idênticas foram subtraídas e todos os espectros de CD foram corrigidos a fim de eliminar efeitos de ruídos. Os espectros originais foram filtrados com Transformadas de Fourier, preservando-se as bandas típicas de cada espectro.

3.3.2 Técnicas biofísicas

3.3.2.1 Monocamadas de Langmuir

Os filmes de Langmuir foram fabricados em cuba de Langmuir KSV Instruments (Finlândia), modelo KSV Minitrough (figura 3.2), com área superficial de 75 x 323 mm² e volume de 45 mL, alocada em uma sala limpa classe 10.000, com temperatura controlada em 23±1 °C. A cuba é equipada com uma prova Wilhelmy para medição da pressão de superfície.

Para a obtenção dos filmes de Langmuir, um determinado volume (em geral 50 µL) de soluções de lipídio em clorofórmio (para DPPC) ou clorofórmio: metanol 4:1 (para DPPG) foram espalhados na superfície de uma solução aquosa (tampão fosfato 20 mM, pH 7,4). Em geral a concentração da solução estoque lipídica é de 1 mM. Após a evaporação do solvente, as barreiras móveis são acionadas (velocidade de 10 mm² min⁻¹) e obtêm-se as isotermas de pressão superficial (π -A).

Para os estudos de interação das proteínas com a monocamada lipídica, antes da compressão do filme superficial, foram realizados experimentos de cinética de adsorção. Após o filme lipídico espalhado e a evaporação do solvente, uma pequena alíquota da solução da proteína (em geral 500 vezes menor que o volume da cuba, de modo a não alterar

significativamente o volume final) foi injetada na subfase contendo tampão. O processo de adsorção da proteína na interface foi monitorado através de variações na pressão superficial em função do tempo. A compressão da monocamada ocorreu apenas após o equilíbrio de adsorção ter sido atingido, de modo a garantir a isoterma π -A do sistema misto.

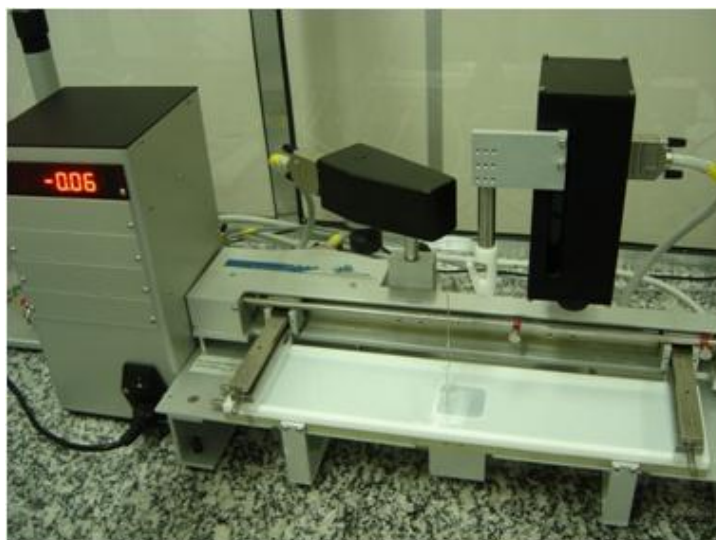


Figura 3.2 - Cuba de Langmuir KSV utilizada para fabricação das monocamadas de Langmuir.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 Determinação da região C-terminal da rPAC

Para determinar a região C-terminal da rPAC que seria alvo das deleções realizadas, realizou-se primeiramente um alinhamento entre esta proteína e outras RIPs representantes da família. O alinhamento está apresentado na Figura 3.3. Este resultado permitiu verificar que a região C-terminal de todas as proteínas analisadas compartilham uma sequência média de 11 aminoácidos hidrofóbicos.

Região conservada hidrofóbica

Abrina	PNQVTLTNIRNEPVIVDSLHP-TVAVLALMLFV CNPPN-----	251
PulchA	PNNVILSSINRQPVVVDSLHP-TLAVLALMLFV CNPPN-----	251
CAMSI	SSPVQLQRPDYTFNVDSATLS-IVRNALMLFV CNINHASSQ-----	266
CINCA	SSPVELRSISNKPVYVGSVSDR-VISGLAIMLFICRSTDRASS-----	254
Riprom	NNPFRLAISTGNEVTLNVRD--VIASLAIMLFVCRDRPSSS-----	254
nigrina-b	FGTVQLLNVDHTRLVDNFEELYKITGIAILLFRCSSPSNDNAIRMPLDLAGE DNKYN	272
RTA	ASPIQLQRRNGSKFSVYDVSIL--IPIIALMVYRCAPPPSSQF-----	267
XIMAM	PNQIRLQSPTYAEYWATNVMPN-LVAAIGIMXYFCAKPPPP-----	248

Figura 3.3 - Resultado do alinhamento das cadeias A de vários representantes RIPs tipo 2. Nesta figura mostra-se apenas a região C-terminal das proteínas, onde é possível observar a presença dos resíduos hidrofóbicos (destacados em verde) no final das respectivas cadeias, conservado entre todas as sequências alinhadas. O alinhamento foi realizado utilizando o software ClustalW e os parâmetros pré-definidos pelo programa. As proteínas estão identificadas com o nome a esquerda (Abrina, P11140; PulchA, B1NQB9; CAMSI, D3GDL1; XIMAN, Q2PA54; CINCA, Q94BW5; Riprom, Q2PA54, Nigrina-b, P33183; RTA, P02879).

Como é sabido, a maioria das RIPs são conservadas estruturalmente e, portanto a região C-terminal (ao menos dentre as RIPs tipo 2) deveria ser semelhante também. Quando olhamos a estrutura secundária desta região na cadeia-A da pulchellina (PAC) e comparamos com a RTA, por exemplo, verificamos que os resíduos conservados do C-terminal em ambas proteínas localizam-se numa região não ordenada (Figura 3.4 A e B).

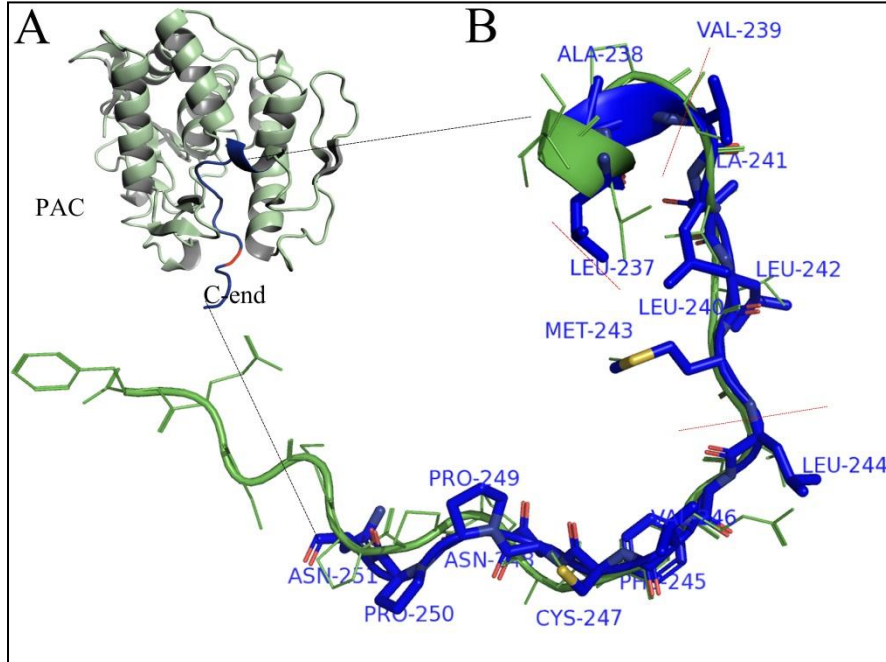


Figura 3.4 – Modelo estrutural da PAC. (A) Destaque da região C-terminal e (B) sobreposição da região C-terminal da PAC (azul) com a da RTA, em verde. Em ambas as proteínas esta região apresenta estrutura não regular, sendo que na RTA é mais extensa. As proteínas foram processadas com o programa *Pymol*, sendo as coordenadas da PAC gentilmente cedidas pela Dra. Priscila V. Castilho (dados estruturais ainda não publicados) e da RTA, obtidas no banco de dados de proteínas (PDB:1J1M).

Esta região não ordenada em ricina é predita como aquela que interage com a membrana do RE, como já comentado anteriormente, e por isso tal região C-terminal em pulchellina foi escolhida para os estudos de interação.

3.4.2 Clonagem da rPAC e seus mutantes C-terminal

Para o estudo da interação entre a PAC e o sistema biomimético de membrana, e principalmente para verificar o papel da região C-terminal nesta interação, vários mutantes (formas truncadas) foram construídos a partir da cadeia A da pulchellina. Os processos de isolamento a partir de sementes de *Abrus pulchellus* e purificação desta toxina em sua forma nativa (holotoxina), bem como a produção de uma forma recombinante como uma proteína de fusão de GST já foram estabelecidos em nosso grupo (72). Entretanto, para este trabalho optou-se por novas construções para a produção das proteínas, principalmente para aumentar o rendimento da forma recombinante. A justificativa para tentar novas estratégias se baseia no fato de que a produção desta como proteína de fusão com GST é cara, pois necessita de digestão com protease e muitas etapas de purificação, além do baixo rendimento. Dessa forma, a construção de um sistema de expressão com maior rendimento e facilidade de purificação seria uma base mais atraente para se construir tais mutantes. Assim, a fase aberta de leitura (ORF) da cadeia-A madura da pulchellina (PAC) foi amplificada pela técnica de PCR, com tamanho correspondente ao esperado (754 pares de bases, Figura 3.5). Para isso, utilizou-se como molde o cDNA previamente isolado e caracterizado em nosso laboratório, o qual corresponde à isoforma II (81). A clonagem do inserto purificado foi realizada em pGEM-T e, em seguida, confirmada por sequenciamento automático de DNA. Um dos clones positivos sequenciado foi utilizado como molde nas reações subsequentes de amplificação para a produção das cadeias-A truncadas no C-terminal.

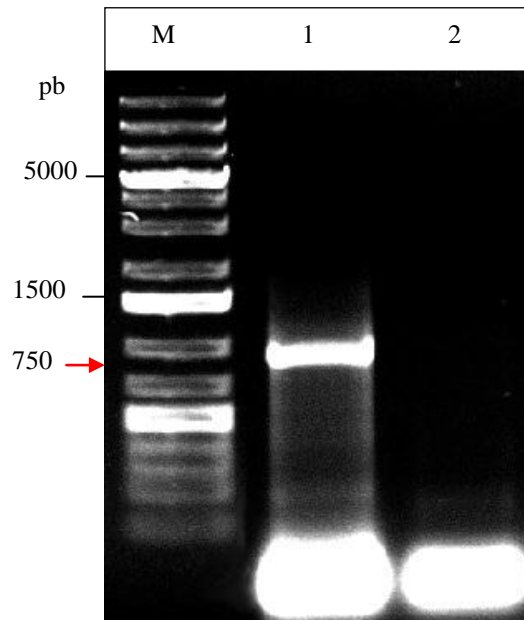


Figura 3.5 - Produto de PCR correspondente a amplificação da cadeia-A da pulchellina (rPAC). Gel de agarose 1%, corado com Brometo de Etídeo e transiluminado luz UV. Em 1 observa-se a presença de um fragmento de DNA de aproximadamente 750 pb. Em 2, o controle negativo da reação. Em cada poço foram aplicados 5 μ l de amostra mais 1 μ l de tampão de corrida, 6X. A quantificação do fragmento após purificação do gel foi de aproximadamente 30-40 ng/ μ l. M, marcador de peso molecular *DNA ladder plus* (Fermentas).

Uma vez purificados, os fragmentos amplificados correspondentes às formas truncadas da rPAC foram também clonados no vetor pGEM-T e o sequenciamento confirmou a correta sequência. Desta maneira foi possível gerar as deleções desejadas na região C-terminal da proteína, as quais podem ser melhor visualizadas na figura 3.1.

3.4.3 Expressão e purificação

A dificuldade de se obter a PAC separadamente da sua cadeia B, a partir da pulchellina nativa isolada da semente associada a necessidade de construir mutantes da região

C-terminal fez com que optássemos pela produção da cadeia A em um sistema heterólogo, a partir da expressão em bactérias *E.coli* linhagem BL21(DE3). Desta forma, também seria possível melhorar o rendimento e o grau de pureza das proteínas recombinantes.

Assim, a cadeia recombinante da pulchellina rPAC e os três mutantes da região C-terminal foram subclonados no vetor de expressão pET28a, em fase com a sequência codificante para o peptídeo His-tag. Os vetores pET28-rPAC, -rPAC^{Δ244}, -rPAC^{Δ239} e rPAC^{Δ236} foram utilizados para transformar independentemente 4 amostras diferentes da linhagem de expressão *E.coli* BL21(DE3), sendo o resultado da expressão e purificação das quatro proteínas mostrados a seguir (figuras 3.6 e 3.7).

De acordo com as figuras, pode-se verificar que todas as proteínas foram expressas eficientemente neste sistema, e a purificação permitiu a obtenção das proteínas com alto grau de pureza.

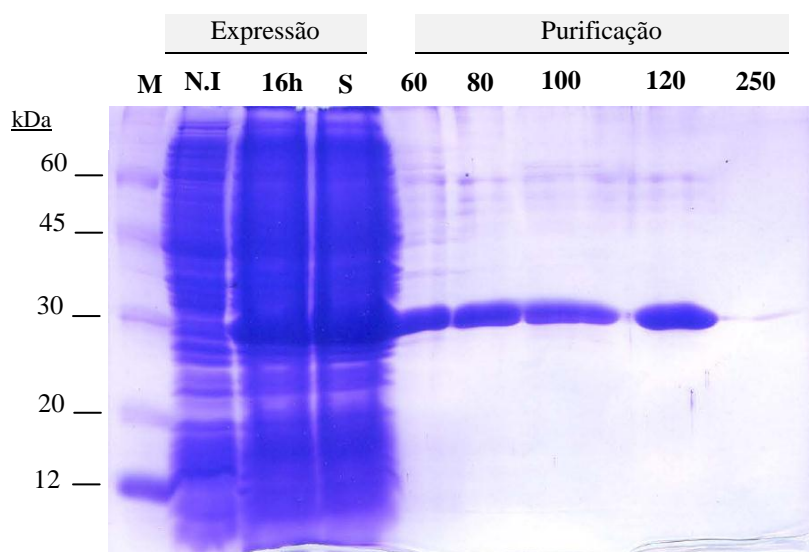


Figura 3.6 - Expressão e purificação da rPAC em *E.coli* BL21(DE3). SDS-PAGE mostrando o resultado da expressão após 16 horas de indução a 20 °C com 0,1 mM de IPTG, no qual é possível notar a presença de uma banda intensa de cerca de 30 kDa após a indução. Esta mesma banda aparece na fração solúvel (S) do extrato bacteriano, após a indução, indicando que a proteína foi expressa de forma solúvel. As frações da proteína eluídas da coluna de Níquel com concentrações crescentes de imidazol (60 a 250 mM) estão indicadas como purificação na figura. M e N.I correspondem ao marcador de massa molecular e a amostra da cultura de células sem induzir (controle negativo), respectivamente.

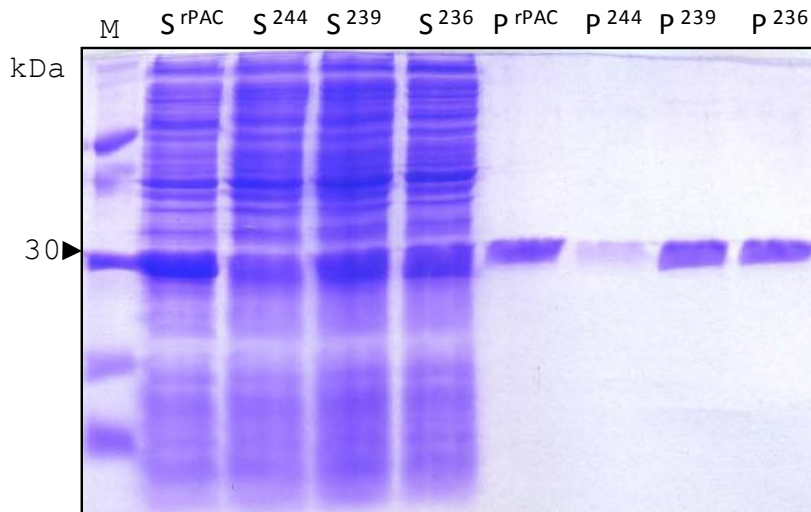


Figura 3.7- Expressão e purificação dos mutantes C-terminal da rPAC. SDS-PAGE 15% mostrando o resultado da expressão e purificação de $rPAC^{\Delta 244}$, $rPAC^{\Delta 239}$ e $rPAC^{\Delta 236}$. (S) indica sobrenadante e (P), fração purificada na cromatografia de afinidade; (M) corresponde ao marcador de massa molecular.

3.4.4 Atividade RNA-N Glicosilase

Até o momento não se tem registro de que os aminoácidos constituintes da região C-terminal das RIPs estejam diretamente envolvidos na inativação dos ribossomos. Dessa forma, uma mutação nesta região, a princípio, não deveria afetar a atividade catalítica da proteína, a menos que esta mudança alterasse a conformação tridimensional da proteína afetando seu sítio ativo.

Por este motivo avaliamos primeiramente a atividade catalítica *in vitro* dos mutantes da rPAC utilizando um ensaio de depuração de ribossomos de fígado de rato já descrito nos Materiais e Métodos do Capítulo 2. Segundo este ensaio, todas as quatro proteínas expressas e purificadas neste trabalho apresentaram atividade depuradora específica perante os ribossomos, como revelado na Figura 3.8, onde se observa a presença do fragmento ENDO liberado após o tratamento com anilina acética. Isto indica que rPAC mantém sua atividade

catalítica, independente das deleções provocadas na sua região C-terminal. A concentração utilizada para cada amostra foi de aproximadamente 100 ng/mL.

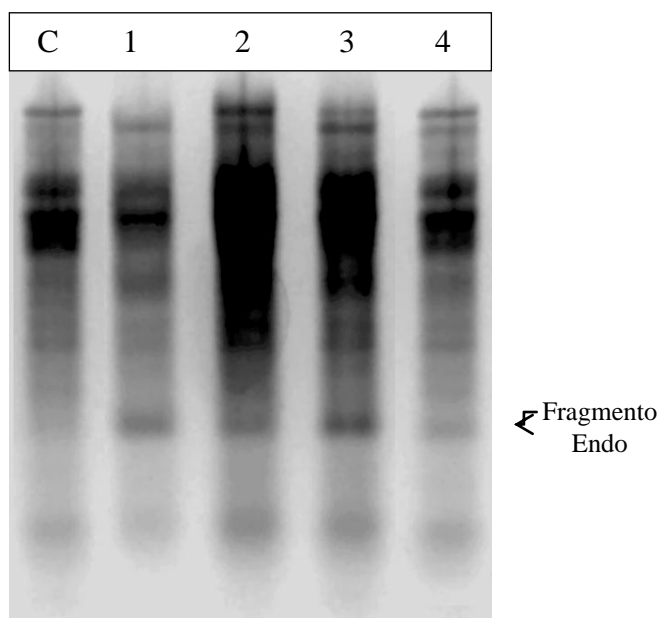


Figura 3.8. Ensaio de depurinação da rPAC e mutantes. Gel de agarose/formamida mostrando o resultado do ensaio para (1) rPAC, (2) rPAC Δ^{244} , (3) rPAC Δ^{239} , (4) rPAC Δ^{236} e (C) controle negativo.

3.4.5 Estudos estruturais comparativos da rPAC e dos três mutantes por dicroísmo circular

Conforme apresentado anteriormente, todas as proteínas recombinantes exibiram atividade catalítica sob as condições testadas no presente trabalho. Dessa forma, a próxima etapa foi uma avaliação estrutural das proteínas. A abordagem utilizada para essa análise foi a técnica de espectroscopia de dicroísmo circular (CD). Esta ferramenta é muito utilizada para estudos estruturais de biomoléculas, tais como as proteínas e polipeptídeos em solução devido à sua capacidade de discriminar a proporção de estruturas secundárias como α -hélice, folha β , volta β e estruturas não ordenadas que compõem a molécula. O CD também é um método muito útil no monitoramento de alterações conformacionais das proteínas em função de

solventes, pH, temperatura, força iônica e ligações específicas e não específicas (138). Foram realizadas as medidas de CD para os três mutantes, comparando-os com o espectro da rPAC (controle), conforme Figura 3.9.

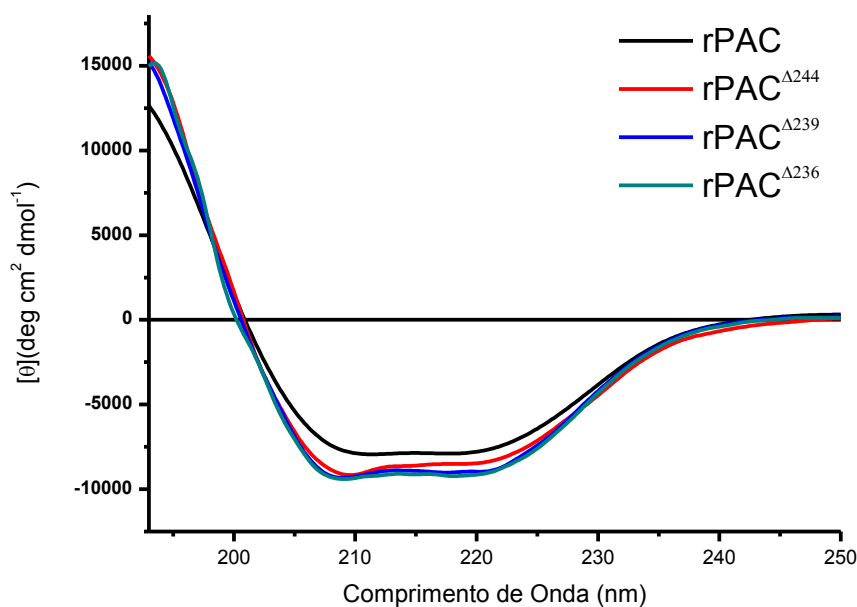


Figura 3.9 – Análise da estrutura secundária da rPAC e seus mutantes por dicroísmo circular. As medidas foram realizadas com uma solução protéica de aproximadamente 0,3 mg/ml, em tampão fosfato 20 mM pH 7,4. Os espectros foram obtidos variando o comprimento de onda entre 190 a 250 nm e registrados como uma média de 8 varreduras, a temperatura ambiente (20 °C), utilizando cubeta de caminho óptico de 1 mm.

Analisando a Figura 3.9 pode-se observar que os espectros de CD são semelhantes para os três mutantes e a rPAC, apresentando um comportamento típico de proteínas constituídas por elementos de estrutura secundária tipo $\alpha\beta$, demonstrando que as deleções não levaram a alterações significativas na estrutura secundária original da proteína. Levando em consideração que as proteínas apresentaram atividade catalítica *in vitro* e exibiram o mesmo perfil de estrutura secundária, podemos sugerir que as deleções provocadas na rPAC muito provavelmente não alteraram sua estrutura tridimensional.

3.4.6 Estudos de interação da rPAC com Sistemas biomiméticos

Como mencionado anteriormente trabalhos com sistemas que mimetizam a membrana fosfolipídica no estudo de RIPs já têm sido descritos na literatura. Apesar de o sistema mais estudado ser a RIP tipo 2 ricina, outras RIPs, como SLT, *Mistletoe Lectin I*, também já tiveram seu comportamento frente a interação com membranas avaliado (139). Entretanto, não existe um panorama geral que padronize o comportamento das RIPs tipo 2, bem como de suas cadeias tóxicas quando estas interagem com a membrana. Sendo assim, um estudo detalhado para cada proteína é válido, visto a falta deste consenso na literatura.

Dentre os trabalhos descritos acima, o de Day (55) et al. estuda a interação da cadeia-A da ricina (RTA) com vesículas de POPG, fosfolipídio aniônico e com vesículas de POPC, este zwitteriônico. Os resultados indicaram que a proteína interage mais fortemente com lipídios carregados e que esta interação resulta em alterações estruturais na proteína. Este trabalho nos motivou a seguir a mesma metodologia adotada pelos autores, mas num estudo da rPAC com vesículas como sistema modelo de biomembrana.

As vesículas utilizadas neste trabalho foram preparadas com os fosfolipídios DPPC e DPPG, e objetivava verificar alterações estruturais na proteína através da técnica de dicroísmo circular.

Assim que as vesículas foram incubadas com as proteínas (rPAC e suas formas truncadas) o espectro de dicroísmo circular foi obtido, tendo sido este considerado como tempo zero. Posteriormente, outros espectros seriam obtidos em função do tempo. Entretanto, para o caso das vesículas formadas com o fosfolipídio DPPG observou-se que imediatamente após a incubação, a solução se tornava muito turva indicando a ruptura das vesículas, prejudicando a obtenção dos espectros. Para verificar esta hipótese, ensaios de cinética de vazamento foram realizados utilizando-se a sonda calceína como fluoróforo confinado dentro das vesículas. Caso a interação da proteína fosse suficiente para desestruturar o colóide, este fluoróforo seria liberado aumentando a intensidade de emissão no comprimento de onda correspondente. Os resultados obtidos (não mostrados) indicaram que todas as proteínas estudadas provocavam a ruptura das vesículas, tornando o sistema inviável para o estudo.

Dessa forma, a estratégia adotada para a realização do estudo foi a utilização de outro sistema mimético de biomembrana, que não permitisse que fenômenos de transporte intra e extra-sistema ocorressem, evitando o imprevisto obtido. Graças ao envolvimento da pós-

doutoranda do grupo de Biofísica Molecular, Dra. Thatyane Nobre, a fabricação de monocamadas de Langmuir foi inserida ao trabalho e os resultados serão mostrados e discutidos a seguir.

3.4.6.1 Estudos de interação da rPAC e as três formas truncadas com monocamadas de Langmuir

Inicialmente estudou-se a interação das proteínas com monocamadas de Langmuir dos fosfolipídios DPPC e DPPG, zwitteriônico e aniônico respectivamente. Cinéticas de adsorção foram realizadas à baixo empacotamento lipídico e, posterior ao equilíbrio de adsorção, as monocamadas mistas foram comprimidas, resultando nas isotermas de pressão superficial dos sistemas. Os resultados são apresentados a seguir.

3.4.6.2 Interação da rPAC com monocamada de DPPG e DPPC a temperatura de 20 °C

A interação da rPAC à monocamada de Langmuir constituída de DPPG e DPPC foi estudada primeiramente pela medição da absorção da proteína em função do tempo e variando as concentrações da rPAC (Figura 3.10). Analisando as curvas observamos que a cinéticas de adsorção para a proteína rPAC com monocamadas de DPPC e DPPG foram bastante distintas. No caso de DPPG, a proteína nas diferentes concentrações estudadas interagiu fortemente com o lipídio carregado negativamente, provocando variações no valor da pressão superficial de até 5 mN m^{-1} , em um intervalo de tempo de ~ 50 minutos. Já para a curva B, onde se observa a cinética de adsorção para monocamadas de DPPC, a interação não resultou em variações maiores $1,5 \text{ mN}^{-1}$, obtidos em mais de 2 horas de experimento. Por este motivo, elegeu-se o fosfolipídio carregado negativamente DPPG para continuar o estudo, admitindo a maior interação com este lipídio.

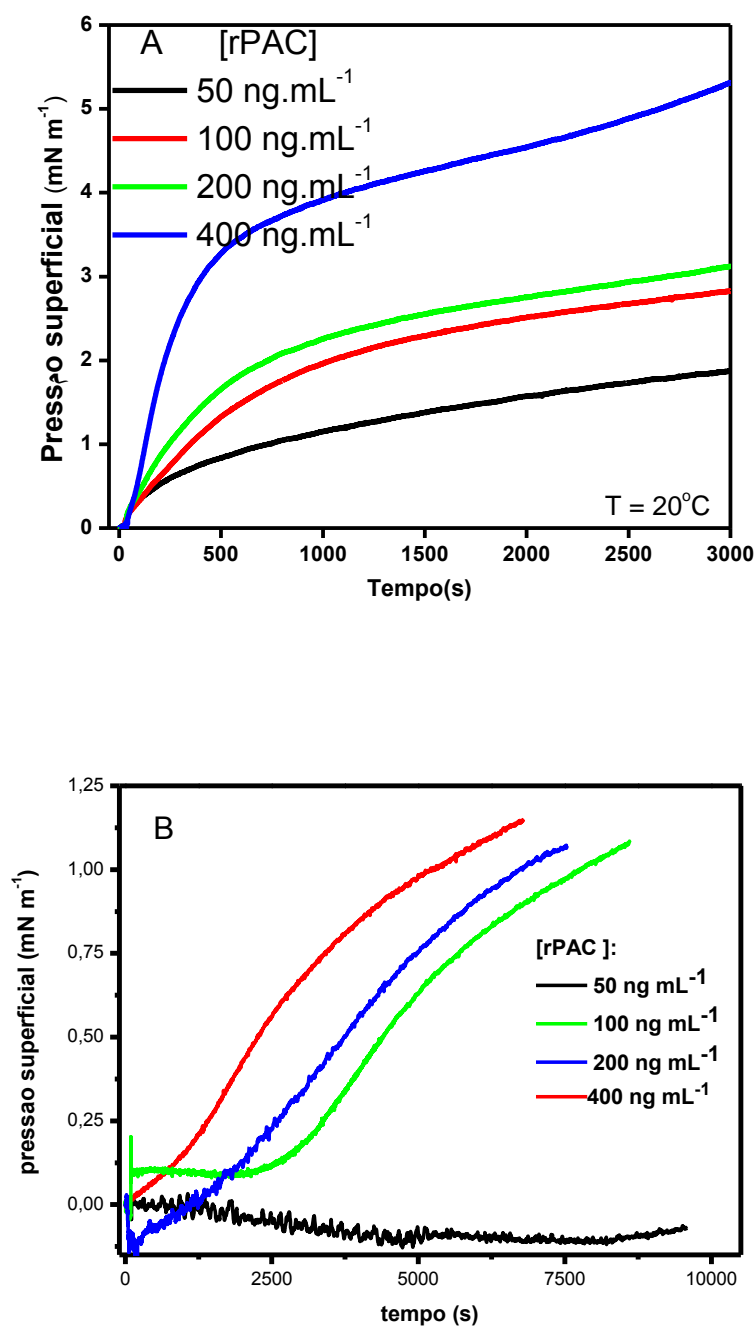


Figura 3.10 - Cinéticas de adsorção para diferentes concentrações de rPAC em monocamadas de (A) DPPG e (B) DPPC.

As isotermas de pressão superficial, π -A, para as monocamadas de DPPG contendo diferentes concentrações de rPAC na subfase são apresentadas na Figura 3.10 e mostram que em todos os casos a proteína se incorporou na monocamada de DPPG e permaneceu inserida mesmo após a compressão. As curvas obtidas para as concentrações de 50 e 100 ng mL⁻¹

foram semelhantes entre si, mas bastante deslocadas com relação a curva obtida DPPG puro. Para as concentrações de 200 e 400 ng mL⁻¹, o deslocamento para maiores áreas por molécula, comparado ao obtido para DPPG puro foi mais evidente. Entretanto, para 400 ng mL⁻¹, notamos o desaparecimento do patamar correspondente à região de coexistência de fases líquido-expandido líquido-condensado, indicando que a incorporação da proteína tende a tornar a monocamada mais fluida, estabilizando o estado mais expandido.

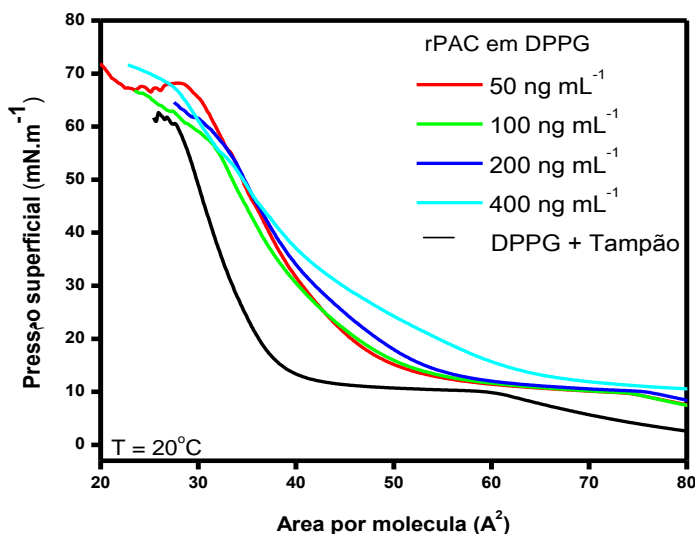


Figura 3.11 - Isoterma de π -A por molécula para monocamadas de DPPG e rPAC, a 20°C.

Interessantemente, a valores de pressão superficial elevados, acima de 40 mN.m⁻¹, as isotermas de todas as amostras praticamente coincidem entre si. Este resultado sugere que aumentando a concentração de proteína, mesmo para alto empacotamento lipídico, ocorra uma saturação da monocamada, onde apenas uma determinada quantidade de rPAC possa adsorver e que, para as concentrações trabalhadas, este valor já tenha sido atingido.

Desta forma podemos afirmar que a rPAC interage efetivamente com monocamada de Langmuir, constituída de lipídio carregado negativamente, DPPG, e que esta interação é forte e dependente da concentração da proteína.

3.4.6.3 Análise comparativa dos mutantes da rPAC em monocamadas de Langmuir de DPPG a 20 °C

Diante dos resultados obtidos para rPAC, os estudos para avaliar a interação das formas truncadas na porção C-terminal desta proteína seguiram a mesma metodologia. As cinéticas de adsorção para as proteínas truncadas na região C-terminal Δ^{244} , Δ^{239} , Δ^{236} , foram obtidas e comparadas a curva da proteína rPAC. Na Figura 3.12 pode-se observar que as alterações no valor de pressão superficial foram bastante distintas, dependendo da forma truncada. Outra importante observação a cerca das curvas é a não existência de um tempo de indução para a adsorção das proteínas, visto que imediatamente após a injeção ocorreram variações em π .

De forma interessante, pode-se notar que a variação na pressão superficial provocada pela interação da proteína foi menor quanto maior a deleção na região C-terminal da proteína, fato que vai de acordo com a hipótese que a região C-terminal exerça papel fundamental na interação da proteína com a membrana.

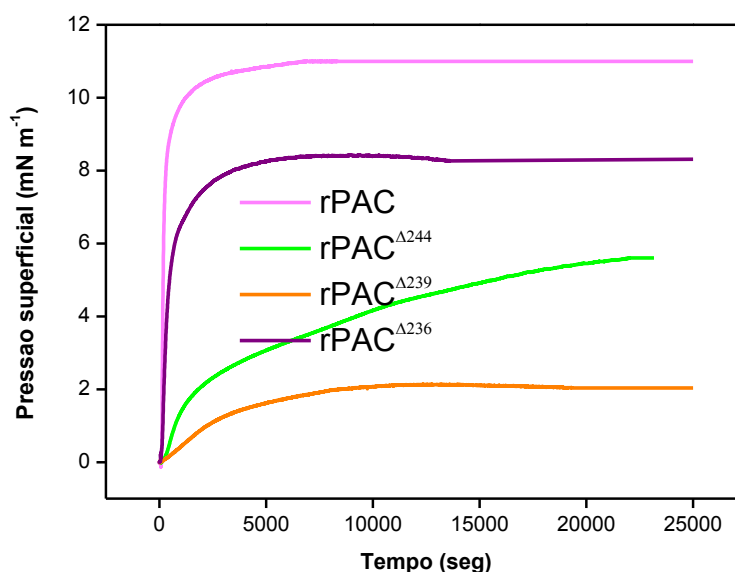


Figura 3.12 - Cinética de adsorção da rPAC e os mutantes, rPAC^{Δ244}, rPAC^{Δ239} e rPAC^{Δ236} em monocamadas de Langmuir constituída do lipídio DPPG. No gráfico, os valores de pressão superficial da monocamada são medidos em função do tempo (40 minutos), para cada proteína, indicando uma interação forte da rPAC com a monocamada. Resultado similar foi obtido para o mutante rPAC^{Δ236}, o que não era esperado. Por outro lado, os mutantes rPAC^{Δ244} e rPAC^{Δ239} apresentaram uma fraca interação relativa com a monocamada, sendo a rPAC^{Δ244} > rPAC^{Δ239}.

Entretanto, resultado controverso é observado para o mutante rPAC^{Δ236} (com a região C-terminal completamente deletada), visto que a adsorção deste resultou em um $\Delta\pi$ de 8 mN/m, maior que o observado para os outros mutantes. Ao analisarmos a isoterma de pressão superficial por área molecular de DPPG (π -A) na presença das proteínas (Figura 3.13), os

dados obtidos corroboram com as curvas de cinética de adsorção, indicando que à medida que a região C-terminal é deletada, menor é a interação com a monocamada lipídica, analisada em função do menor deslocamento da curva do lipídio puro. Entretanto, mais uma vez os dados mostram um comportamento não esperado para a série do mutante rPAC^{Δ236}

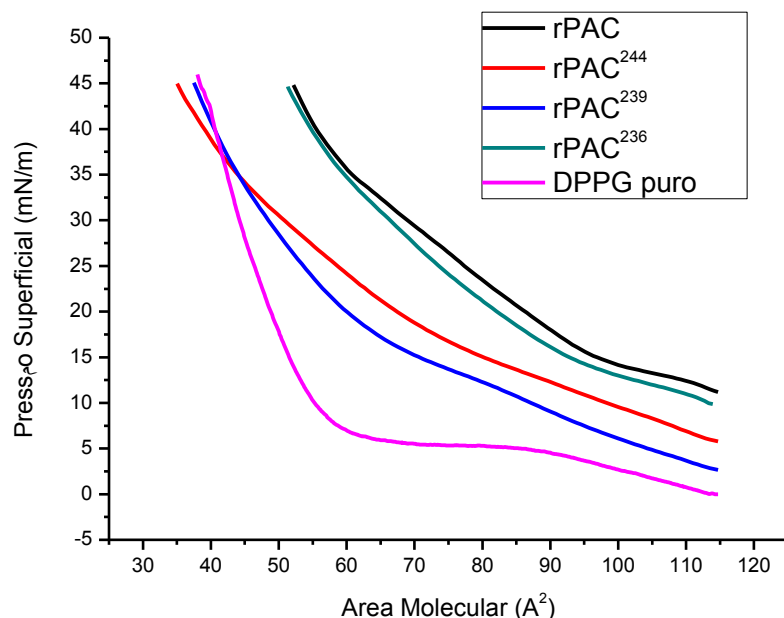


Figura 3.13 - Gráfico de pressão superficial por área molecular de DPPG (π -A)

Sendo este mutante o que apresenta a porção C-terminal totalmente deletada, especulamos a respeito da integridade estrutural da proteína. Visto mais uma vez que medidas por espectroscopia de dicroísmo circular não seriam viáveis para o trabalho com estas proteínas, utilizamos de uma forma simples para verificar o comportamento não esperado da rPAC^{Δ236}. Para tal, a mesma metodologia empregada acima foi seguida para verificar a cinética de adsorção de três diferentes amostras desta construção. Todas as proteínas foram trabalhadas na concentração de 40 ng mL⁻¹, sendo uma delas preparada a partir de uma solução estoque com concentração 0,02 mg mL⁻¹ (diluído), outra preparada a partir de uma solução estoque 0,5 mg mL⁻¹ (concentrada), e outra, preparada a partir do estoque 0,02 mg mL⁻¹, porém submetida a banho com temperatura de 70 °C por aproximadamente 15 minutos (desnaturada). As cinéticas de adsorção são apresentadas na Figura 3.14.

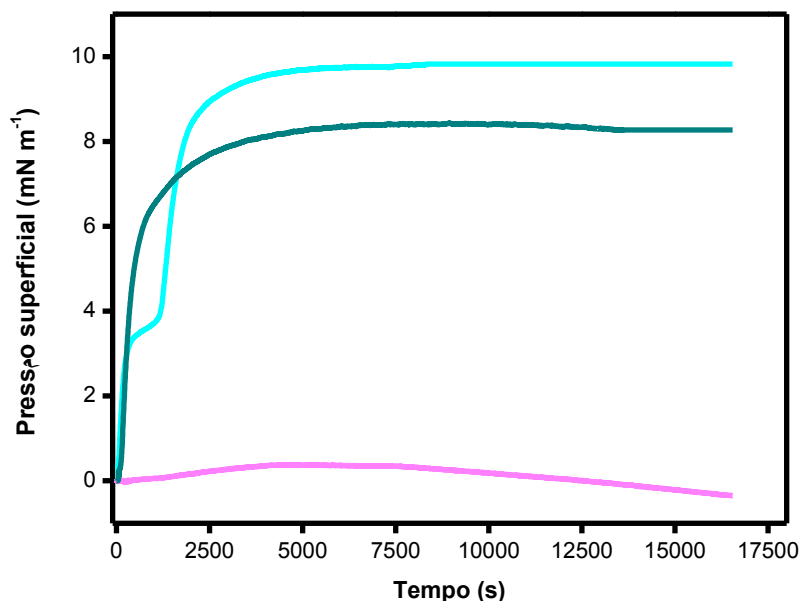


Figura 3.14 - Cinéticas de adsorção da rPAC 236 injetada a partir de uma solução estoque (verde) diluída, (azul) concentrada e (rosa) desnaturada.

Podemos notar que a cinética de adsorção para as formas diluída e concentrada apresentam similaridades no que diz respeito à elevada atividade superficial. Entretanto, a forma agregada (proveniente da solução estoque de maior concentração) apresenta um “ombro” em valores de p próximos a $3,8 \text{ mN m}^{-1}$, que diferencia as duas cinéticas e pode ser atribuída a uma possível desagregação da proteína decorrente de sua diluição na subfase da cuba. Já a cinética da amostra desnaturada apresenta um comportamento completamente distinto das anteriores, não revelando atividade superficial. De fato, a amostra desta proteína apresentava aspecto de suspensão coloidal após ter sido submetida a aquecimento, indicando que possivelmente sua desnaturação implique em uma agregação irreversível.

Na Figura 3.15 pode-se notar que as amostras diluídas e concentradas apresentam perfis muito semelhantes entre si, uma vez que se encontram bastante expandidas com relação à isoterma obtida para DPPG em tampão. Além disso, para os filmes mistos, não observamos região de coexistência de fases líquido-expandida/líquido-condensada, presente no lipídio puro. O deslocamento da isoterma para valores maiores de área por molécula indica que ocorreu a incorporação da proteína na monocamada lipídica, de modo que esta penetração dificultou o empacotamento do filme, tornando-o mais fluido. Para o caso da amostra desnaturada, podemos notar que a isoterma, no início da compressão, é coincidente com a

obtida para o lipídio puro, sendo que apenas na região de coexistência de fases estas passam a ser distintas.

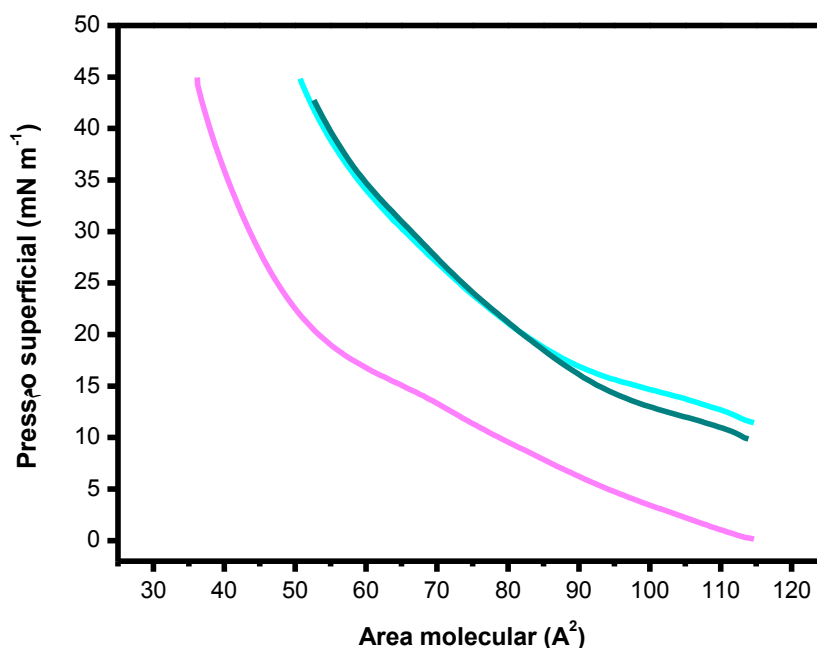


Figura 3.15 - Gráfico de pressão superficial por área molecular (π -A) da rPAC²³⁶ injetada a partir de uma solução estoque (—) diluída, (—) concentrada e (—) desnaturada.

Entretanto, para valores mais elevados de π , as isotermas voltam a apresentar comportamento similar, indicando que não ocorreu significativa incorporação desta amostra na monocamada lipídica. Neste sentido, podemos descartar a possibilidade de artefato no resultado obtido para a incorporação do mutante rPAC ^{Δ 236} uma vez que a amostra tida como agregada apresentou comportamento similar após uma provável etapa de desagregação, conforme discutido na cinética de adsorção. A amostra desnaturada apresentou comportamento totalmente distinto. Esses resultados atestam que as curvas obtidas para a forma truncada rPAC ^{Δ 236} não se tratam de artefato, de modo que outros estudos são necessários para esclarecer esse comportamento.

3.3.6.4 Análise comparativa dos mutantes da rPAC em monocamadas de Langmuir de DPPG a 37 ° C

Os resultados mostrados anteriormente sugerem que a região C-terminal, tem um papel importante na interação da rPAC com a monocamada de DPPG. Apesar do comportamento ainda não elucidado da forma truncada com total deleção desta região, mostrou-se que a deleção do C-terminal diminui gradativamente a interação da proteína com a membrana. Entretanto, recentemente, um estudo verificou que a temperatura era fator importante na interação da cadeia A de ricina com membrana. Os autores verificaram que a interação da RTA com vesículas carregadas negativamente (constituídas de lipídios POPC e POPS) constatou que incrementos de temperatura aumentaram a inserção da proteína na membrana do RE (140), sendo que esta incorporação era maior à temperatura de 37°C. Sendo assim, foram realizados experimentos para as proteínas também na temperatura fisiológica de 37 °C, e os resultados são discutidos a seguir.

Inicialmente, as isotermas de pressão superficial para o lipídio puro nas diferentes temperaturas foram avaliadas e o resultado mostrou uma diferença significativa nas duas temperaturas testadas (Figura 3.16). O insert do gráfico com os valores do módulo compressional superficial, C_s^{-1} , definido como: $-A(\delta\pi/\delta A)$, mostra uma elevada alteração na fluidez da monocamada com o aumento de temperatura.

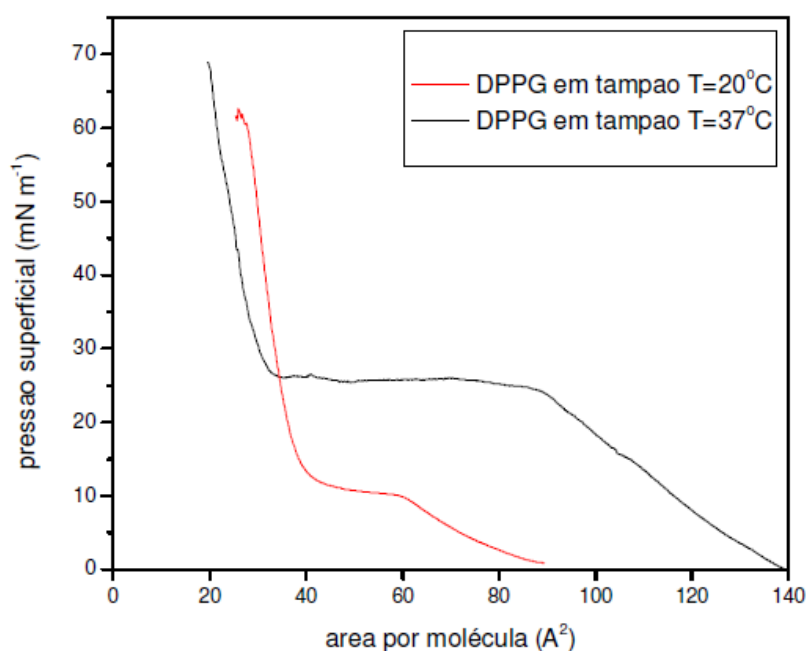


Figura 3.16 - Isoterma de pressão superficial vs. área por molécula para monocamadas de DPPG a 20°C (em vermelho) e a 37°C (em preto).

As curvas na Figura 3.17 mostram as cinéticas de adsorção da rPAC na monocamada, a diferentes concentrações, na temperatura de 37 °C. A incorporação da rPAC resultou em menor variação no valor da pressão superficial para as duas concentrações estudadas quando comparadas ao experimento realizado a temperatura de 20°C (figura 3.9). Além disso, pode-se notar que os valores de equilíbrio são atingidos em menor intervalo de tempo, indicando uma cinética mais rápida.

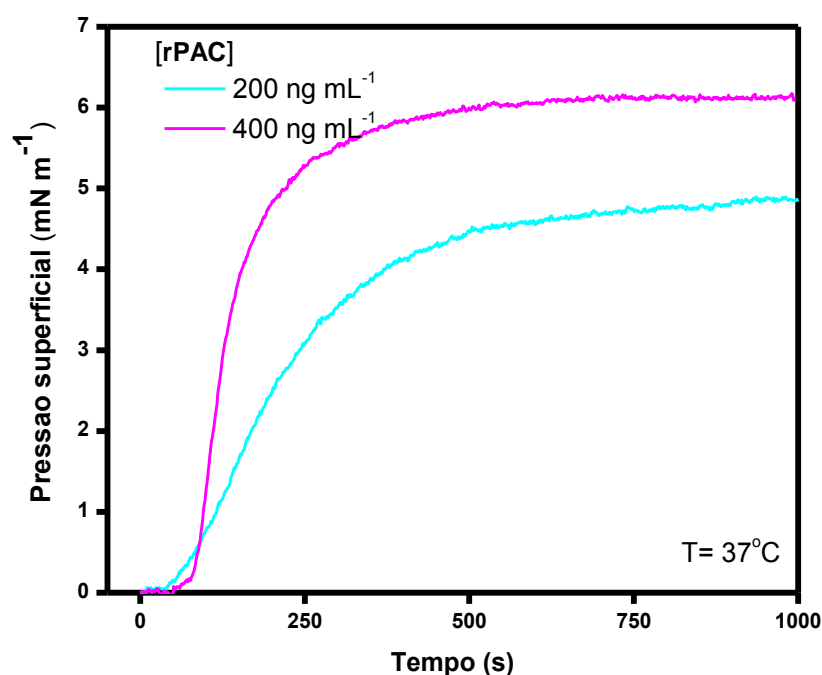


Figura 3.17 - Cinéticas de adsorção da rPAC em monocamada de DPPG, temperatura de 37°C

Já as isotermas de pressão superficial (Figura 3.18) apresentam um comportamento bastante diferenciado. As duas concentrações geraram um patamar bastante pronunciado, por volta de 25 mN m⁻¹. Entretanto, para concentração de 200 ng mL⁻¹ ao término da compressão a monocamada não atingiu valores de pressão superficial maiores que o plateau descrito. Para concentração mais elevada, de 400 ng mL⁻¹, maiores valores de pressão superficial foram alcançados, entretanto, não foi observado colapso da monocamada.

Levando-se em consideração a isoterma obtida para o filme de DPPG puro, formado sobre tampão, pode-se sugerir que o patamar observado para o filme com a rPAC corresponda à região de coexistência de fases líquido-expandido líquido-condensado, observada para este valor de pressão superficial para a monocamada de DPPG. Provavelmente, a grande

incorporação da proteína acarrete em uma elevada fluidez da monocamada, dificultando então o empacotamento do lipídio.

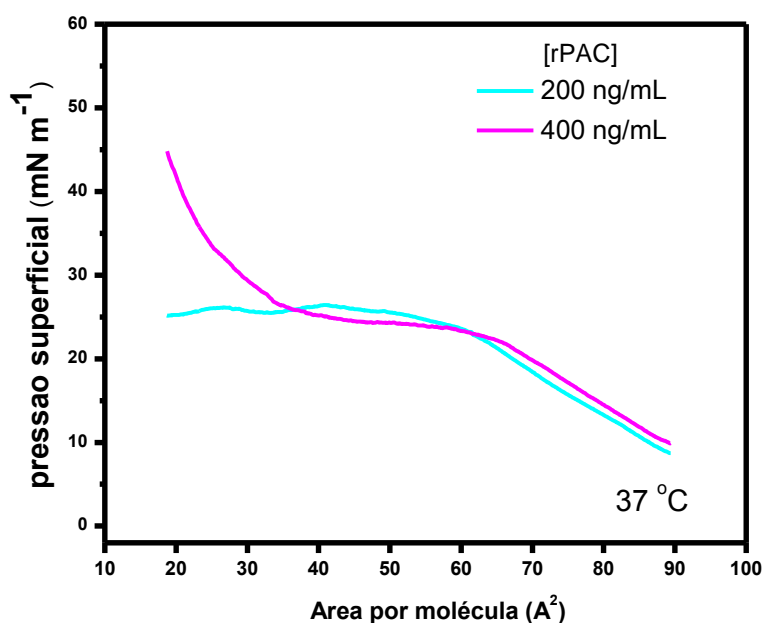


Figura 3.18 - Isoterma de pressão superficial vs. área por molécula para monocamadas de DPPG e rPAC, temperatura 37°C.

A cinética de adsorção do mutante r-PAC Δ^{244} (Figura 3.19 A) se apresentou maior comparada a própria rPAC, que apresenta a região C-terminal preservada, e o mutante r-PAC Δ^{239} (Figura 3.19 B) apresentou atividade superficial maior que as outras duas proteínas. Este resultado indica que, com o aumento de temperatura, o efeito parece ser contrário ao obtido a 20°C. Diferenças na adsorção destes mutantes também foram notadas em relação ao intervalo de tempo em que o sistema atingiu o equilíbrio.

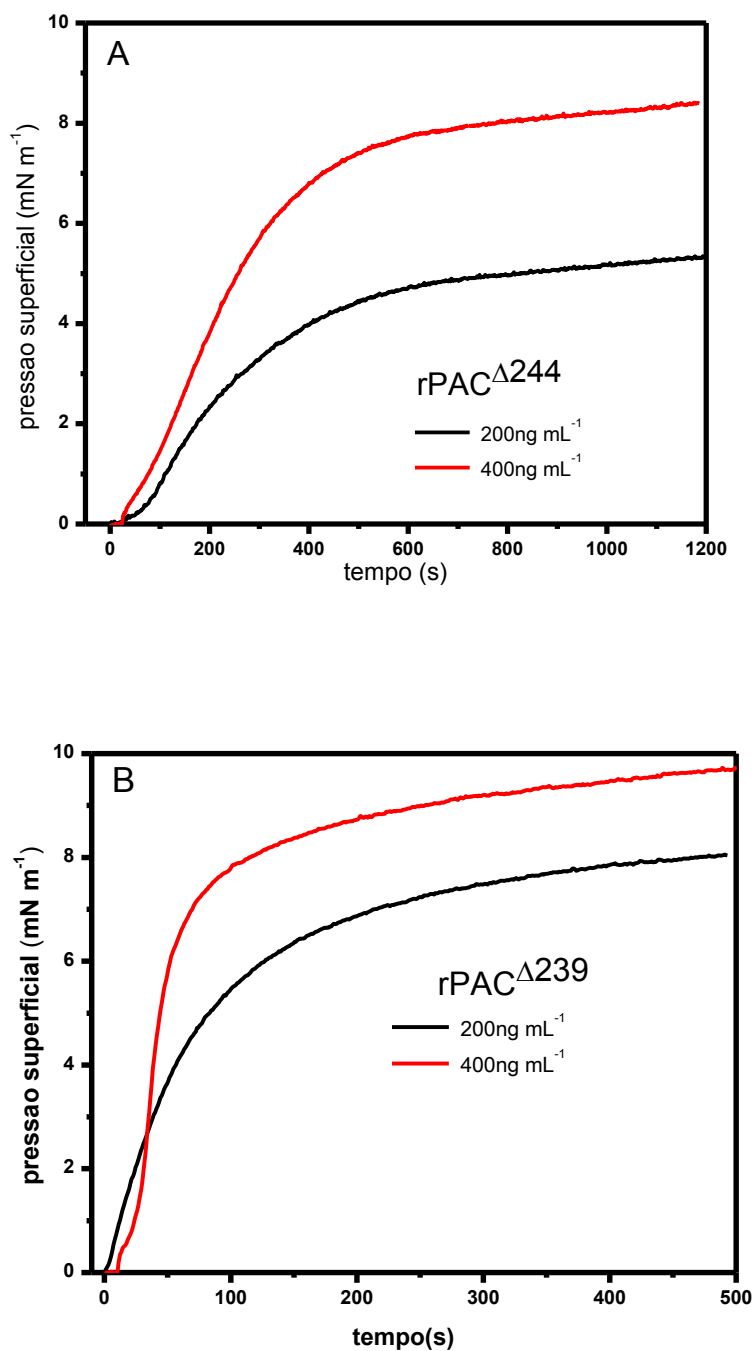


Figura 3.19 - Cinéticas de adsorção da (A) rPAC Δ 244 e (B) rPAC Δ 239 em monocamada de DPPG, temperatura de 37°C

Para o mutante rPAC Δ 236 (Figura 3.20) com a região C-terminal totalmente deletada, os dados de cinética de adsorção mostram uma incorporação mais elevada à interface, conforme observado anteriormente a 20°C (Figura 3.11).

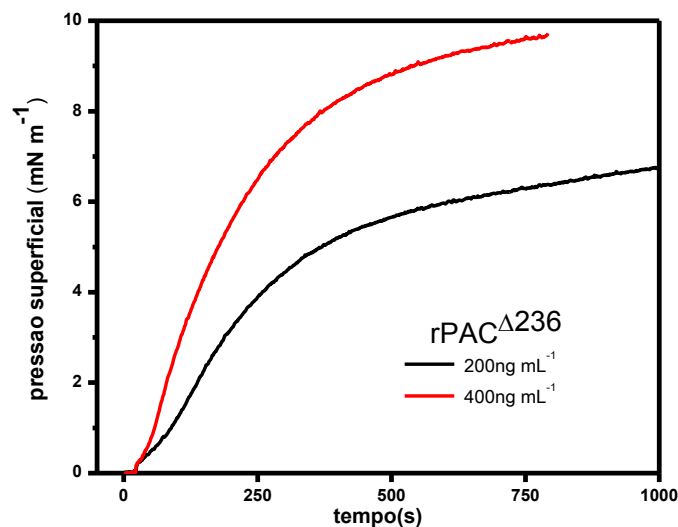


Figura 3.20 - Cinéticas de adsorção da rPAC Δ^{236} em monocamada de DPPG, temperatura de 37°C.

Já as isotermas de pressão superficial da rPAC Δ^{236} (Figura 3.21) mostraram comportamento praticamente idêntico para as duas concentrações estudadas, indicando que para a menor concentração a monocamada já estivesse praticamente saturada. O mesmo patamar anteriormente discutido foi observado, entretanto a valores ligeiramente maiores, próximos de 29 mN m $^{-1}$.

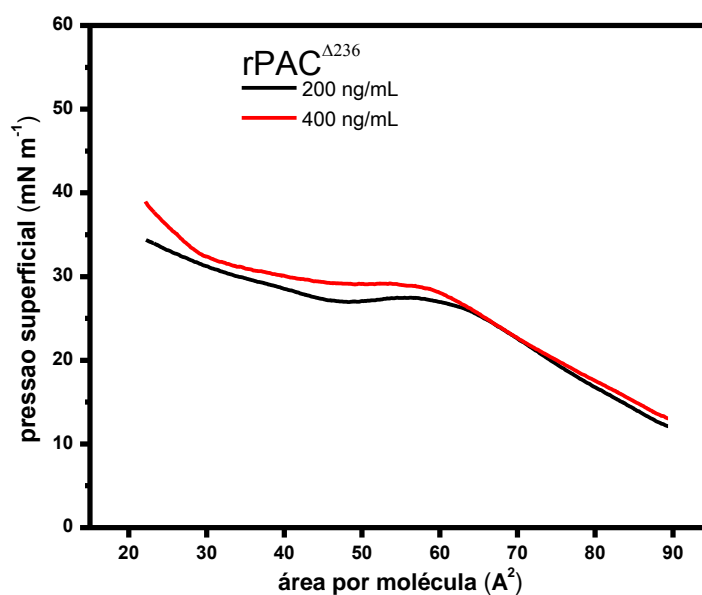


Figura 3.21 - Isoterma de pressão superficial vs. área por molécula para monocamadas de DPPG e rPAC Δ^{236} , temperatura 37°C.

Os resultados obtidos sugerem que a maior adsorção observada para as proteínas à temperatura elevada ocorra pelo aumento da fluidez da membrana, que pode permitir a incorporação de maior quantidade de proteína, visto o menor empacotamento lipídico. Além disso, existe a possibilidade de que a temperatura tenha afetado a estrutura da proteína, levando a uma maior exposição da região hidrofóbica, por exemplo. Entretanto, estudos complementares devem ser feitos para atestar essa hipótese.

3.3.6.5 Análise da interação da rPAC com a monocamada de Langmuir por Espectroscopia na região do infravermelho (PM-IRRAS)

Diante da inviabilidade na utilização de vesículas no estudo da interação das proteínas com lipídios, foi necessária outra estratégia para verificar alterações na estrutura secundária da proteína interagindo com DPPG, que não a espectroscopia de dicroísmo circular. Optou-se então pela técnica de espectroscopia de absorção-reflexão no infravermelho com modulação da polarização (PM-IRRAS), de modo a verificar, face à susceptibilidade da banda de amida I à estrutura secundária da cadeia polipeptídica, possíveis mudanças conformacionais na proteína quando esta se encontrava interagindo com a monocamada lipídica. Estes experimentos foram realizados pela pos-doutoranda Tathiane Nobre e em colaboração com o Prof. Osvaldo Novais de Oliveira Júnior-IFSC.

Realizou-se medidas para monocamadas formadas pelo lipídio DPPG sobre tampão, na presença de rPAC (400 ng mL^{-1}) e do mutante rPAC Δ^{236} , em diferentes pressões superficiais. Na Figura 3.22, é apresentado o espectro de PM-IRRAS para monocamada de DPPG na presença de r-PAC 400 ng mL^{-1} . Utilizou-se a maior concentração de proteína de modo a intensificar o sinal obtido no espectro. Inicialmente, o espectro foi medido durante a incorporação da proteína, após 20 minutos de injeção, entretanto, sem compressão das barreiras. Posterior a adsorção da proteína já ter atingido o valor de equilíbrio (após aproximadamente uma hora), outro espectro foi medido, e por fim, um experimento foi realizado com compressão do filme misto em pressão superficial de 30 mN m^{-1} .

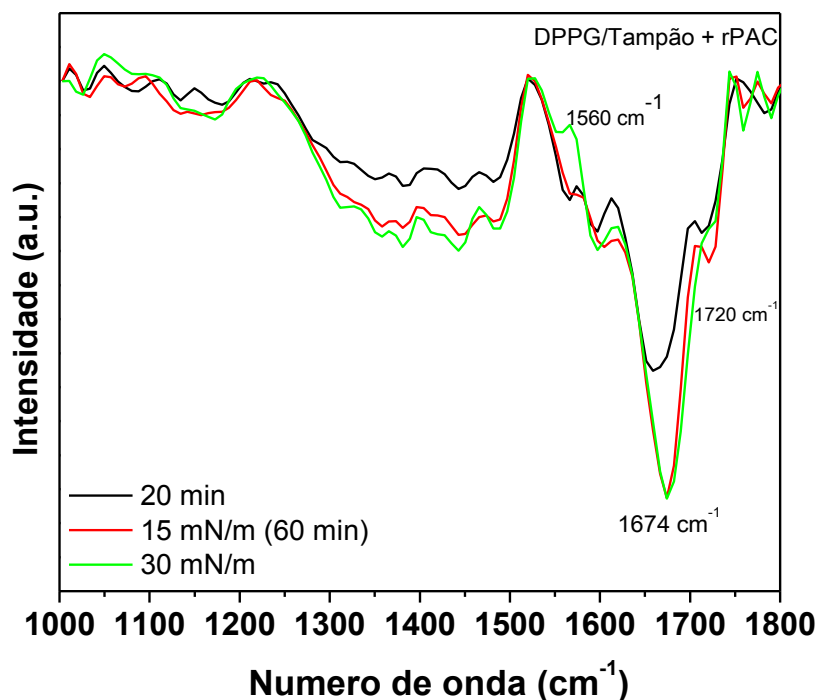


Figura 3.22 - Espectro de PM-IRRAS para monocamada de DPPG em presença de r-PAC (—) 20 minutos após injeção, (—) após equilíbrio de adsorção, (—) compressão de 30 mN m⁻¹.

A Figura mostra claramente o aparecimento de uma banda em 1720 cm⁻¹ característica da vibração C=O, que, conjuntamente com a banda em 1674 cm⁻¹ de amida I caracterizam a presença da proteína. Pode-se notar que ambos os picos se apresentam mais intensos com o aumento da adsorção da proteína, conforme visto para o espectro medido após 20 minutos e após 60 minutos da injeção da proteína. Entretanto, para pressão superficial de 30 mN m⁻¹ a intensidade das bandas permanece inalterada, sugerindo que a proteína permaneça incorporada mesmo após compressão. Outra evidência da incorporação da proteína é notada pelo aparecimento de uma banda em 1560 cm⁻¹ atribuída ao estiramento amida II, presente apenas no espectro obtido após compressão da monocamada.

A banda em 1674 cm⁻¹ é característica de estiramento C=O (amida I) de proteínas que apresentam estrutura predominante do tipo folha- β . Alguns autores ainda atribuem esta banda a estruturas *folha- β* intermoleculares, indicando que a proteína possa estar adsorvendo sobre ela própria, conforme já verificado para outras proteínas em filmes de Langmuir. Além disso, a intensidade relativa abaixo da linha de base, como é o caso da Figura 3.22, indica que a vibração está posicionada paralelamente à interface lipídica. Já a banda em 1720 cm⁻¹ foi anteriormente observada para monocamadas de DPPG, e é correspondente ao estiramento

C=O da cabeça polar do lipídio, ocorrendo apenas quando este se encontra na presença de grupos peptídicos.

A banda em 1520 cm^{-1} é correspondente à região de amida II (N-H e C-N), e neste caso, corresponde ao estiramento proveniente de estruturas do tipo β . Todos estes dados encontram-se de acordo com a estrutura secundária obtida através da técnica de espectroscopia de dicroísmo circular, visto a contribuição de estruturas β .

Os resultados acima sugerem que a proteína adsorva na interface em grande quantidade, de modo paralelo, com estrutura predominantemente do tipo β , fato que está em concordância com a expansão observada nas curvas de π -A.

A Figura 3.23 traz o espectro de PM-IRRAS para o mutante rPAC $^{\Delta 236}$, na concentração de 400 ng mL^{-1} .

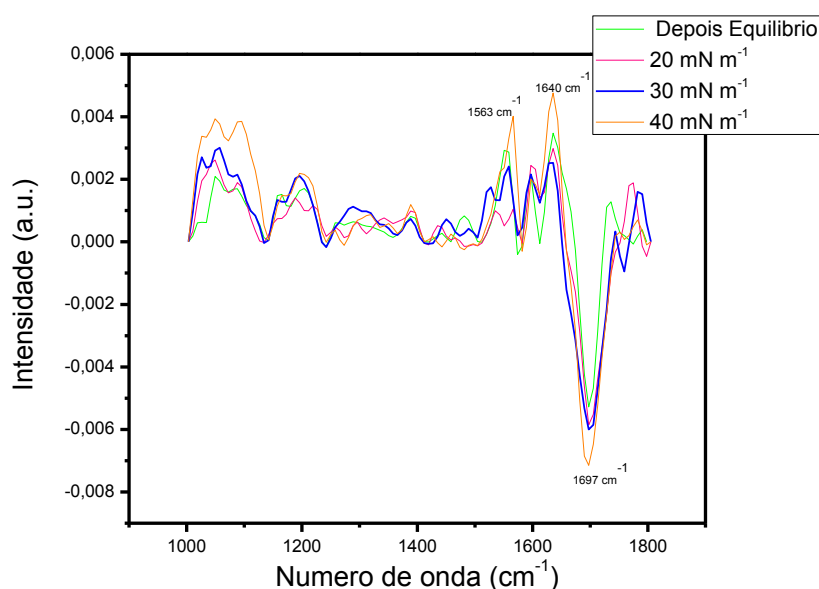


Figura 3.23 - Espectro de PM-IRRAS para monocamada de DPPG em presença do mutante rPAC $^{\Delta 236}$

Os espectros obtidos para a rPAC $^{\Delta 236}$ indicam a banda referente ao estiramento amida II em 1563 cm^{-1} . Entretanto, as maiores diferenças com relação ao espectro obtido para rPAC podem ser verificadas pelo aparecimento da banda de amida I em 1640 cm^{-1} , positiva, bem como da intensa banda negativa em 1697 cm^{-1} . A banda em 1640 cm^{-1} corresponde a estruturas desordenadas, ao passo que a banda em 1697 cm^{-1} se trata de folhas- β antiparalelas.

3.4 CONCLUSÕES

O estudo apresentado neste capítulo refere-se a investigação da interação da cadeia-A da pulchellina com sistemas modelo de biomembranas. Apesar de algumas semelhanças com o comportamento observado para a cadeia-A da ricina (RTA), este estudo mostrou com maiores detalhes como esta interação ocorre.

A adsorção da rPAC à monocamada lipídica foi preferencial para lipídios carregados negativamente, em comparação aos zwitteriônicos. Com relação aos mutantes, conforme maior a deleção da região C-terminal, menor a interação com a monocamada, avaliada em termos da cinética de adsorção, bem como das isotermas de pressão superficial. Entretanto, a proteína rPAC^{Δ236}, completamente deletada nesta região, apresentou um comportamento bastante distinto. Os espectros de PM-IRRAS indicaram que rPAC e rPAC^{Δ236} interagem com a membrana, porém o fazem envolvendo regiões distintas, o que sugere que a deleção da região C-terminal force a proteína a interagir por uma outra porção. Assim, as formas truncadas na porção C-terminal comprovaram o papel fundamental desta na interação da proteína com a monocamada, sugerindo que o mesmo mecanismo de interação deva ocorrer *in vivo* durante a translocação da proteína através da membrana do RE.

Referências

- 1 AUDI, J.;M. BELSON;M. PATEL;J. SCHIER.J. OSTERLOH, Ricin poisoning: a comprehensive review. *JAMA*, v. 294. n. 18: p. 2342-51.2005.
- 2 OLSNES, S., The history of ricin, abrin and related toxins. *Toxicon*, v. 44. n. 4: p. 361-70.2004.
- 3 LIN, J.Y.;W.Y. KAO;K.Y. TSERNG;C.C. CHEN.T.C. TUNG, Effect of crystalline abrin on the biosynthesis of protein, RNA, and DNA in experimental tumors. *Cancer Res*, v. 30. n. 9: p. 2431-3.1970.
- 4 LIN, J.Y.;K. LIU;C.C. CHEN.T.C. TUNG, Effect of Crystalline Ricin on Biosynthesis of Protein, Rna, and DNA in Experimental Tumor Cells. *Cancer Research*, v. 31. n. 7: p. 921-&.1971.
- 5 OLSNES, S..A. PIHL, Different biological properties of the two constituent peptide chains of ricin, a toxic protein inhibiting protein synthesis. *Biochemistry*, v. 12. n. 16: p. 3121-6.1973.
- 6 OLSNES, S..A. PIHL, Isolation and properties of abrin: a toxic protein inhibiting protein synthesis. Evidence for different biological functions of its two constituent-peptide chains. *Eur J Biochem*, v. 35. n. 1: p. 179-85.1973.
- 7 OLSNES, S.;K. REFSNES.A. PIHL, Mechanism of action of the toxic lectins abrin and ricin. *Nature*, v. 249. n. 458: p. 627-31.1974.
- 8 OLSNES, S.;E. SALTVEDT.A. PIHL, Isolation and comparison of galactose-binding lectins from *Abrus precatorius* and *Ricinus communis*. *J Biol Chem*, v. 249. n. 3: p. 803-10.1974.

9 MONTANARO, L.;S. SPERTI.F. STIRPE, Inhibition by ricin of protein synthesis in vitro. Ribosomes as the target of the toxin. *Biochem J*, v. 136. n. 3: p. 677-83.1973.

10 SPERTI, S.;L. MONTANARO;A. MATTIOLI.F. STIRPE, Inhibition by ricin of protein synthesis in vitro: 60 S ribosomal subunit as the target of the toxin. *Biochem J*, v. 136. n. 3: p. 813-5.1973.

11 OLSNES, S..A. PIHL, Treatment of abrin and ricin with -mercaptoethanol opposite effects on their toxicity in mice and their ability to inhibit protein synthesis in a cell-free system. *FEBS Lett*, v. 28. n. 1: p. 48-50.1972.

12 OLSNES, S..A. PIHL, Inhibition of peptide chain elongation. *Nature*, v. 238. n. 5365: p. 459-61.1972.

13 OLSNES, S..A. PIHL, Ricin - a potent inhibitor of protein synthesis. *FEBS Lett*, v. 20. n. 3: p. 327-329.1972.

14 OLSNES, S..A. PIHL, Possible function of the protein bound to nuclear complementary RNA. *FEBS Lett*, v. 20. n. 2: p. 181-183.1972.

15 OLSNES, S.;U. SPAEREN;R. HEIBERG.A. PIHL, Protein synthesis in the presence of non-ionic detergents in a cell-free system from rabbit reticulocytes. *Biochem J*, v. 130. n. 1: p. 297-9.1972.

16 OLSNES, S.;C. FERNANDEZ-PUENTES;L. CARRASCO.D. VAZQUEZ, Ribosome inactivation by the toxic lectins abrin and ricin. Kinetics of the enzymic activity of the toxin A-chains. *Eur J Biochem*, v. 60. n. 1: p. 281-8.1975.

17 ENDO, Y.;K. MITSUI;M. MOTIZUKI.K. TSURUGI, 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*, v. 262. n. 12: p. 5908-5912.1987.

18 ENDO, Y..K. TSURUGI, Rna N-Glycosidase Activity of Ricin a-Chain - Mechanism of Action of the Toxic Lectin Ricin on Eukaryotic Ribosomes. *Journal of Biological Chemistry*, v. 262. n. 17: p. 8128-8130.1987.

19 HARTLEY, M.R.;G. LEGNAME;R. OSBORN;Z.C. CHEN.J.M. LORD, Single-Chain Ribosome Inactivating Proteins from Plants Depurinate Escherichia-Coli 23S Ribosomal-Rna. *Febs Letters*, v. 290. n. 1-2: p. 65-68.1991.

20 MONTFORT, W.;J.E. VILAFRANCA;A.F. MONZINGO;S.R. ERNST;B. KATZIN;E. RUTENBER;N.H. XUONG;R. HAMLIN.J.D. ROBERTUS, The 3-Dimensional Structure of Ricin at 2.8-Å. *Journal of Biological Chemistry*, v. 262. n. 11: p. 5398-5403.1987.

21 GIRBES, T.;J.M. FERRERAS;F.J. ARIAS.F. STIRPE, Description, distribution, activity and phylogenetic relationship of ribosome-inactivating proteins in plants, fungi and bacteria. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, v. 4. n. 5: p. 461-476.2004.

22 STIRPE, F..M.G. BATTELLI, Ribosome-inactivating proteins: progress and problems. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 63. n. 16: p. 1850-1866.2006.

23 BAGGA, S.;D. SETH.J.K. BATRA, The cytotoxic activity of ribosome-inactivating protein saporin-6 is attributed to its rRNA N-glycosidase and internucleosomal DNA fragmentation activities. *J Biol Chem*, v. 278. n. 7: p. 4813-20.2003.

24 LIN, Q.;Z.C. CHEN;J.F. ANTONIW.R.F. WHITE, Isolation and Characterization of a cDNA Clone Encoding the Antiviral Protein from *Phytolaccaamericana*. *Plant Molecular Biology*, v. 17. n. 4: p. 609-614.1991.

25 CHOW, T.P.;R.A. FELDMAN;M. LOVETT.M. PIATAK, Isolation and DNA-Sequence of a Gene Encoding Alpha-Trichosanthin, a Type-I Ribosome-Inactivating Protein. *Journal of Biological Chemistry*, v. 265. n. 15: p. 8670-8674.1990.

26 JOLMA, A.;T. KIVIOJA;J. TOIVONEN;L. CHENG;G. WEI;M. ENGE;M. TAIPALE;J.M. VAQUERIZAS;J. YAN;M.J. SILLANPAA;M. BONKE;K. PALIN;S. TALUKDER;T.R. HUGHES;N.M. LUSCOMBE, *et al.*, Multiplexed massively parallel SELEX for characterization of human transcription factor binding specificities. *Genome Res*, v. 20. n. 6: p. 861-73.2010.

27 MOTTO, M.E. LUPOTTO, The genetics and properties of cereal ribosome-inactivating proteins. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, v. 4. n. 5: p. 493-503.2004.

28 STIRPE, F.;L. BARBIERI;M.G. BATTELLI;M. SORIA.D.A. LAPPI, Ribosome-Inactivating Proteins from Plants - Present Status and Future-Prospects. *Bio-Technology*, v. 10. n. 4: p. 405-412.1992.

29 BARBIERI, L.;M.G. BATTELLI.F. STIRPE, Ribosome-Inactivating Proteins from Plants. *Biochimica Et Biophysica Acta*, v. 1154. n. 3-4: p. 237-282.1993.

30 BEAUMELLE, B.;M. ALAMI.C.R. HOPKINS, Atp-Dependent Translocation of Ricin across the Membrane of Purified Endosomes. *Journal of Biological Chemistry*, v. 268. n. 31: p. 23661-23669.1993.

31 STIRPE, F.;R.F. LEGG;L.J. ONYON;P. ZISKA.H. FRANZ, Inhibition of Protein-Synthesis by a Toxic Lectin from *Viscum album* L (Mistletoe). *Biochemical Journal*, v. 190. n. 3: p. 843-845.1980.

32 OLSNES, S.;K. SANDVIG;K. EIKLID.A. PIHL, Properties and action mechanism of the toxic lectin modeccin: interaction with cell lines resistant to modeccin, abrin, and ricin. *J Supramol Struct*, v. 9. n. 1: p. 15-25.1978.

33 LING, J.;W.Y. LIU.T.P. WANG, Simultaneous Existence of 2 Types of Ribosome-Inactivating Proteins in the Seeds of *Cinnamomum camphora* - Characterization of the Enzymatic-Activities of These Cytotoxic Proteins. *Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology*, v. 1252. n. 1: p. 15-22.1995.

34 VAN DAMME, E.J.M.;Q. HAO;D. CHARELS;A. BARRE;P. ROUGE;F. VAN LEUVEN.W.J. PEUMANS, Characterization and molecular cloning of two different type 2 ribosome-inactivating proteins from the monocotyledonous plant *Polygonatum multiflorum*. *European Journal of Biochemistry*, v. 267. n. 9: p. 2746-2759.2000.

35 HAO, Q.;E.J.M. VAN DAMME;B. HAUSE;A. BARRE;Y. CHEN;P. ROUGE.W.J. PEUMANS, Iris bulbs express type 1 and type 2 ribosome-inactivating proteins with unusual properties. *Plant Physiology*, v. 125. n. 2: p. 866-876.2001.

36 CASTILHO, P.V.;L.S. GOTO;L.M. ROBERTS.A.P. ARAUJO, Isolation and characterization of four type 2 ribosome inactivating pulchellin isoforms from *Abrus pulchellus* seeds. *FEBS J*, v. 275. n. 5: p. 948-59.2008.

37 GIRBES, T.;L. CITORES;J.M. FERRERAS;M.A. ROJO;R. IGLESIAS;R. MUNOZ;F.J. ARIAS;M. CALONGE;J.R. GARCIA.E. MENDEZ, Isolation and Partial Characterization of Nigrin-B, a Nontoxic Novel Type-2 Ribosome-Inactivating Protein from the Bark of *Sambucusnigra* L. *Plant Molecular Biology*, v. 22. n. 6: p. 1181-1186.1993.

38 GIRBES, T.;L. CITORES;R. IGLESIAS;J.M. FERRERAS;R. MUNOZ;M.A. ROJO;F.J. ARIAS;J.R. GARCIA;E. MENDEZ.M. CALONGE, Ebulin-1, a Nontoxic Novel Type-2 Ribosome-Inactivating Protein from *Sambucusnigra* L Leaves. *Journal of Biological Chemistry*, v. 268. n. 24: p. 18195-18199.1993.

39 BASS, H.W.;C. WEBSTER;G.R. OBRIAN;J.K.M. ROBERTS.R.S. BOSTON, A Maize Ribosome-Inactivating Protein Is Controlled by the Transcriptional Activator Opaque-2. *Plant Cell*, v. 4. n. 2: p. 225-234.1992.

40 WALSH, T.A.;A.E. MORGAN.T.D. HEY, Characterization and Molecular-Cloning of a Proenzyme Form of a Ribosome-Inactivating Protein from Maize - Novel Mechanism of Proenzyme Activation by Proteolytic Removal of a 2.8-Kilodalton Internal Peptide Segment. *Journal of Biological Chemistry*, v. 266. n. 34: p. 23422-23427.1991.

41 GIRBES, T.;C. DETORRE;R. IGLESIAS;J.M. FERRERAS.E. MENDEZ, RIP for viruses. *Nature*, v. 379. n. 6568: p. 777-778.1996.

42 PEUMANS, W.J.;Q. HAO.E.J.M. VAN DAMME, Ribosome-inactivating proteins from plants: more than RNA N-glycosidases? *Faseb Journal*, v. 15. n. 9: p. 1493-1506.2001.

43 PEUMANS, W.E. VAN DAMME, *Evolution of Plant Ribosome-Inactivating Proteins*, in *Toxic Plant Proteins*, J.M. Lord and M.R. Hartley, Editors. 2010, Springer Berlin / Heidelberg. p. 1-26.

44 HARTLEY, M., *Enzymatic Activities of Ribosome-Inactivating Proteins*, in *Toxic Plant Proteins*, J.M. Lord and M.R. Hartley, Editors. 2010, Springer Berlin / Heidelberg. p. 41-54.

- 45 BATTELLI, M.G.;S. MUSIANI;L. BUONAMICI;S. SANTI;M. RICCIO;N.M. MARALDI;T. GIBBES.F. STIRPE, Interaction of volkensin with HeLa cells: binding, uptake, intracellular localization, degradation and exocytosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 61. n. 15: p. 1975-1984.2004.
- 46 VAN DEURS, B.;K. SANDVIG;O.W. PETERSEN;S. OLSNES;K. SIMONS.G. GRIFFITHS, Estimation of the amount of internalized ricin that reaches the trans-Golgi network. *Journal of Cell Biology*, v. 106. n. 2: p. 253-67.1988.
- 47 ARGENT, R.H.;A.M. PARROTT;P.J. DAY;L.M. ROBERTS;P.G. STOCKLEY;J.M. LORD.S.E. RADFORD, Ribosome-mediated folding of partially unfolded ricin A-chain. *Journal of Biological Chemistry*, v. 275. n. 13: p. 9263-9269.2000.
- 48 EIKLID, K.;S. OLSNES.A. PIHL, Entry of lethal doses of abrin, ricin and modeccin into the cytosol of HeLa cells. *Exp Cell Res*, v. 126. n. 2: p. 321-6.1980.
- 49 ROBERTS, L.M.J.M. LORD, Ribosome-inactivating proteins: Entry into mammalian cells and intracellular routing. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, v. 4. n. 5: p. 505-512.2004.
- 50 WATSON, P..R.A. SPOONER, Toxin entry and trafficking in mammalian cells. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 58. n. 15: p. 1581-1596.2006.
- 51 DEEKS, E.D.;J.P. COOK;P.J. DAY;D.C. SMITH;L.M. ROBERTS.J.M. LORD, The low lysine content of ricin A chain reduces the risk of proteolytic degradation after translocation from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Biochemistry*, v. 41. n. 10: p. 3405-3413.2002.
- 52 WERNER, E.D.;J.L. BRODSKY.A.A. MCCRACKEN, Proteasome-dependent endoplasmic reticulum-associated protein degradation: An unconventional route to a familiar fate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 93. n. 24: p. 13797-13801.1996.
- 53 BREITSCHOPF, K.;E. BENGAL;T. ZIV;A. ADMON.A. CIECHANOVER, A novel site for ubiquitination: the N-terminal residue, and not internal lysines of MyoD, is essential for conjugation and degradation of the protein. *Embo Journal*, v. 17. n. 20: p. 5964-5973.1998.

54 HAZES, B.R.J. READ, Accumulating evidence suggests that several AB-toxins subvert the endoplasmic reticulum-associated protein degradation pathway to enter target cells. *Biochemistry*, v. 36. n. 37: p. 11051-11054.1997.

55 DAY, P.J.;T.J.T. PINHEIRO;L.M. ROBERTS.J.M. LORD, Binding of ricin A-chain to negatively charged phospholipid vesicles leads to protein structural changes and destabilizes the lipid bilayer. *Biochemistry*, v. 41. n. 8: p. 2836-2843.2002.

56 SLOMINSKA-WOJEWODZKA, M.;T.F. GREGERS;S. WALCHLI.K. SANDVIG, EDEM is involved in retrotranslocation of ricin from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Molecular Biology of the Cell*, v. 17. n. 4: p. 1664-1675.2006.

57 SIMPSON, J.C.;J.M. LORD.L.M. ROBERTS, Point Mutations in the Hydrophobic C-Terminal Region of Ricin-a Chain Indicate That Pro250 Plays a Key Role in Membrane Translocation. *European Journal of Biochemistry*, v. 232. n. 2: p. 458-463.1995.

58 CHADDOCK, J.A.;L.M. ROBERTS;B. JUNGNICHEL.J.M. LORD, A Hydrophobic Region of Ricin-a-Chain Which May Have a Role in Membrane Translocation Can Function as an Efficient Noncleaved Signal Peptide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 217. n. 1: p. 68-73.1995.

59 MCGRATH, M.S.;K.M. HWANG;S.E. CALDWELL;I. GASTON;K.C. LUK;P. WU;V.L. NG;S. CROWE;J. DANIELS;J. MARSH.ET AL., GLQ223: an inhibitor of human immunodeficiency virus replication in acutely and chronically infected cells of lymphocyte and mononuclear phagocyte lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 86. n. 8: p. 2844-8.1989.

60 ZARLING, J.M.;P.A. MORAN;O. HAFFAR;M. DIEGEL;D.E. MYERS;V. KUELBECK;J.A. LEDBETTER.F.M. UCKUN, Inhibition of HIV-1 replication in seropositive patients' CD4+ T-cells by pokeweed antiviral protein-monoclonal antibody conjugates. *Int J Immunopharmacol*, v. 13 Suppl 1. n.: p. 63-8.1991.

61 ZARLING, J.M.;P.A. MORAN;O. HAFFAR;J. SIAS;D.D. RICHMAN;C.A. SPINA;D.E. MYERS;V. KUEBELBECK;J.A. LEDBETTER.F.M. UCKUN, Inhibition of HIV replication by pokeweed antiviral protein targeted to CD4+ cells by monoclonal antibodies. *Nature*, v. 347. n. 6288: p. 92-5.1990.

62 BYERS, V.S.;A.S. LEVIN;A. MALVINO;L. WAITES;R.A. ROBINS.R.W. BALDWIN, A phase II study of effect of addition of trichosanthin to zidovudine in patients with HIV disease and failing antiretroviral agents. *AIDS Res Hum Retroviruses*, v. 10. n. 4: p. 413-20.1994.

63 KROLICK, K.A.;C. VILLEMEZ;P. ISAKSON;J.W. UHR.E.S. VITETTA, Selective killing of normal or neoplastic B cells by antibodies coupled to the A chain of ricin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 77. n. 9: p. 5419-23.1980.

64 BLYTHMAN, H.E.;P. CASELLAS;O. GROS;P. GROS;F.K. JANSEN;F. PAOLUCCI;B. PAU.H. VIDAL, Immunotoxins: hybrid molecules of monoclonal antibodies and a toxin subunit specifically kill tumour cells. *Nature*, v. 290. n. 5802: p. 145-6.1981.

65 O'HARE, M.;L.M. ROBERTS;P.E. THORPE;G.J. WATSON;B. PRIOR.J.M. LORD, Expression of ricin A chain in Escherichia coli. *FEBS Lett*, v. 216. n. 1: p. 73-8.1987.

66 WOOD, K.A.;J.M. LORD;E.J. WAWRZYNCZAK.M. PIATAK, Preproabrin: genomic cloning, characterisation and the expression of the A-chain in Escherichia coli. *Eur J Biochem*, v. 198. n. 3: p. 723-32.1991.

67 BENATTI, L.;M.B. SACCARDO;M. DANI;G. NITTI;M. SASSANO;R. LORENZETTI;D.A. LAPPI.M. SORIA, Nucleotide sequence of cDNA coding for saporin-6, a type-1 ribosome-inactivating protein from Saponaria officinalis. *Eur J Biochem*, v. 183. n. 2: p. 465-70.1989.

68 KATAOKA, J.;H. AGO;N. HABUKA;M. FURUNO;C. MASUTA;M. MIYANO.A. KOIWAI, Expression of a pokeweed antiviral protein in Escherichia coli and its characterization. *FEBS Lett*, v. 320. n. 1: p. 31-4.1993.

69 LEGNAME, G.;G. GROMO;J.M. LORD;N. MONZINI.D. MODENA, Expression and Activity of Pre-dianthin 30 and Dianthin 30. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 192. n. 3: p. 1230-1237.1993.

70 NOLAN, P.A.;D.A. GARRISON.M. BETTER, Cloning and expression of a gene encoding gelonin, a ribosome-inactivating protein from *Gelonium multiflorum*. *Gene*, v. 134. n. 2: p. 223-7.1993.

71 GAWLAK, S.L.;M. NEUBAUER;H.E. KLEI;C.Y. CHANG;H.M. EINSPAHR.C.B. SIEGALL, Molecular, biological, and preliminary structural analysis of recombinant bryodin 1, a ribosome-inactivating protein from the plant *Bryonia dioica*. *Biochemistry*, v. 36. n. 11: p. 3095-103.1997.

72 SILVA, A.L.C.;L.S. GOTO;A.R. DINARTE;D. HANSEN;R.A. MOREIRA;L.M. BELTRAMINI.A.P.U. ARAUJO, Pulchellin, a highly toxic type 2 ribosome-inactivating protein from *Abrus pulchellus* - Cloning, heterologous expression of A-chain and structural studies. *Febs Journal*, v. 272. n. 5: p. 1201-1210.2005.

73 FRACASSO, G.;F. STIRPE.M. COLOMBATTI, *Ribosome-Inactivating Protein-Containing Conjugates for Therapeutic Use*, in *Toxic Plant Proteins*, J.M. Lord and M.R. Hartley, Editors. 2010, Springer Berlin / Heidelberg. p. 225-263.

74 RAMOS, M.V.;D.M. MOTA;C.R. TEIXEIRA;B.S. CAVADA.R.A. MOREIRA, Isolation and partial characterisation of highly toxic lectins from *Abrus pulchellus* seeds. *Toxicon*, v. 36. n. 3: p. 477-484.1998.

75 TAHIROV, T.H.O.;T.H. LU;Y.C. LIAW;S.C. CHU.J.Y. LIN, A New Crystal Form of Abrin-a from the Seeds of *Abrus precatorius*. *Journal of Molecular Biology*, v. 235. n. 3: p. 1152-1153.1994.

76 CASTILHO, P.V.;L.S. GOTO;L.M. ROBERTS.A.P.U. ARAUJO, Isolation and characterization of four type 2 ribosome inactivating pulchellin isoforms from *Abrus pulchellus* seeds. *Febs Journal*, v. 275. n. 5: p. 948-959.2008.

77 ARAUJO, A.P., CASTILHO, V.P., GOTO, S. L, *Ribosome-inactivating proteins from Abrus pulchellus*, in *Toxic Plant Proteins*, J.M. Lord, Hartley, M.R., Editor. 2010.

78 JOLLIFFE, N.A.;A. DI COLA;C.J. MARSDEN;J.M. LORD;A. CERIOTTI;L. FRIGERIO.L.M. ROBERTS, The N-terminal ricin propeptide influences the fate of ricin A-chain in tobacco protoplasts. *J Biol Chem*, v. 281. n. 33: p. 23377-85.2006.

79 JOLLIFFE, N.A.;A. CERIOTTI;L. FRIGERIO.L.M. ROBERTS, The position of the proricin vacuolar targeting signal is functionally important. *Plant Mol Biol*, v. 51. n. 5: p. 631-41.2003.

80 OLSNES, S., [Diphtheria toxin--a specific inhibitor of protein synthesis]. *Tidsskr Nor Laegeforen*, v. 93. n. 4: p. 223-7.1973.

81 CASTILHO, P.V., Isolamento, caracterização estrutural, atividade biológica e investigações do tráfego celular de isoformas da Pulchellina, in DGEv. 2008, UFSCar: São Carlos. p. 131.

82 BAGARIA, A.;K. SURENDRANATH;U.A. RAMAGOPAL;S. RAMAKUMAR.A.A. KARANDE, Structure-function analysis and insights into the reduced toxicity of *Abrus precatorius* agglutinin I in relation to abrin. *Journal of Biological Chemistry*, v. 281. n. 45: p. 34465-34474.2006.

83 MURZIN, A.G.;A.M. LESK.C. CHOTHIA, Beta-Trefoil Fold Patterns of Structure and Sequence in the Kunitz Inhibitors Interleukins-1-Beta and 1-Alpha and Fibroblast Growth-Factors. *Journal of Molecular Biology*, v. 223. n. 2: p. 531-543.1992.

84 GOTO, L.S.;P.V. CASTILHO;M.R. COMINETTI;H.S. SELISTRE-ARAUJO.A.P.U. ARAUJO, Endocytosis of pulchellin and its recombinant B-chain into K-562 cells: Binding and uptake studies. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects*, v. 1770. n. 12: p. 1660-1666.2007.

85 BOREVITZ, J.O..J.R. ECKER, Plant genomics: The third wave. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, v. 5. n.: p. 443-477.2004.

86 ALTSCHUL, S.F.;W. GISH;W. MILLER;E.W. MEYERS.D.J. LIPMAN, Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology*, v. 215. n.: p. 403-410.1990.

87 VETTORE, A.L.;F.R. DA SILVA;E.L. KEMPER;G.M. SOUZA;A.M. DA SILVA;M.I. FERRO;F. HENRIQUE-SILVA;E.A. GIGLIOTI;M.V. LEMOS;L.L. COUTINHO;M.P. NOBREGA;H. CARRER;S.C. FRANCA;M. BACCI JUNIOR;M.H. GOLDMAN, *et al.*, Analysis and functional annotation of an expressed sequence tag collection for tropical crop sugarcane. *Genome Res*, v. 13. n. 12: p. 2725-35.2003.

88 SANGER, F.;S. NICKLEN.A.R. COULSON, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 74. n. 12: p. 5463-7.1977.

89 SAMBROOK, J.F., E. F.; MANIATIS, T, Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.

90 CHENNA, R.;H. SUGAWARA;T. KOIKE;R. LOPEZ;T.J. GIBSON;D.G. HIGGINS.J.D. THOMPSON, Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res*, v. 31. n. 13: p. 3497-500.2003.

91 LAEMMLI, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227. n. 5259: p. 680-5.1970.

92 SOARES-COSTA, A.;L.M. BELTRAMINI;O.H. THIEMANN.F. HENRIQUE-SILVA, A sugarcane cystatin: recombinant expression, purification, and antifungal activity. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 296. n. 5: p. 1194-9.2002.

93 LANGER, M.;M. ROTHE;J. ECK;B. MÖCKEL.H. ZINKE, A Nonradioactive Assay for Ribosome-Inactivating Proteins. *Analytical Biochemistry*, v. 243. n. 1: p. 150-153.1996.

94 AYUB, M.J.;C.R. SMULSKI;K.W. MA;M.J. LEVIN;P.C. SHAW.K.B. WONG, The C-terminal end of P proteins mediates ribosome inactivation by trichosanthin but does not affect the pokeweed antiviral protein activity. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 369. n. 2: p. 314-9.2008.

95 ENDO, Y.;Y.L. CHAN;A. LIN;K. TSURUGLI.G. WOOL, The Cytotoxins Alpha-Sarcin and Ricin Retain Their Specificity When Tested on a Synthetic Oligoribonucleotide (35-Mer) That Mimics a Region of 28-S Ribosomal Ribonucleic-Acid. *Journal of Biological Chemistry*, v. 263. n. 17: p. 7917-7920.1988.

96 LAMB, F.I.;L.M. ROBERTS.J.M. LORD, Nucleotide sequence of cloned cDNA coding for preporicin. *Eur J Biochem*, v. 148. n. 2: p. 265-70.1985.

97 KOZAK, M., Evaluation of the "scanning model" for initiation of protein synthesis in eucaryotes. *Cell*, v. 22. n. 1 Pt 1: p. 7-8.1980.

98 LUKASZEWICZ, M.;M. FEUERMANN;B. JÉROUVILLE;A. STAS.M. BOUTRY, In vivo evaluation of the context sequence of the translation initiation codon in plants. *Plant Science*, v. 154. n. 1: p. 89-98.2000.

99 LUTCKE, H.A.;K.C. CHOW;F.S. MICKEL;K.A. MOSS;H.F. KERN.G.A. SCHEELE, Selection of AUG initiation codons differs in plants and animals. *Embo Journal*, v. 6. n. 1: p. 43-8.1987.

100 LEHTO, K.W.O. DAWSON, Changing the start codon context of the 30K gene of tobacco mosaic virus from "weak" to "strong" does not increase expression. *Virology*, v. 174. n. 1: p. 169-76.1990.

101 FRIGERIO, L.;N.A. JOLLIFFE;A. DI COLA;D.H. FELIPE;N. PARIS;J.M. NEUHAUS;J.M. LORD;A. CERIOTTI.L.M. ROBERTS, The internal propeptide of the ricin precursor carries a sequence-specific determinant for vacuolar sorting. *Plant Physiology*, v. 126. n. 1: p. 167-75.2001.

102 EMANUELSSON, O.;S. BRUNAK;G. VON HEIJNE.H. NIELSEN, Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat. Protocols*, v. 2. n. 4: p. 953-971.2007.

103 FERRINI, J.B.;M. MARTIN;M.P. TAUPIAC.B. BEAUMELLE, Expression of Functional Ricin B Chain using the Baculovirus System. *European Journal of Biochemistry*, v. 233. n. 3: p. 772-777.1995.

104 MATSUOKA, K..K. NAKAMURA, Large alkyl side-chains of isoleucine and leucine in the NPIRL region constitute the core of the vacuolar sorting determinant of sporamin precursor. *Plant Mol Biol*, v. 41. n. 6: p. 825-35.1999.

105 MATSUOKA, K..J.-M. NEUHAUS, Cis-elements of protein transport to the plant vacuoles. *Journal of Experimental Botany*, v. 50. n. 331: p. 165-174.1999.

106 TOULOUPAKIS, E.;R. GESSMANN;K. KAVELAKI;E. CHRISTOFAKIS;K. PETRATOS.D.F. GHANOTAKIS, Isolation, characterization, sequencing and crystal structure of charybdin, a type 1 ribosome-inactivating protein from *Charybdis maritima* agg. *Febs Journal*, v. 273. n. 12: p. 2684-92.2006.

107 KIM, Y..J.D. ROBERTUS, Analysis of several key active site residues of ricin A chain by mutagenesis and X-ray crystallography. *Protein Engineering*, v. 5. n. 8: p. 775-779.1992.

108 FRANKEL, A.;P. WELSH;J. RICHARDSON.J.D. ROBERTUS, Role of arginine 180 and glutamic acid 177 of ricin toxin A chain in enzymatic inactivation of ribosomes. *Mol. Cell. Biol.*, v. 10. n. 12: p. 6257-6263.1990.

109 VAN DAMME, E.J.;A. BARRE;P. ROUGÉ;F. VAN LEUVEN.W.J. PEUMANS, The NeuAc(α -2,6)-Gal/GalNAc-binding lectin from elderberry (*Sambucus nigra*) bark, a type-2 ribosome-inactivating protein with an unusual specificity and structure. *Eur J Biochem*, v. 235. n. 1-2: p. 128-137.1996.

110 VAN DAMME, E.J.M.;A. BARRE;P. ROUGÉ;F. VAN LEUVEN.W.J. PEUMANS, Characterization and Molecular Cloning of *Sambucus nigra* Agglutinin V (Nigrin b), A Galnac-specific Type-2 Ribosome-Inactivating Protein from the Bark of Elderberry (*Sambucus nigra*). *European Journal of Biochemistry*, v. 237. n. 2: p. 505-513.1996.

111 VAN DAMME, E.J.M.;A. BARRE;P. ROUGÉ;F. VAN LEUVEN.W.J. PEUMANS, Isolation and Molecular Cloning of a Novel Type 2 Ribosome-inactivating Protein with an Inactive B Chain from Elderberry (*Sambucus nigra*) Bark. *Journal of Biological Chemistry*, v. 272. n. 13: p. 8353-8360.1997.

112 VAN DAMME, E.J.M.;S. ROY;A. BARRE;L. CITORES;K. MOSTAFAPOUS;P. ROUGÉ;F. VAN LEUVEN;T. GIRBÉS;I.J. GOLDSTEIN.W.J. PEUMANS, Elderberry (*Sambucus nigra*) Bark Contains two Structurally Different Neusac(α 2,6)Gal/Galnac-Binding Type 2 Ribosome-Inactivating Proteins. *European Journal of Biochemistry*, v. 245. n. 3: p. 648-655.1997.

113 RUTENBER, E..J.D. ROBERTUS, Structure of ricin B-chain at 2.5 Å resolution. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, v. 10. n. 3: p. 260-269.1991.

114 PASCAL, J.M.;P.J. DAY;A.F. MONZINGO;S.R. ERNST;J.D. ROBERTUS;R. IGLESIAS;Y. PÉREZ;J.M. FÉRRERAS;L. CITORES.T. GIRBÉS, 2.8-Å crystal structure of a nontoxic type-II ribosome-inactivating protein, ebulin I. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, v. 43. n. 3: p. 319-326.2001.

115 KAKU, H.;Y. TANAKA;K. TAZAKI;E. MINAMI;H. MIZUNO.N. SHIBUYA, Sialylated Oligosaccharide-specific Plant Lectin from Japanese Elderberry (*Sambucus sieboldiana*) Bark Tissue Has a Homologous Structure to Type II Ribosome-inactivating Proteins, Ricin and Abrin. *Journal of Biological Chemistry*, v. 271. n. 3: p. 1480-1485.1996.

116 ROJO, M.A.;M. YATO;N. ISHII-MINAMI;E. MINAMI;H. KAKU;L. CITORES;T. GIRBÉS.N. SHIBUYA, Isolation, cDNA Cloning, Biological Properties, and Carbohydrate Binding Specificity of Sieboldin-b, a Type II Ribosome-Inactivating Protein from the Bark of Japanese Elderberry (*Sambucus sieboldiana*). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 340. n. 2: p. 185-194.1997.

117 SHIBUYA, N.;I.J. GOLDSTEIN;W.F. BROEKAERT;M. NSIMBA-LUBAKI;B. PEETERS.W.J. PEUMANS, The elderberry (*Sambucus nigra L.*) bark lectin recognizes the Neu5Ac(alpha 2-6)Gal/GalNAc sequence. *Journal of Biological Chemistry*, v. 262. n. 4: p. 1596-1601.1987.

118 YANG, Q.;R.S. LIU;Z.Z. GONG.W.Y. LIU, Studies of three genes encoding Cinnamomin (a type II RIP) isolated from the seeds of camphor tree and their expression patterns. *Gene*, v. 284. n. 1-2: p. 215-23.2002.

119 SPHYRIS, N.;J.M. LORD;R. WALES.L.M. ROBERTS, Mutational analysis of the Ricinus lectin B-chains. Galactose-binding ability of the 2 gamma subdomain of Ricinus communis agglutinin B-chain. *J Biol Chem*, v. 270. n. 35: p. 20292-7.1995.

120 JENSEN, M.A.;M. FUKUSHIMA.R.W. DAVIS, DMSO and betaine greatly improve amplification of GC-rich constructs in de novo synthesis. *PLoS One*, v. 5. n. 6: p. e11024.2010.

121 JIANG, S.Y.;R. RAMAMOORTHY;R. BHALLA;H.F. LUAN;P.N. VENKATESH;M. CAI.S. RAMACHANDRAN, Genome-wide survey of the RIP domain family in *Oryza sativa* and their expression profiles under various abiotic and biotic stresses. *Plant Mol Biol*, v. 67. n. 6: p. 603-14.2008.

122 CHANDLER, V.L..V. BRENDDEL, The Maize Genome Sequencing Project. *Plant Physiology*, v. 130. n. 4: p. 1594-7.2002.

123 MARTIENSSEN, R.A.;P.D. RABINOWICZ;A. O'SHAUGHNESSY.W.R. MCCOMBIE, Sequencing the maize genome. *Curr Opin Plant Biol*, v. 7. n. 2: p. 102-7.2004.

124 PATERSON, A.H.;J.E. BOWERS;R. BRUGGMANN;I. DUBCHAK;J. GRIMWOOD;H. GUNDLACH;G. HABERER;U. HELLSTEN;T. MITROS;A. POLIAKOV;J. SCHMUTZ;M. SPANNAGL;H. TANG;X. WANG;T. WICKER, *et al.*, The Sorghum bicolor genome and the diversification of grasses. *Nature*, v. 457. n. 7229: p. 551-556.2009.

125 PENG, Z.;T. LU;L. LI;X. LIU;Z. GAO;T. HU;X. YANG;Q. FENG;J. GUAN;Q. WENG;D. FAN;C. ZHU;Y. LU;B. HAN.Z. JIANG, Genome-wide characterization of the biggest grass, bamboo, based on 10,608 putative full-length cDNA sequences. *BMC Plant Biol*, v. 10. n.: p. 116.2010.

126 KANE, J.F..D.L. HARTLEY, Formation of recombinant protein inclusion bodies in Escherichia coli. *Trends in Biotechnology*, v. 6. n. 5: p. 95-101.1988.

127 SCHEIN, C.H..M.H.M. NOTEBORN, Formation of Soluble Recombinant Proteins in Escherichia Coli is Favored by Lower Growth Temperature. *Nat Biotech*, v. 6. n. 3: p. 291-294.1988.

128 VALAX, P..G. GEORGIU, Molecular characterization of beta-lactamase inclusion bodies produced in Escherichia coli. 1. Composition. *Biotechnol Prog*, v. 9. n. 5: p. 539-47.1993.

129 MONTFORT, W.;J.E. VILAFRANCA;A.F. MONZINGO;S.R. ERNST;B. KATZIN;E. RUTENBER;N.H. XUONG;R. HAMLIN.J.D. ROBERTUS, The three-dimensional structure of ricin at 2.8 Å. *J Biol Chem*, v. 262. n. 11: p. 5398-403.1987.

130 MELTON, D.A.;P.A. KRIEG;M.R. REBAGLIATI;T. MANIATIS;K. ZINN.M.R. GREEN, Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucleic Acids Res*, v. 12. n. 18: p. 7035-56.1984.

131 PELHAM, H.R..R.J. JACKSON, An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur J Biochem*, v. 67. n. 1: p. 247-56.1976.

132 PITTALUGA, E.;A. POMA;A. TUCCI.L. SPANO, Expression and characterisation in *E. coli* of mutant forms of saporin. *J Biotechnol*, v. 117. n. 3: p. 263-6.2005.

133 WANG, W.;R. VIGNANI;M. SCALI.M. CRESTI, A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. *Electrophoresis*, v. 27. n. 13: p. 2782-6.2006.

134 SIVARAMAN, T.;T.K. KUMAR;G. JAYARAMAN.C. YU, The mechanism of 2,2,2-trichloroacetic acid-induced protein precipitation. *J Protein Chem*, v. 16. n. 4: p. 291-7.1997.

135 UTSUMI, T.;A. IDE.G. FUNATSU, Ricin-a-Chain Induces Fusion of Small Unilamellar Vesicles at Neutral Ph. *Febs Letters*, v. 242. n. 2: p. 255-258.1989.

136 SUHAN, M.L..C.J. HOVDE, Disruption of an internal membrane-spanning region in Shiga toxin 1 reduces cytotoxicity. *Infect Immun*, v. 66. n. 11: p. 5252-9.1998.

137 JAIN, E.;A. BAIROCH;S. DUVAUD;I. PHAN;N. REDASCHI;B.E. SUZEK;M.J. MARTIN;P. MCGARVEY.E. GASTEIGER, Infrastructure for the life sciences: design and implementation of the UniProt website. *BMC Bioinformatics*, v. 10. n.: p. 136.2009.

138 KELLY, S.M..N.C. PRICE, The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. *Curr Protein Pept Sci*, v. 1. n. 4: p. 349-84.2000.

139 AGAPOV, I.I.;A.G. TONEVITSKY;A.T. SHAMSHIEV;E. POHL;P. POHL;R.A. PALMER.M.P. KIRPICHNIKOV, The role of structural domains in RIP II toxin model membrane binding. *Febs Letters*, v. 402. n. 1: p. 91-93.1997.

140 MAYERHOFER, P.U.;J.P. COOK;J. WAHLMAN;T.T.J. PINHEIRO;K.A.H. MOORE;J.M. LORD;A.E. JOHNSON.L.M. ROBERTS, Ricin A Chain Insertion into Endoplasmic Reticulum Membranes Is Triggered by a Temperature Increase to 37 degrees C. *Journal of Biological Chemistry*, v. 284. n. 15: p. 10232-10242.2009.